

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

**REDUÇÃO DO NÍVEL DE CONTAMINAÇÃO POR *Salmonella* Enteritidis EM
FRANGOS DE CORTE**

AUTOR: Luiz Antonio Faccenda de Avila
Tese apresentada como requisito parcial
para a obtenção do grau de Doutor em
Ciências Veterinárias na Área de Sanidade
Avícola.

**Orientador: Vladimir Pinheiro do
Nascimento**

PORTO ALEGRE
2005

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

**REDUÇÃO DO NÍVEL DE CONTAMINAÇÃO POR *Salmonella* Enteritidis EM
FRANGOS DE CORTE**

Autor: Luiz Antonio Faccenda de Avila

**Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção
do grau de Doutor em Ciências Veterinárias na Área de
Sanidade Avícola.**

Orientador: Prof. Dr. Vladimir Pinheiro do Nascimento

PORTO ALEGRE

2005

Luiz Antonio Faccenda de Ávila

REDUÇÃO DO NÍVEL DE CONTAMINAÇÃO POR *Salmonella* Enteritidis EM FRANGOS DE CORTE

Aprovado em 09 DEZ 2005

APROVADO POR:

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

Prof. Dr. Ricardo Alfredo Soncini
Membro da Comissão

Prof. Dr. Sérgio Luiz Vieira
Membro da Comissão

Prof. Dr. Hamilton Luiz de Souza Moraes
Membro da Comissão

AGRADECIMENTOS

À minha esposa, Maria Inês pelo amor, carinho, estímulo e apoio incondicionais.

Ao Prof. Dr. Vladimir Pinheiro do Nascimento pela amizade, confiança, orientação e oportunidade de realizar este trabalho.

Ao Dr. Ricardo Alfredo Soncini pela amizade, incentivo e orientações técnicas.

À empresa Sadia S.A. pela disponibilização das instalações experimentais, dos laboratórios, equipamentos e reagentes.

À empresa Btech Tecnologias Agropecuárias e Comércio Ltda pelo fornecimento de reagentes e pelo financiamento de parte deste trabalho.

À empresa BioCamp Laboratórios Ltda pelo fornecimento de vacinas e flora de exclusão e pelo financiamento de parte deste trabalho.

À Prof.^a Dra. Vera Wald pelo auxílio nas análises estatísticas deste trabalho e pela sua disponibilidade em orientar em qualquer hora.

Aos professores Carlos Tadeu Pippi Salle e Hamilton Luiz de Souza Moraes pela oportunidade e incentivo.

Ao Prof. Dr. Cláudio Wagec Canal pela amizade e apôio.

Ao Prof. Dr. Ari Bernardes da Silva pela amizade e bem humoradas discussões técnicas.

Aos veterinários e laboratoristas do Laboratório Central da Sadia S.A. pelo valioso apôio aos experimentos deste trabalho.

À toda equipe do CDPA, especialmente Omar, Sílvio e Zico pela amizade e colaboração.

Aos colegas Egídio, Danilo, Rosecler e Mariangela pela amizade e incentivo.

RESUMO

As salmonelas causadoras do Paratifo Aviário, principalmente a *Salmonella* Enteritidis (SE), têm estado entre as principais causas de toxinfecção alimentar em humanos, causando grandes prejuízos ao setor produtivo. A busca de uma medida única e definitiva para o controle do Paratifo Aviário tem levado a frustração dos esforços empregados, em função das características dos agentes e da infecção provocada. Portanto, ganha força a estratégia de utilizar-se um conjunto de medidas que objetivem a redução gradativa da pressão infectiva em um sistema de produção, levando à melhora crescente do grau de contaminação dos produtos disponibilizados aos consumidores.

O objetivo desta tese é fornecer à indústria avícola um conjunto de meios práticos para o controle do Paratifo Aviário e, conseqüentemente, para a produção de alimentos mais seguros ao consumo humano. Para tanto, foram conduzidos quatro estudos, sendo que três estudos foram dedicados ao aumento de resistência das aves à infecção por SE e o quarto estuda a redução do número desta bactéria na ave no período de pré-abate.

Em um experimento avaliou-se a imunização das aves com uma bacterina de SE, objetivando o aumento da resistência à infecção por SE em matrizes de frango de corte. Três semanas após o início do desafio, não foram detectadas diferenças entre os grupos testados nos números de SE recuperadas do ceco e no número de cecos e fígados infectados por este agente. Esta conclusão, embora verdadeira para as condições experimentais usadas, necessita de experimentações adicionais em condições de criação tradicional para ser referendada.

A Vacinação Maternal e o uso de Probiótico, como medidas para aumentar a resistência inicial de pintos de corte, foram estudados em 3 experimentos. O uso de

Probiótico causou uma redução no número de ufc de SE nos cecos de até 1,45 log₁₀. A maior redução, ocorrida no Experimento III, demonstra a importância da antecipação do uso do Probiótico em relação ao início do desafio. Não se verificou nenhum efeito da Vacinação Maternal no número de cecos positivos ou no número de ufc de SE no ceco.

Em quatro experimentos foram investigados os efeitos da pulverização da cepa 9R de *Salmonella Gallinarum* (SG-9R) em pintos de corte de um dia de idade sobre a infecção provocada artificialmente por SE. A aplicação da SG-9R em pintos de um dia apresenta potencial para auxiliar no controle da infecção por SE. Em que pese essa conclusão, estudos adicionais são necessários para verificar a magnitude da efetividade desta medida, bem como determinar a probabilidade de reversão de patogenicidade da SG-9R.

Em três experimentos estudou-se a administração de água acidificada no pré abate de frangos de corte. Esta administração nas 24 horas que precedem o carregamento para o abate levou a uma redução de 99% no número de salmonelas no ingluvío dos frangos. Esta medida não é ideal, já que não evita a doença nas aves e, também, não garante a produção de alimentos integralmente livre de *Salmonella*. Porém, pode tornar-se uma importante ferramenta para redução da contaminação no abate dos lotes de frangos positivos para enfermidade.

ABSTRACT

Salmonellae that cause paratyphoid infection, mainly the Salmonella Enteritidis (SE), are among the main causes of foodborne diseases in humans, representing great loss for the poultry industry. The search for a unique and decisive control means has been frustrated due to the bacterial characteristics and the resulting infection. So, it becomes important the strategic use of a group of means that gradually reduce the infection pressure over the production system, taken to an increasing improvement of the contamination level of the final products offered to the consumers.

The thesis goal is to offer to the poultry industry a group of feasible means to control the paratyphoid infection and, corollary, to produce safer food to human beings. Therefore, four studies were conducted. Three of them were dedicated to the increase of bird resistance to the SE infection and one to the reduction of Salmonella contamination level of the broilers at the pre slaughter period.

The increase resistance of broiler breeders due to immunization with a SE bacterin was evaluated through an experiment. Three weeks after the challenge no differences were detected on the number of SE infected livers and ceca among the tested groups. This conclusion, although true under these conditions, needs further experiments under actual production systems to be corroborated.

The maternal vaccination and the use of probiotics as means to increase the initial resistance of broiler chickens to SE infection were accessed through three experiments. The probiotics reduced the number of SE colony forming units (CFU) in the ceca up to 1.45 Log₁₀. The greatest reduction occurred at Experiment III, indicating the importance of the administration of the probiotic being prior to the challenge. No effect of maternal

vaccination on the number of ceca positive to SE or the number of SE CFU recovered from the ceca.

The effect of spraying day old chickens with Salmonella Gallinarum strain 9R (SG-9R) on SE infection due to artificial challenge was assessed through four experiments. The application of SG-9R to day old chickens has a potential to help in the control of SE infection. In spite of this conclusion, further studies are needed to access the size of the effect, as well to determinate the probability of pathogenicity reversion of SG-9R.

Three experiments were done to study the effect of administration of acidified water to the broilers at the pre slaughter period on the presence of SE in the crop. The use of acidified water starting 24 hours before the initial loading of broilers to the slaughter plant caused a reduction of 99% on the number of SE taken from the crop. This is not an ideal approach, since it does not avoid the presence of SE in the broiler and, also, does not warrant the production of food free of Salmonella. Although it can be a important tool to the contamination reduction of broiler flocks positive to Salmonella.

SUMÁRIO

SUMÁRIO	9
1 INTRODUÇÃO	11
1.1 Avicultura de corte brasileira.....	11
1.2 O gênero <i>Salmonella</i>	12
1.3 Salmonelose no homem.....	13
1.4 Salmonelose nas aves	14
1.5 Controle do paratifo aviário.....	17
1.5.1 Exclusão Competitiva.....	17
1.5.2 Vacinação	20
1.5.3 Desinfecção de carcaças.....	24
1.5.4 Redução da <i>Salmonella</i> no pré-abate	24
1.5.5 Redução de <i>Salmonella</i> através da dieta	25
1.5.6 Considerações gerais para o controle do Paratifo Aviário	26
1.6 Objetivo geral	27
2 CAPÍTULO I.....	28
2.1 Efeito da Vacinação de Matrizes de Corte com uma Bacterina de <i>Salmonella</i> Enteritidis.....	28
2.1.1 Introdução.....	28
2.1.2 Materiais e Métodos	30
2.1.3 Resultados e Discussão.....	32
3 CAPÍTULO II	37
3.1 Efeito do Probiótico e Vacinação Maternal na Infecção por <i>Salmonella</i> Enteritidis nos Primeiros Dias de Pintos de Corte	37
3.1.1 Introdução.....	38
3.1.2 Materiais E Métodos.....	39
3.1.3 Resultados E Discussão.....	42
3.2 Effects of Probiotics and Maternal Vaccination on Infection Caused by <i>Salmonella</i> Enteritidis in Broiler Chicks	54
3.2.1 Introduction	55
3.2.2 Materials and Methods	56

3.2.3 Results and Discussion.....	59
4 CAPÍTULO III.....	69
4.1 Efeito da Administração de <i>Salmonella</i> Gallinarum Cepa 9r em Pintos de Corte Artificialmente Desafiados com <i>Salmonella</i> Enteritidis.....	69
4.1.1 Introdução.....	70
4.1.2 Materiais E Métodos	71
4.1.3 Resultados e Discussão.....	74
5 CAPÍTULO IV.....	81
5.1 Efeito da Acidificação da Água de Bebida no Pré-Abate na Recuperação de <i>Salmonella</i> Enteritidis do Inglúvio de Frangos	81
5.1.1 Introdução.....	82
5.1.2 Materiais e Métodos	83
5.1.3 Resultados	86
5.1.4 Discussão.....	89
5.2 Effect of Acidified Drinking Water on the Recovery of <i>Salmonella</i> Enteritidis from Broiler Crops.	96
5.2.1 Introduction	97
5.2.2 Material and Methods.....	97
5.2.3 Results	101
5.2.4 Discussion	104
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	108

1 INTRODUÇÃO

1.1 Avicultura de corte brasileira

Nas últimas décadas, a produção brasileira de frangos de corte tem tido um incremento muito expressivo, tornando-se um importante fator para o desenvolvimento social e econômico do país. O consumo de carne de frango vem sofrendo aumentos, atingindo o consumo médio de 33,88 kg *per capita* em 2004 (Relatório Anual da União Brasileira de Avicultura, 2004) e firmando-se como a principal fonte de proteínas de origem animal na alimentação do povo brasileiro, muito devido à disponibilidade, praticidade e, principalmente, pelo baixo preço no varejo. A avicultura brasileira tem sido uma constante fonte geradora de novas ofertas de emprego, exemplificada pelos 2 milhões de novas vagas de trabalho em 1998 (Avicultura Industrial, 1998) e 180 mil em 2004 (Relatório Anual da União Brasileira de Avicultura, 2004). O desenvolvimento da avicultura de corte nacional fica muito bem demonstrado pelo expressivo salto de produção ocorrido nas últimas três décadas. Em 1975, a produção nacional de frangos de corte foi de 534 mil toneladas, saltando para 8.494 mil toneladas em 2004, um incremento de 1.490%. Esta evolução tem sido provocada tanto pelo crescimento das exportações como pelo crescimento do consumo no mercado interno. As exportações brasileiras de frango em 1986 foram de 224 mil toneladas, elevando-se para 2.668 mil toneladas em 2004, representando um aumento de 1.091% e tornando o Brasil o maior exportador de carne de frango do mundo, superando os Estados Unidos. Em 2004, o frango brasileiro foi exportado para o significativo número de 142 países e contribuiu com US\$ 2,5 bilhões para o superávit da balança comercial brasileira. Esta evolução da avicultura no Brasil demonstra sua importância na economia nacional como geradora de divisas e como fornecedora de empregos e de alimento protéico de baixo custo (Relatório Anual da União Brasileira de Avicultura, 2004).

O grande avanço da produção avícola no mundo tem sido acompanhado pela evolução tecnológica dos meios de produção, especialmente nas áreas de nutrição, genética e sanidade, permitindo uma redução nos custos de produção e preços de venda. Apesar de toda a evolução, a área de sanidade ainda apresenta grandes desafios a serem superados, tanto no que tange à saúde das aves como no que diz respeito à saúde pública. Dentre as

enfermidades aviárias, as salmoneloses têm recebido especial atenção por serem enfermidades que trazem efeitos deletérios à saúde das aves e, também, por serem uma importante causa de toxinfecção alimentar no homem. O Brasil tornou-se o líder na exportação de carne de frango graças ao empenho da indústria avícola nacional, favorecida pela extensão territorial, clima e baixo custo de produção dos insumos básicos. Para contrabalançar a competitividade da indústria avícola nacional, tem sido crescente a imposição de barreiras sanitárias à importação de produtos de origem avícola brasileiras. Os países desenvolvidos, responsáveis pela compra de grande parte da carne de frango brasileira exportada, passaram a exigir uma qualidade microbiológica muito superior, especialmente com relação à presença de salmonelas (NASCIMENTO *et al.*, 1996a).

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento criou o Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA), Portaria Ministerial nº 193, de 19 de setembro de 1994, com o objetivo de obter a garantia de qualidade sanitária dos produtos avícolas. Este programa prevê normas de controle e/ou erradicação das principais doenças aviárias de transmissão vertical (salmoneloses e micoplasmoses aviárias) e horizontal, como a doença de Newcastle. As normas definem medidas de monitorização das salmoneloses em estabelecimentos avícolas de controle permanente e eventual destinados à reprodução e produção de aves e ovos férteis. Os estabelecimentos certificados deverão ser livres de *S. Gallinarum* e de *S. Pullorum*, bem como livres ou controlados para *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* (Brasil, 1995).

1.2 O gênero *Salmonella*

O gênero *Salmonella* pertence à família *Enterobacteriaceae*. Até 1997, foram identificados 2.435 sorovares por reações bioquímicas, sorológicas e capacidade de lise pelo fago O1 (POPOFF; LE MINOR, 1997). Este gênero se apresenta como bastonetes Gram-negativos, não esporogênicos, não encapsulados, anaeróbios facultativos, normalmente móveis, exceto os sorovares *Pullorum*, *Gallinarum* e *Arizonae* (DOYLE; CLIVER, 1990).

O gênero *Salmonella* tem duas espécies, *enterica* e *bongori*. A espécie *enterica* apresenta seis subespécies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*, enquanto que a espécie *bongori* tem apenas a *bongori*. Em geral, para simplificar a notação,

os nomes das espécies e subespécies não são indicados, usando-se somente o sorovar. Por exemplo, a *Salmonella enterica enterica* Enteritidis é referida por *Salmonella* Enteritidis (POPOFF; LE MINOR, 1997). Entre as salmonelas que afetam as aves de produção industrial, os sorovares *S. Pullorum* e *S. Gallinarum* demonstram uma acentuada especificidade às aves, sendo que o sorovar *Pullorum* pode ser considerado um biovar do sorovar *Gallinarum*. Estes sorovares possuem uma fórmula antigênica idêntica (POPOFF; LE MINOR, 1997). Oliveira (2000) indica que os sorovares *S. Gallinarum* e *S. Pullorum* são tratados no meio avícola como sorovares distintos, devido às diferentes apresentações clínicas e por serem nomes consolidados neste meio.

Uma análise do gênero *Salmonella* indica a evolução dos diferentes sorovares de uma origem comum próxima de outras enterobactérias, com *Escherichia coli*. Sendo que as salmonelas evoluíram como um patógeno intracelular facultativo, colonizando répteis, aves e mamíferos (BOYDE; HARTL, 1997).

1.3 Salmonelose no homem

As salmonelas têm sido consideradas entre as principais causas de toxinfecção alimentar no mundo (GAST, 1997). Um grande número de sorovares de *Salmonella* são patogênicos para o homem, causando um estado de portador assintomático, intoxicação alimentar, septicemia ou febre entérica; exceção se faz com os poucos sorotipos altamente adaptados às outras espécies. A gravidade da doença varia com o sorotipo, dose, idade e condição imunológica do paciente (TURNBULL, 1979). Embora *S. Gallinarum* e *S. Pullorum* sejam altamente adaptadas às aves, estes sorovares tem sido isolados de humanos (GAST, 1997).

No Reino Unido, no período de 1980-1992, o número de surtos de toxinfecção de origem alimentar passou de 10.000 para 31.352 casos, muitos dos quais causados por *Salmonella* Enteritidis (BARROW, 1993). Segundo estimativa do Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos, a salmonelose pode estar afetando entre 1 e 5 milhões de pessoas anualmente. As mesmas estimativas apontam uma hospitalização ao redor de 20.000 pacientes e o óbito de aproximadamente de 500 pessoas (POTTER, 1992). Em 52 surtos de toxinfecção alimentar com causas conhecidas em creches nos Estados Unidos, as salmonelas estiveram envolvidas em 52% dos casos e associadas a 81% das

mortes ocorridas (LEVINE *et al.*, 1991). Nos Estados Unidos, em 1986, o custo médico decorrente dos 1,3 milhões de casos de salmonelose foi estimado em mais de 1,2 bilhões de dólares (GENIGEORGIS, 1986). As toxinfecções por salmonelas, normalmente decorrentes da ingestão de alimentos ou águas contaminadas, podem ter conseqüências muito graves para crianças, idosos e imunodeprimidos (VARNAN; EVANS, 1991).

No Brasil, especialmente no período de 1994 a 1995, houve um incremento nos casos de toxinfecção alimentar noticiados pela imprensa. Infelizmente, na maioria dos casos, não houve confirmação laboratorial do agente causal. Nesse mesmo período, um levantamento dos índices de contaminação por *Salmonella* em carcaças de frango, realizado pelo Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária (CDPA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, identificou *Salmonella* em 17,5% das 1300 carcaças examinadas (NASCIMENTO *et al.*, 1996). Já, Santos *et al.* (2000) observaram 32% de contaminação por *Salmonella* em 150 carcaças de frangos congelados de quatro diferentes marcas comerciais. Presuntivamente, esta elevada contaminação pode estar relacionada com o incremento das toxinfecções alimentares.

As infecções em humanos por *Salmonella* Enteritidis têm aumentado nos dois lados do Atlântico no período de 1985 a 1990. Dados da Organização Mundial da Saúde do período de 1979 a 1987 indicam um aumento na América do Norte, Europa e América do Sul (RODRIGUE; TAUXE; ROWE, 1990). Os principais reservatórios de *Salmonella* para infecção humana não tifóide são as aves; os veículos desta infecção são seus ovos, carne e produtos processados (COOPER, 1994). A difusão global da *Salmonella* Enteritidis em aves (WARD *et al.*, 2000; RABSCH; TSCHÄPE; BÄUMER, 2001) resultou em uma pandemia internacional de toxinfecção alimentar (ALMONACID *et al.*, 2002). A facilidade com que a *S. Enteritidis* tem em causar uma infecção prolongada no trato reprodutivo das aves tem sido considerada como o principal fator na transmissão vertical da bactéria a partir do lote de matrizes e, portanto, responsável pela sua difusão (GUARD-PETTER, 2001).

1.4 Salmonelose nas aves

As salmoneloses nas aves são clinicamente classificadas em três doenças: a Pulorose, causada pela *Salmonella enterica*, subespécie *enterica*, sorovar Pullorum (*S. Pullorum*); o Tifo Aviário, causado pela *Salmonella enterica*, subespécie *enterica*, sorovar

Gallinarum (*S. Gallinarum*) e as infecções paratifóides ou Paratifo Aviário, determinado pelos sorovares não adaptados às aves, os quais, até por não possuírem preferência por um hospedeiro especial, podem causar toxinfecções alimentares em humanos.

As doenças Pulorose e Tifo Aviário representaram no passado um problema grave para a indústria avícola, pois causavam grandes perdas de produção. Dois fatores fundamentais para o controle destas enfermidades foram o desenvolvimento de um diagnóstico rápido e barato para eliminar as aves portadoras, e a baixa adaptação destas salmonelas às outras espécies, o que reduz a pressão infecciosa nas granjas de aves.

As perdas decorrentes das formas clínicas das doenças causadas pela salmonelas nas aves foram, no passado, a principal motivação para o controle destas infecções. Atualmente, a prevenção da transmissão da *Salmonella* sp. aos humanos através dos produtos avícolas tem sido uma das prioridades do setor avícola (OLIVEIRA, 2000). Normalmente, as salmonelas causadoras do Paratifo Aviário colonizam o trato digestivo dos frangos, onde podem persistir até o abate, tornando-se responsáveis pela contaminação no produto final e podendo levar os consumidores a uma grave toxinfecção alimentar. De forma semelhante, a infecção nas galinhas poedeiras de ovos comerciais pode levar à produção de ovos contaminados e, como consequência, pôr em risco o consumidor. Neste caso, o risco de uma toxinfecção alimentar é maior em função do hábito de se consumir ovos crus, o que não ocorre com a carne de frango.

O Paratifo Aviário em aves recém eclodidas tem consequências muito diferentes do que em aves maduras. Em aves jovens e suscetíveis, pode levar à doença e a uma alta mortalidade. A fase de nascimento dos pintos é um ponto crítico para o controle das salmoneloses (BAILEY; CASON; COX, 1998). As aves mais velhas são muito menos suscetíveis aos efeitos letais das salmonelas causadoras de paratifo. Estas salmonelas podem colonizar o intestino de aves adultas e ainda levar a uma disseminação sistêmica sem, contudo, provocar morbidade ou mortalidade significativas. Infecções experimentais em aves adultas com altas doses de salmonelas causadoras de paratifo têm sido relatadas como incapazes de produzirem sinais clínicos de doença (GAST, 1997).

As salmonelas causadoras de Paratifo Aviário podem ser isoladas de uma grande variedade de espécies, incluindo o homem e outros mamíferos, aves, répteis e insetos. Henzler e Optiz (1992) isolaram *S. Enteritidis* em 24% dos camundongos capturados em

granjas com aves contaminadas e não conseguiram isolamento em camundongos obtidos de granjas com aves livres de *Salmonella*. Kopanic, Sheldon e Wright (1994) isolaram *Salmonella* de baratas e Mcallister, Steelman e Skeeles (1994) apontam o cascudinho (Coleoptera: Tenebrionidae) como vetor biológico para *Salmonella* Typhimurium. A inter-relação entre este grande número de hospedeiros resulta em um aumento da pressão infecciosa nas granjas, criando uma grande dificuldade para as tentativas de controle ou de diminuição da prevalência da enfermidade.

No início dos anos 70 foi detectada uma elevação da prevalência de SE nos Estados Unidos (ASEKOFF; SCHOROEDER; BRACHMAN, 1970) e na Inglaterra e País de Gales (Lee, 1974). Nos anos 80, a SE passa ser considerada com um dos principais riscos na segurança alimentar (RODRIGUE, TAUXE & ROWE, 1990). Em 1990, o sorovar Enteritidis foi o de maior prevalência nos Estados Unidos (MISHU *et al.*, 1994). No Brasil, Andretti Filho *et al.* (2001) isolaram 73 sorovares de *Salmonella* em materiais avícolas no período de 1994 a 1999. Sendo que o sorovar de maior incidência (46,52 %) foi o Enteritidis, proveniente de órgãos de frango de corte, poedeiras e matrizes de corte. Apesar da coincidência do aumento da prevalência de SE em diferentes continentes, o que poderia levar à suposição de que este incremento tenha tido uma origem comum, um estudo de fagotipagem em salmonelas oriundas de casos humanos demonstrou que as salmonelas predominantes na Inglaterra e País de Gales corresponderam ao fagotipo 4 (WALL; WARD, 1999), enquanto que os fagotipos 8 e 13a foram os predominantes nos Estados Unidos (HICKMAN-BRENNER; STUBBS; FARMER, 1991). No Brasil, Santos (2001) analisou 111 isolados de *Salmonella* Enteritidis oriundas de produtos avícolas, de alimentos e materiais biológicos humanos envolvidos em episódios de toxinfecções alimentares, e detectou as prevalências 57,7% para o fagotipo 4 e 32,4% para o fagotipo 4a. O fagotipo 4 é geneticamente distinto dos fagotipos 8 e 13^a (OLSEN *et al.*, 1994), o que sugere a possibilidade de que, em sua maior parte, os casos de salmonelose nos Estados Unidos tenham origem clonal distinta dos casos ocorridos na Inglaterra, País de Gales e Brasil. Rabsch *et al.* (2000), buscando uma explicação para elevação global do número de problemas de toxinfecções alimentares por SE, levantam a hipótese de que a *Salmonella* Enteritidis (SE) preencheu um nicho ecológico deixado pela erradicação da *Salmonella* Gallinarum (SG), levando a um aumento epidêmico dos casos de infecção humana no final

do século XX. Os levantamentos epidemiológicos de ambas as doenças na Alemanha demonstraram uma relação inversa entre os casos de SE em humanos e os de SG em aves, sugerindo que a SG competitivamente excluiu a SE dos lotes de aves no começo do século XX.

1.5 Controle do paratifo aviário

O Paratifo Aviário, por dois motivos principais, pode trazer graves prejuízos para a indústria avícola brasileira. O primeiro, e talvez o mais importante, é a já referida possibilidade de causar toxinfecção alimentar grave ao consumidor, com conseqüências na saúde pública e na perda de imagem do setor. O segundo é a perda de mercado externo, pois é uma prática comum que os contratos internacionais estabeleçam como condição a entrega de produtos livres de *Salmonella*. Diante do prejuízo potencial representado pelo Paratifo Aviário, a indústria e a comunidade científica vêm dedicando esforços ao controle da enfermidade. Assim, o controle do Paratifo Aviário passou a mobilizar os esforços de vários centros de pesquisas dedicados a Patologia Aviária em trabalhos na área de exclusão competitiva e de vacinação, principalmente. Outras áreas como o emprego de antibióticos, aplicação de produtos sanitizantes e inibidores do crescimento das *Salmonellas* receberam uma atenção moderada. O Centro de Diagnóstico e Pesquisas em Patologia Aviária (CDPA), da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, aliou-se a estes esforços e produziu cinco trabalhos de dissertação de Mestrado e três teses de doutorado nestes últimos nove anos, fornecendo novos subsídios científicos para maior conhecimento e controle das salmoneloses aviárias.

1.5.1 Exclusão Competitiva

O uso de uma flora competitiva é descrito por Barrow (1993) como o único procedimento, baseado em princípios microbiológicos, que tem aceitação integral e internacional como parte dos programas de controle de *Salmonella*. Nurmi e Rantala (1973), publicaram um trabalho que demonstra o efeito da administração de uma suspensão de conteúdo do trato alimentar de aves adultas na redução da colonização do intestino de pintos por *Salmonella*. Este trabalho deu origem ao que passou se a chamar Conceito de Nurmi, ou seja, o estabelecimento de uma microflora de ave adulta em pintos recém

eclodidos para proteção contra uma infecção por *Salmonella* pelo fenômeno de exclusão competitiva (EC). A EC tem sido usada principalmente como medida profilática para aumentar a resistência das aves a uma infecção por *Salmonella*. O efeito esperado de um tratamento com EC antes de um desafio por *Salmonella* é impedir que a *Salmonella* se multiplique no ceco, de maneira que seja eliminada gradualmente (IMPEY; MEAD, 1989). O mecanismo de proteção preciso é desconhecido e pode nunca ser determinado em função da complexidade do intestino como habitat para os microrganismos e a variabilidade das interações entre microrganismo-hospedeiro e entre diferentes microrganismos (BLANKENSHIP, 1991a). Um dos mais importantes mecanismos de proteção provavelmente seja a competição por sítios receptores do intestino. Porém, o efeito inibitório sobre a *S. kedougou*, que aparentemente não se fixa na mucosa, sugere que a competição por sítios receptores pode não ser o único mecanismo de inibição. Também os ácidos graxos voláteis, produzidos principalmente pelas bactérias anaeróbicas da flora intestinal normal, podem ter efeito inibitório sobre as salmonelas (NISBET *et al.*, 1993; CORRIER *et al.*, 1995).

A administração oral de conteúdo intestinal ou fezes de frangos adultos aumentou significativamente a resistência de pintos e peruzinhos a uma infecção por *Salmonella* e esta proteção foi substancial até o 63º dia de idade, enquanto durou o experimento (SNOEYENBOS; WEINACK; SMYSER, 1977). Também, Rigby & Pettit (1980) descrevem uma redução na incidência de infecção por *S. Typhimurium* até a idade de abate em frangos de corte tratados com extrato de cama de matrizes, cultura anaeróbica deste extrato ou cultura anaeróbica de fezes de frango adultos. Em um experimento em larga escala, Snoeyenbos *et al.* (1985) encontram resultados similares que indicam que uma restrição de água e alimento durante 48 horas no 23º e 51º dia de idade não afetaram a incidência da doença nos grupos tratados e, também, os grupos tratados eliminaram mais rapidamente a infecção do que os grupos controle.

Em um estudo a campo, envolvendo 8 milhões de frangos de corte alojados em 284 lotes, Goren *et al.* (1988) encontraram 14,7% e 24,1% dos lotes positivos para *Salmonella* nos lotes tratados com EC e nos lotes controle, respectivamente. Além do mais, a proporção de aves portadoras caiu de 3,5% nos lotes controle para 0,9% nos lotes tratados ($P < 0,01$). Blankenship *et al.* (1993) observaram uma redução no número de aves portadoras de 11%

entre os lotes controles para 2% nos lotes tratados com uma cultura indefinida de raspado de mucosa intestinal ($P < 0,05$). Sendo que, no abatedouro, houve uma redução de contaminação de 41% das carcaças oriundas dos lotes controle para 10% das carcaças oriundas dos lotes tratados com EC. Estes dois estudos apresentaram indícios seguros de que alguns lotes já estavam infectados por *Salmonella* antes da chegada dos pintos às granjas.

Wierup, Wahlström e Engström (1992), descrevendo a experiência sueca de aplicação de EC em frangos de corte, relatam que em 179 lotes que receberam EC somente um tornou-se positivo para *Salmonella*. Presuntivamente, este resultado foi positivamente afetado pelo fato dos pintos serem oriundos de lotes de matrizes livres de *Salmonella*. Também, a partir do alojamento de pintos livres de *Salmonella* em 40 lotes, não foram encontrados lotes positivos no grupo tratado com EC, enquanto que no grupo controle, 24% dos lotes foram positivos para *Salmonella* (COLIN; LE GOUX; CLEMENT, 1997).

O uso de EC reduziu a contaminação de frangos por *Salmonella* na granja e no abatedouro. No abatedouro, pesquisando *Salmonella* na pele do pescoço, 44% das amostras (44/90) foram positivas para *Salmonella* no grupo tratado com EC, enquanto que no grupo controle, esta positividade foi de 62% (52/84) (PALMU; CAMELIN, 1997).

Em seis experimentos foi demonstrado que a exposição dos pintos a *Salmonella* antes do tratamento com EC pode reduzir substancialmente a proteção subsequente deste tratamento (BAILEY; CASON; COX, 1998). Evidenciam, ainda, que a máquina de eclosão é um ponto crítico para o controle de *Salmonella*. Por outro lado, Ziprin, Corrier e DeLoach (1993) indicam que o tratamento de pintos de corte com microflora cecal, 24 a 72 horas após o desafio com *S. Typhimurium* provocou uma redução altamente expressiva na concentração de *S. Typhimurium* no ceco. Anteriormente, Weinack *et al.* (1985), já indicavam que o tratamento com uma microflora protetora facilita a recuperação das aves de uma infecção por *Salmonella* e que múltiplos tratamentos aceleram esta recuperação.

Corrier *et al.* (1990), trabalhando com pintos de galinha de postura, e Hinton *et al.* (1990), trabalhando com pintos de frango de corte, demonstraram que a suplementação de lactose para as aves concomitantemente com a administração de CE aumenta a resistência do ceco das aves a uma infecção por *Salmonella*. Os pintos que receberam lactose tiveram um aumento significativo ($P < 0,05$) na concentração de ácido láctico no conteúdo do ceco,

este aumento foi diretamente correlacionado com a diminuição do pH e causou uma redução da concentração dos ácidos graxos voláteis, porém com um aumento significativo nas formas dissociadas de alguns ácidos graxos voláteis (HINTON *et al.*, 1990). Os resultados obtidos por Corrier *et al.* (1990) indicaram que o efeito potencializador da lactose sobre a resistência da colonização por *Salmonella* depende da presença de uma flora anaeróbica no ceco. Estes estudos indicaram que o efeito de proteção originado por uma dieta contendo lactose está diretamente associado com a produção de ácidos graxos voláteis bacteriostáticos pela flora anaeróbica do ceco.

A administração de CE tem sido usada logo após o tratamento com antibiótico. O antibiótico visa a eliminar a infecção por salmonelas e o tratamento com CE objetiva restabelecer a microflora intestinal original, afetada pelo tratamento com o antibiótico. Esta abordagem faz sentido no tratamento de matrizes ou de lotes pedigree que não se queira abater em função da doença. A administração de antibiótico pode eliminar a infecção, mas deixa as aves sujeitas à reinfecção. Reynolds *et al.* (1997) trataram com Antibiótico e CE 11 lotes infectados com *Salmonella* e obtiveram uma redução da infecção por *Salmonella* por um longo período em 2 lotes e por um curto período em 5 lotes. Entretanto, as aves não foram removidas para um ambiente limpo após receberem o tratamento com antibiótico e antes de receberem o tratamento com CE. Este procedimento parece ser necessário para se obter o melhor resultado possível (BLANKENSHIP, 1991b).

1.5.2 Vacinação

O controle da salmonelose através da vacinação tem sido objeto de vários estudos em humanos e em animais para produção de alimento. Ao considerar o uso da vacinação no controle da infecção causada por salmonelas nas aves é importante que se faça distinção entre as diferentes categorias de infecção provocadas por estes agentes: (1) Infecção do sistema reticuloendotelial com pequeno envolvimento inicial do intestino, infecção provocada principalmente por salmonelas adaptadas à espécie, como a *Salmonella Gallinarum*; (2) Infecção intestinal intensa provocada por uma *Salmonella* com capacidade de invadir o organismo. A doença provocada pela *Salmonella Enteritidis* e a *Salmonella Typhimurium*, salmonelas consideradas não adaptadas às aves, na maioria das situações se enquadram neste último tipo de infecção. O desenvolvimento de uma vacina contra este

tipo de infecção por *Salmonella* encontra como dificuldade adicional o fato de procurar-se impedir a entrada e multiplicação do agente no organismo além de eliminar o grande número destes do trato alimentar.

Vacinação contra sorotipos adaptados à espécie – O uso de vacinas vivas com cepas atenuadas de *Salmonella* induz a uma imunidade protetora forte contra a reinfecção do hospedeiro (ZHANG-BARBER; TURNER; BARROW, 1999). A vacina viva com a cepa 9R da *Salmonella Gallinarum* tem sido usada extensivamente desde os anos 50, conferindo uma forte proteção contra a doença em aves adultas. A utilização desta vacina trás como inconvenientes o fato da bactéria reter alguma virulência e de poder persistir nas aves durante meses, além de poder ser transmitida via ovo (GORDON; LUKE, 1959; SILVA *et al.*, 1981). A vacinação com a cepa 9R da SG, da qual foi retirado o plasmídeo da virulência, confere resistência ao desafio oral com SG, mas esta resistência não foi tão completa como a promovida com a vacinação com a cepa 9R da SG (BARROW; HASSAN; BERCHIERI, 1990). Da mesma maneira, produzindo menos proteção do que a vacinação com a cepa 9R da SG, a vacina mutante *aroA* da SG mostra-se efetiva na imunização de pintos de duas semanas de idade (GRIFFIN; BARROW, 1993).

Os resultados dos estudos com vacina contra as cepas de *Salmonella* não adaptadas à espécie necessitam ser analisados levando-se em consideração as cepas da bactéria usada no desafio, a via e dose da inoculação, além da idade da ave ao ser vacinada e desafiada. Infecções a poucas horas do nascimento podem representar com certo grau de realismo as contaminações ocorridas durante a eclosão. Enquanto que as infecções nas aves com várias semanas sugerem outras rotas de contaminação. Desafios com doses altas, tais como 9 Log₁₀, podem produzir uma infecção consistente, porém podem não refletir uma situação normal de campo e podem não retratar com precisão a eficácia da vacina contra uma infecção ocorrida em situações normais. Para se ter uma situação mais realista, o desafio pode ser feito através da inoculação de uma pequena parte dos grupos vacinado e controle, monitorando-se a difusão lateral da infecção. Ou, também, incorporar pequeno número de *Salmonella* na ração (ZHANG-BARBER; TURNER; BARROW, 1999).

Os estudos do uso de vacinas contra as salmonelas não adaptadas às aves de produção industrial foram intensificados nas espécies dedicadas à produção de ovos para consumo humano. Provavelmente em função da maior importância representada pelo

consumo de ovos no surgimento de casos de intoxicação alimentar em humanos. Estudos feitos com imunização de aves poedeiras adultas através do uso de bacterinas de *Salmonella*, mostram uma redução no número de bactérias eliminadas pelas fezes e no número de aves com isolamento de *Salmonella* nos tecidos entre os grupos vacinados em comparação aos grupos controles (GAST; STONE; HOLT, 1993; NAKAMURA *et al.*, 1994; Nakamura *et al.*, 2004). Woodward *et al.* (2002), além de confirmar os resultados dos estudos indicados acima, demonstra que a vacinação com uma bacterina de *Salmonella* resulta em uma diminuição da contaminação de ovos e pode contribuir para uma redução da infecção nas aves poedeiras e na contaminação de seus ovos. Corroborando os dados acima, Liu *et al.* (2001), usando *S. Enteritidis* inativada por formol-aldeído e encapsulada em micro esferas biodegradáveis na vacinação de aves poedeiras via intramuscular ou via oral na quarta semana de idade, obteve redução no número de *Salmonella* excretada nas fezes e no seu isolamento nos tecidos. Demonstrou, também, que o uso da vacina oral encapsulada em micro esferas foi capaz provocar um aumento na resposta de anticorpos IgA no intestino, concluindo que a administração em dose única de antígeno de *S. Enteritidis* encapsulado em micro esfera é capaz de produzir uma resposta imune sistêmica e local, produzindo imunidade protetora. Gast, Stone e Holt (1993) concluem que, usando-se em conjunto com outras estratégias de sanitização do lote e monitoria de infecção, a vacinação com bacterina pode potencialmente reduzir o nível geral de contaminação ambiental e, conseqüentemente, reduzir a transmissão horizontal de *S. Enteritidis* entre e dentro dos lotes de poedeiras. Por outro lado, Davison *et al.* (1999) observando o efeito da vacinação com uma bacterina em 11 lotes poedeiras comerciais não demonstram um efeito protetor resultante desta prática, porém este resultado parece estar comprometido pelo número de lotes observados e grande variabilidade encontrada. Em um experimento de campo feita na Holanda entre agosto de 1995 e dezembro de 1997, Ferberwee *et al.* (2000) concluem haver indicações de que a vacina contribui para a redução da reinfecção por *S. Enteritidis* nos lotes de matrizes de corte. Em uma observação a campo, analisando ovos de 12 lotes de aves poedeiras vacinadas com uma bacterina contra *Salmonella*, Davies e Breslin (2004) verificaram a presença de *S. Enteritidis* em 0,24% dos ovos, contrastando com resultados prévios obtidos de três lotes de aves não vacinadas que resultaram em um percentual de 1,29% de ovos contaminados com *S. Enteritidis*.

O desenvolvimento de vacinas vivas tem sido objeto de pesquisas em função das vantagens potenciais de seu uso, ou seja, a facilidade de aplicação em massa, a capacidade de estimular o desenvolvimento de uma resposta imune local e de possibilitar uma resposta imune celular, o que resultaria em uma maior proteção da ave imunizada. O uso de cepa vacinal atenuada apresenta como vantagem adicional a possibilidade de ser aplicada via oral em aves recém eclodidas e, desta maneira, colonizar o trato digestivo rapidamente em função da ausência de uma flora microbiana normal. Tal, através de um efeito de exclusão e não em função de uma resposta do sistema imune, pode ajudar a impedir o estabelecimento de uma infecção por *Salmonella* logo após. Dessa maneira, este efeito inibitório potencial poderá ser importante na decisão de escolha da cepa vacinal a ser usada como vacina viva. Barrow, Hassan e Berchieri (1990), usando uma cepa mutante *aroA* de *S. Typhimurium* F98 atenuada como vacina, obtiveram proteção de pintos de 4 dias de idade contra o desafio de 10^8 unidades formadoras de colônia da cepa mãe. Hassan e Curtiss III (1994), usando a cepa viva mutante $\Delta cya \Delta crp$ da *Salmonella* Typhimurium $\chi 3984$, imunizaram aves e, duas semanas após, obtiveram proteção contra o desafio com salmonelas de sorotipos homólogos como as *S. Enteritidis*, *S. Agona*, *S. Bredeney*, *S. Heidelberg* e contra sorotipos heterólogos com as *S. Hadar*, *S. Montivideo* e *S. Anatum*. Em outro experimento, Hassan e Curtiss III (1997), usando a mesma cepa vacinal, vacinaram aves de postura na 2^a e na 4^a semana de idade e avaliaram a proteção resultante contra o desafio de amostras selvagens de *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis* no 3^o, 6^o, 9^o, e 12^o meses de idade, mostrando que a vacina induziu a uma excelente proteção contra a invasão e/ou contaminação intestinal, visceral, do trato reprodutivo e dos ovos por *Salmonella*. Holt, Gast & Kellu-Aehle (2003) vacinaram as poedeiras durante o processo de muda forçada, através de pulverização com a vacina viva atenuada de *S. Typhimurium* MeganVacl, e demonstraram que houve uma redução da difusão horizontal da *S. Enteritidis* entre as aves vacinadas em comparação com as aves não vacinadas, concluindo que a vacinação de aves poedeiras com uma vacina viva de *S. Tyhimurium* pode ajudar a reduzir aos problemas com *S. Enteritidis* durante a muda forçada.

As vacinas vivas, para se tornarem aceitáveis, não podem ser virulentas para o homem e as aves. Porém, para as aves, é interessante que sejam o suficientemente invasivas para promover uma boa estimulação antigênica, já que a imunogenicidade pode estar

correlacionada com a capacidade de invasão da bactéria. Da mesma forma, é importante que a cepa vacinal desapareça da ave rapidamente. Considerando que o comércio internacional de frangos de corte, na grande maioria das vezes, exige que o produto seja livre de *Salmonella*, explicar que a bactéria existente no produto é de origem vacinal e não virulenta ao homem pode criar empecilhos a este comércio.

1.5.3 Desinfecção de carcaças

Como o Paratifo Aviário raramente causa uma infecção sistêmica aguda nas aves, e sua importância é atribuída à toxinfecção alimentar que pode causar ao homem, estratégias de ação visando exclusivamente à diminuição da contaminação no produto final passaram a ser consideradas e desenvolvidas. A desinfecção das carcaças de frango após o abate é uma delas. Estudos mostram que a aplicação de desinfetantes no processo de abate provoca uma redução da contaminação por *Salmonella* e outras bactérias (COPPEN; FENNER; SALVAT, 1998; SHEFET; SHELDON; KLAENHAMMER, 1995; RATHGEBER; WALDROUP, 1995; MULLERAT; KLAPES; SHELDON, 1994). Produtos comerciais e sistemas de aplicação do produto após o resfriamento têm sido desenvolvidos e aplicados. Os inconvenientes desta abordagem são que a mesma não garante a ausência de contaminação nas carcaças e, por ser uma ação executada dentro do abatedouro, não previne o aumento do nível de contaminação no processo de abate, principalmente nas etapas que antecedem a descontaminação.

1.5.4 Redução da *Salmonella* no pré-abate

Outra estratégia de ação que está se descortinando é a redução de *Salmonella* no período pré abate em órgãos que apresentam maior risco de contaminação às carcaças durante o processamento. O ceco é o órgão de eleição para isolamento das salmonelas, em especial para as salmonelas causadoras do Paratifo Aviário, e como fonte de infecção tem recebido a boa parte da atenção dos pesquisadores. Porém, Hargis *et al.* (1995) analisaram a persistência no ceco e inglúvio da *Salmonella* Enteritidis artificialmente inoculada em frangos de corte, assim como o percentual de contaminação de cecos e inglúvios no processo de abate e a ruptura destes dois órgãos na evisceração das carcaças, sugerindo que o inglúvio possa servir como importante fonte de contaminação das carcaças. No processo

de evisceração das carcaças, o intestino é normalmente retirado sem rompimento e sem que haja contato de seu conteúdo com a carcaça. O inglúvio, por sua vez, é puxado para fora pela espátula de evisceração que se fixa entre a moela e o pró-ventrículo, passando pelas cavidades da carcaça e permitindo que o conteúdo que houver neste órgão contamine as cavidades.

A retirada da ração dos frangos no período que antecede o abate é uma prática rotineira para permitir que o animal elimine o conteúdo do trato digestivo, buscando assim uma redução da contaminação das carcaças por este conteúdo. Este jejum que antecede ao abate tem influência na flora do trato digestivo. Segundo trabalho desenvolvido por Ramirez et al. (1997), a retirada da ração aumenta a incidência de *Salmonella* no inglúvio, reforçando as evidências da importância do mesmo na contaminação das carcaças. O aumento de incidência de *Salmonella* no inglúvio é acompanhado pelo decréscimo de ácido láctico e aumento do pH no inglúvio (CORRIER *et al.*, 1999). Apesar de observar uma redução na presença de Enterobacteriaceae e *Salmonella* Typhimurium em um período de 12 horas de jejum pré abate, Hinton, Buhr e Ingram (2000) conclui que a diminuição da presença de ácido láctico e o aumento do pH no inglúvio podem estar relacionados com a redução da atividade anti-Enterobacteriaceae do inglúvio durante o período de jejum. Barnhart *et al.* (1999a), estudando a administração de D-limonene e ácido cítrico para frangos durante o período de jejum pré abate, obtiveram resultados que indicam a possibilidade de uso de um desinfetante adequado no período de pré abate com objetivo de reduzir a presença de patógenos no inglúvio. No mesmo sentido, Barnhart et al. (1999b) concluem que a administração de 2,5% de lactose na água de bebida durante os últimos 5 a 11 dias antes do abate não apresenta benefícios para um programa de controle de *Salmonella* em condições comerciais.

1.5.5 Redução de *Salmonella* através da dieta

Também tem sido estudada a inclusão de ácidos graxos de cadeia curta na dieta das aves, tais como fórmico, propiônico, acético ou láctico, objetivando a diminuição do número de salmonelas antes do abate dos frangos. Esta prática pode resultar em uma redução significativa do número de enterobactérias (VAN DER WAL, 1980). A redução do pH e a presença de ácidos graxos voláteis inibem a colonização intestinal por *Salmonella*

(CORRIER *et al.*, 1990; ZIPRIN *et al.*, 1991). Experimentos usando ácidos graxos, todavia, têm apresentado resultados inconsistentes. Hinton, Linton e Perry (1985) não conseguiram isolar *Salmonella* após a aplicação de 0,5% ou 0,75% de ácido fórmico na dieta. McHan e Shotts (1992) e Izat *et al.* (1990), usando ácido fórmico ou ácido propiônico, conseguiram uma redução no número de salmonelas no intestino. Por outro lado, Hinton, Mead e Impey (1991), em outra ocasião, e Jones (1990), não conseguiram reduzir a colonização do intestino por *Salmonella*. Nestes trabalhos foram usados produtos comerciais contendo ácidos fórmicos e propiônico ou uma combinação destes.

1.5.6 Considerações gerais para o controle do Paratifo Aviário

Apesar do consumo de ração apresentar um grande potencial teórico como fonte de contaminação para as aves, nenhuma ligação convincente tem sido estabelecida entre a infecção de lotes de aves por SE e o consumo de ração contaminada (SILVA; DUARTE, 2002). A capacidade de transmissão vertical da SE, a grande susceptibilidade dos pintos no início de suas vidas, necessitando uma dose infectiva menor para que se estabeleça uma infecção (COX *et al.*, 1990) e a extensa capacidade de difusão da SE entre pintos dentro do mesmo nascedouro (BAILEY; CASON; COX, 1998), faz com que a contaminação dos progenitores com SE tenha um papel fundamental e preponderante na difusão da enfermidade nas granjas avícolas. Como corolário, tem-se que a ausência de SE nos plantéis de melhoramento genético, nos lotes de avós e nos lotes de matrizes é de importância vital em qualquer tentativa obter um produto final livre de SE.

A baixa especificidade aos hospedeiros das salmonelas causadoras de Paratifo Aviário e, conseqüentemente, a alta capacidade contaminar outras espécies animais presentes no ambiente avícola, faz com que a doença tenha a tendência de tornar-se endêmica nas granjas contaminadas, necessitando de medidas higiênicas rigorosas para erradicar a enfermidade destas granjas. Estas medidas, entre outras, incluem lavagem e desinfecção, eliminação de detritos, desratização, controle de insetos e outros vetores, vazio e isolamento sanitário.

As medidas de higiene e o alojamento de aves livres de SE são imprescindíveis para que qualquer programa de controle e erradicação de SE seja bem sucedido. Todavia, um sistema de produção de frangos, uma vez infectado com SE, normalmente terá diferentes

estratos comprometido e em diferentes níveis de infecção, demandando de outras ações complementares para o sucesso de um programa de controle e erradicação. Assim, medidas que visem à diminuição da pressão infectiva devem passar a ser consideradas, estudadas e desenvolvidas. No entanto, a grande maioria dos esforços técnico-científicos tem sido dedicada à análise de ações únicas de combate ao Paratifo Aviário. Como exceções a esta afirmação encontram-se os trabalhos de Methner *et al.* (1999), concluindo que o uso da combinação da vacinação viva e da flora competitiva, como parte integrante de um programa de controle, podem resultar em aumento considerável da proteção tanto para aves jovens como para aves adultas. Também nesse sentido o trabalho de Chambers e Lu (2002), que verificaram uma diminuição da colonização do ceco por SE em pintos tratados com Probiótico, concluindo, porém, que a vacinação maternal com uma bacterina não influenciou na colonização do ceco da progênie.

1.6 Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho é buscar avaliar a integração de medidas de controle do Paratifo Aviário que possam contribuir para a produção de frangos de corte livres de *Salmonella*. Para tanto, como objetivos específicos, em uma primeira etapa, avaliou-se o efeito de administração de água acidificada durante o jejum de pré-abate na recuperação de *Salmonella* Enteritidis do ingluvío de frangos de corte artificialmente contaminados, buscando estabelecer uma ferramenta de combate para ser usada em lotes de frangos de corte sabidamente contaminados. Este trabalho foi publicado na Revista Brasileira de Ciências Avícola em 2003. Em uma segunda etapa, procurou-se determinar a proteção proporcionada pela vacinação de matrizes de corte com uma vacina morta de *Salmonella* Enteritidis frente a um desafio artificial homólogo. Em uma etapa subsequente, avaliaram-se os efeitos da aplicação de uma flora de exclusão em pintos de corte oriundos de matrizes com diferentes condições imunológicas contra *Salmonella* Enteritidis, buscando-se determinar os efeitos diretos e a interação do uso destas duas medidas de combate. Paralelamente a esta etapa, avaliou-se o efeito da aplicação da *Salmonella* Gallinarum cepa 9R nos pintos de corte recém alojados e artificialmente contaminados sobre a recuperação de *Salmonella* Enteritidis do ceco e fígado destes pintos.

2 CAPÍTULO I

2.1 Efeito da Vacinação de Matrizes de Corte com uma Bacterina de *Salmonella* Enteritidis

Resumo

Foi avaliado o efeito da vacinação de matrizes de corte com uma bacterina de *Salmonella* Enteritidis (SE). Um lote de matrizes foi subdividido, um grupo recebeu a bacterina em duas doses via intramuscular e outro grupo foi vacinado com duas doses, a primeira via intraperitoneal e a segunda via intramuscular. Um terceiro grupo foi deixado como controle, sem vacinar. Na 31^a semana de idade, aves destes grupos foram desafiadas por contato através de 5% de aves infectadas via oral com $1,6 \times 9 \log_{10}$ de *Salmonella* Enteritidis. Três semanas após o início do desafio, não foram detectadas diferenças nos números de SE recuperadas do ceco e no número de cecos e fígados infectados por este agente. Os resultados podem estar afetados pelo sistema de infecção artificial por contato usado e pelo intervalo de tempo entre o início do desafio e as análises.

2.1.1 Introdução

Apesar das salmonelas responsáveis pelo Paratifo Aviário causarem uma infecção na maioria das vezes imperceptível em aves adultas, com pouco ou nenhum efeito deletério, a manutenção das matrizes livres desta infecção é de extrema importância para um programa de controle da doença. A importância da manutenção da condição de matrizes livres de salmonelas causadoras de Paratifo Aviário se prende ao fato de que a incubação de ovos contaminados leva a uma multiplicação destes agentes durante a incubação, bem como a uma difusão intensa durante a fase de eclosão, quando os pintos são altamente susceptíveis à infecção por *Salmonella* (BAILEY, COX; BERRANG, 1994), necessitando

uma dose infectiva menor para que a doença se estabeleça (COX *et al.*, 1990). Skov *et al.* (1999), em um estudo epidemiológico dos fatores de risco associado à presença de *Salmonella* Typhimurium em lotes de frango de corte, encontraram associação entre o risco e dois lotes de matrizes, um com infecção confirmada e outro suspeito de estar infectado por *Salmonella* Typhimurium. Os pintos de um dia de idade infectados por *Salmonella* podem permanecer portadores para o resto da vida, com a infecção aumentando durante períodos de estresse, especialmente na entrada de postura (GAST; HOLT, 1998; BERCHERI *et al.*, 2001). É importante salientar que estes pintos, após o crescimento e o abate, se transformarão em alimento com alta probabilidade de estar contaminado por *Salmonella* e, desta maneira, submeter o consumidor ao risco de uma toxinfecção alimentar.

Reconhecendo o potencial de contaminação das granjas de postura e o sucesso obtido pela indústria de frangos de corte no controle da *S. Enteritidis* (THE REPORT OF THE CHIEF VETERINARY OFFICER, 2001), o British Egg Industry Council passou exigir de seus membros a vacinação dos lotes em 1997 (ACMSF, 2001; BRITISH EGG INDUSTRY COUNCIL, 2002). Estudos demonstram que a imunização de aves com uma vacina morta tem um efeito redutor na infecção por *Salmonella* (GAST; STONE; HOLT, 1993; NAKAMURA *et al.*, 1994; LIU *et al.*, 2000; FEBERWEE *et al.*, 2001). Feberwee *et al.* (2000) concluem, a partir dos resultados de um experimento a campo, feito com lotes de matrizes de corte na Holanda, haver indicações de que a vacinação contribui com a redução da reinfecção dos lotes de matrizes por *Salmonella* Enteritidis. Em experimento a campo envolvendo 1,5 milhões de matrizes de corte imunizadas com duas aplicações de uma bacterina de SE durante dois ciclos de produção, conseguiu-se uma redução na detecção de *Salmonella* spp no mecônio de 11% para 0%. Nos lotes de frango de corte, essa redução foi de 12,3% para 4% (RICARDO A. SONCINI (2001), comunicação verbal). Já, Davison *et al.* (1999), estudando 11 lotes de aves poedeiras vacinadas com uma bacterina de *Salmonella* Enteritidis (SE), e usando como critério de avaliação a presença ou ausência de SE no ambiente, nos órgãos e ovos das aves, não conseguiu demonstrar um efeito positivo decorrente da vacinação.

Muir, Bryden e Husband (1998), avaliando a eficácia da imunização via intraperitonal na redução da infecção por *Salmonella* Typhimurium em frangos,

demonstram o potencial desta via de imunização, a qual conferiu uma proteção parcial contra a infecção e retardou o seu surgimento e difusão.

O objetivo primeiro deste experimento é avaliar o impacto da imunização com uma bacterina na proteção das aves matrizes contra um desafio por *Salmonella* Enteritidis. Propõe-se, ainda, a gerar pintos com diferentes condições de imunidade passiva para os experimentos que analisarão os efeitos destas condições e do emprego de uma flora de exclusão competitiva.

2.1.2 Materiais e Métodos

Aves

Um lote de matrizes da linhagem Ross foi subdividido em três grupos: 1) - Grupo IM - imunizado contra SE na 12^a e 16^a semanas de idade, via intramuscular; 2) – Grupo IP - imunizado contra SE na 12^a semana de idade via intraperitonal e na 16^a semanas de idade via intramuscular; 3) – Grupo CTL - não imunizado contra SE. A vacina usada em todas as imunizações foi a vacina comercial Bio-Enteritidis (Biovet, Vargem Grande Paulista, São Paulo, Brasil), produzida através de cultivo de *Salmonella* Enteritidis em meios de cultura semi-sintéticos e micro emulsionada em adjuvante oleoso. O lote de matriz de onde foram retiradas as aves foi avaliado no período de duração dos experimentos para ausência de *Salmonella spp* através do cultivo convencional de suabes de arrasto e de restos de incubação. A resposta imune deste lote de matrizes foi medida através da titulação dos anticorpos com ELISA (IDEXX Laboratories Inc., Westbrook, ME, EUA)^X na 34^a, 41^a, 53^a semanas de idade. Na 31^a semana de idade, 33 fêmeas e 3 machos de cada grupo foram transferidos para um aviário isolado e mantidos separados entre si, para serem submetidos a um desafio artificial por *Salmonella*.

Desafio

As aves foram expostas à infecção através do contato com aves semeadoras. Usou-se uma ave semeadora para cada cinco aves do experimento. Cada ave semeadora recebeu $1,6 \times 10^9$ unidades formadoras de colônia (ufc) de uma amostra de *Salmonella* Enteritidis resistente ao ácido nalidixico (SE NA^r), gentilmente cedida pelo Dr. Paul Barrow, AFRC Institute for Animal Health (Berkshire, Reino Unido), cultivada por 12 horas em caldo tripticase de soja (TBS) (Becton Dickinson/DIFCO, Sparks, MD, EUA). O número de unidades formadoras

de colônia (ufc) do inóculo foi determinado através da contagem do número de colônias nos cultivos de diluições seriadas em placas de ágar verde brilhante (Becton, Dickinson and Co., Franklin Lakes, NJ, EUA) contendo 40 µg/mL de novobiocina (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e 25 µg/mL de ácido nalidíxico (Sigma Aldrich) (BGA NO-NA). Esta amostra de *Salmonella* foi submetida a três passagens sucessivas por pintos de um dia de idade, oriundos de matrizes comprovadamente livres de *Salmonella sp.*, imediatamente antes da inoculação nas aves semeadoras. As inoculações para as passagens sucessivas foram feitas via oral e os re-isolamentos da bactéria dos fígados ocorreram 24 horas após as inoculações.

Coleta de órgãos e procedimentos laboratoriais

No 21º dia após o início do desafio por contato, 24 aves por grupo de tratamento foram sacrificadas por deslocamento cervical. De cada ave foram retirados asséptica e separadamente o fígado e o ceco, os quais foram colocados individualmente em sacos plásticos (Whirl-pac™, NASCO, Fort Atkinson, WI, EUA) identificados e, então, foram transportados para o laboratório. 10 mL de uma solução fisiológica de cloreto de sódio (0,85% de NaCl) foram colocados em cada saco, os quais foram imediatamente processados em um misturador Stomacher (Seward Medical, London, Inglaterra) durante 1 minuto. Uma alíquota de 1,0 mL desta mistura foi retirada, colocada em Caldo de Tetracionato (Merck, Darmstadt, Alemanha) e incubado a 42º Centígrados por 24 horas e, após, foram repicadas para placas com BGA NO-NA. Uma alíquota adicional de 0,5 mL da mistura foi diluída serialmente em tubos contendo 4,5 mL de solução fisiológica. Um volume de 0,10 mL de cada uma das diluições decimais foi distribuído na superfície de placas com BGA NO-NA. As placas com BGA NO-NA foram incubadas durante 24 horas a uma temperatura de 37º C, a partir do que as colônias típicas de SE foram identificadas e as ufc foram contadas. Algumas colônias foram confirmadas através dos testes bioquímicos de Uréia (Merck), Lisina (Merck), Tríplice Açúcar Ferro (Merck) e Indol (Laborclin, São José dos Pinhais, Paraná, Brasil).

Análise estatística

As diferenças nas matrizes com cecos ou fígados positivos para SE entre os grupos de tratamentos foram analisadas pelo teste chi-quadrado. As quantidades de SE recuperadas do

ceco foram transformadas em logaritmos e estão expressas em \log_{10} de ufc de SE. Estas quantidades foram analisadas através de Análise de Variância (PROC GLM) e a significância das comparações foi verificada através do Teste de Tukey. As diferenças foram consideradas como sendo significativas com base no nível de probabilidade de 5% ($p \leq 0,05$). Os cálculos estatísticos foram realizados através do sistema Minitab versão 14.1 (Minitab Inc., State College, PA, EUA).

2.1.3 Resultados e Discussão

Resposta Imune

As análises de anticorpos específicos contra SE através de ELISA nos soros das aves do lote doador de matrizes para os experimentos (Tabela 1) mostraram que os dois processos de vacinação foram eficientes em estabelecer títulos compatíveis com aves positivas para *Salmonella*. Por sua vez, as matrizes não vacinadas não apresentaram indícios sorológicos da doença. Não foi detectada a presença de *Salmonella spp.* nas monitorias de suabes de arrasto e cultivos de restos de incubação do lote doador, durante a execução dos experimentos.

Contagem de SE no ceco

Somente foi possível estimar o número de *Salmonella* Enteritidis no ceco em três aves, as demais aves não apresentaram um número suficiente de bactérias que fosse detectável pelo procedimento usado. Duas aves do Grupo IP apresentaram 28×10^4 e 4×10^4 ufc de SE, respectivamente. Enquanto que uma ave do Grupo IM apresentou 4×10^4 ufc de SE e de nenhuma ave do Grupo CTL foi possível estimar o número de SE no ceco. A falta de consistência nos resultados, onde foi possível fazer a contagem em somente 4,1 % das aves (3/72), leva à conclusão de não haver diferença entre os tratamentos usados, considerando as condições experimentais usadas neste estudo.

Tabela 1. Prova sorológica ELISA - Média \pm Erro Padrão dos valores^A de densidade ótica para os títulos de anticorpos contra *Salmonella* Enteritidis (SE) em matrizes^B submetidas à vacinação contra SE e seus controles .

Tratamentos	Idade da matriz (semana)		
	34 ^a	41 ^a	53 ^a
VAC-IM ^C	0,343 \pm 0,011	0,299 \pm 0,015	0,322 \pm 0,013
VAC-IP ^D	0,326 \pm 0,011	0,301 \pm 0,012	0,300 \pm 0,016
VAC-CTL ^E	0,766 \pm 0,034	0,809 \pm 0,036	0,791 \pm 0,026

^A Valores: Positivos < 0,60; ambíguos 0,60 – 0,74; negativo > 0,75. Os valores são inversamente proporcionais aos Títulos de anticorpos;

^B Foram testadas 36 matrizes por tratamento e idade;

^C Matrizes vacinadas contra SE através de duas doses via intramuscular;

^D Matrizes vacinadas contra SE primeira dose via intraperitoneal e segunda via intramuscular;

^E Matrizes não vacinadas contra SE.

Isolamento de SE no fígado e no ceco

De maneira semelhante conseguiu-se uma frequência relativamente baixa de isolamento de SE do ceco, 20,8% (15/72), e do fígado, 4,1% (3/72) das aves (Tabela 2). Esta baixa frequência pode estar relacionada ao intervalo de tempo de três semanas decorrido entre o desafio e as análises. Gast, Stone e Holt (1993), em dois experimentos, onde todas as aves foram desafiadas oralmente com SE, mostram haver uma queda expressiva do número de aves positivas para SE à medida que se afasta do desafio, obtendo uma frequência de aves positivas para SE de 65,2%, 28,4% e 3,1% para a 1^a, 2^a e 3^a semana após o desafio, respectivamente. Da mesma forma, Nakamura *et al.* (1994), em dois experimentos em que testaram a efetividade da vacinação de aves poedeiras com uma

bacterina de *Salmonella* Enteritidis, demonstraram haver uma grande redução na frequência da presença de SE nas fezes após três semanas do desafio individual das aves, mostrando, ainda, que as aves vacinadas deixaram de excretar SE nas fezes antes do que as aves não vacinadas. Esta redução da frequência de aves positivas com o passar do tempo pode estar relacionada à resistência natural da ave adulta ao estabelecimento de uma infecção expressiva por SE. Gast (1997) relata que infecções experimentais em aves adultas com altas doses de salmonelas causadoras de paratifo têm sido incapazes de produzir sinais clínicos da doença.

Tabela 2. Detecção de *Salmonella* Enteritidis (SE) nos cecos e fígados de matrizes de corte 21 dias após o desafio por contato. ^A

Tratamento	Ceco	Fígado	Total (%)
Grupo – IM ^B	3/24 (12,5)	1/24 (4,1)	4/48 (8,3)
Grupo – IP ^C	6/24 (25,0)	0/24 (0,0)	6/48 (12,5)
Grupo – CTL ^D	6/24 (25,0)	2/24 (8,3)	8/48 (16,6)
Total (%)	15/72 (20,8)	3/72 (4,1)	

^A – Número de amostras positivas para SE/Número de amostras examinadas – (%)

^B – Matrizes vacinadas contra SE através de duas doses via intramuscular.

^C – Matrizes vacinadas contra SE primeira dose via intraperitoneal e segunda via intramuscular.

^D – Matrizes não vacinadas contra SE.

As aves vacinadas contra SE, quando comparadas às aves não vacinadas, não apresentaram uma resistência superior contra a infecção artificial usada neste experimento. Esta conclusão pode decorrer do desafio por contato usado, como também do intervalo de tempo transcorrido entre o início deste desafio e as análises.

Referências

- ACMSF. Advisory Committee on the Microbiological Safety of Food; Second Report on *Salmonella* in eggs. **London: The Stationery Office**, p. 5-7, 2001.
- BAILEY, J.S.; COX, N.A.; BERRANG, M.E. Hatchery-Acquired *Salmonella* in Broiler Chicks. **Poultry Science**, v. 73, p. 1153-1157, 1994.
- BERCHIERI JR, A *et al.* Further studies on vertical transmission and persistence of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis phage type 4 in chickens. **Avian Pathology**, v. 30, p. 297-310, 2001.
- BRITISH EGG INDUSTRY COUNCIL. Lion Quality: Code of Practice for Lion Eggs. **London: BEIC Publications**, 2202.
- COX, N.A *et al.* Fifty percent colonization dose for *Salmonella thyphimurium* administrated orally and intracloacally to young broiler chicks. **Poultry Science**, v.69, p. 1809-1812, 1990.
- DAVISON, S. *et al.* Field observation with *Salmonella enteritidis* bacterins. **Avian Diseases**, v. 43, p. 664-669, 1999.
- FEBERWEE, A. *et al.* Results of a *Salmonella* Enteritidis vaccination field trial in broiler-breeder flocks in the Netherlands. **Avian Diseases**, v. 44, p. 249-255, 2000.
- FEBERWEE, A. *et al.* Vaccination against *Salmonella* Enteritidis in Dutch commercial layer flocks with a vaccine based on a live *Salmonella* Gallinarum 9R strain: evaluation of efficacy, safety and performance of serologic *Salmonella* tests. *Avian Diseases*, v.45, p. 83-91, 2001.
- GAST, R.K. Paratyphoid Infections. In: CALNEK, B.W. *et al.* **Diseases of poultry**. 10. ed. Ames: Iowa State University Press 1997. cap. 3, p. 97-121.
- GAST, R.K.; HOLT, P.S. Persistence of *Salmonella enteritidis* from one day of age until maturity in experimentally infected layer chickens. **Poultry Science**, v. 77, p. 1759-1762, 1998.
- GAST, R.K.; STONE, H.D.; HOLT, P.S. Evaluation of the efficacy of oil-emulsion bacterins for reducing fecal shedding of *Salmonella enteritidis* by laying hens. **Avian Diseases**, v. 37, p. 1085-1091, 1993.
- LIU, W. *et al.* Induction of humoral immune response and protective immunity in chickens against *Salmonella enteritidis* after a single dose of killed bacterium-loaded microspheres. **Avian Diseases**, v. 45, p. 797-806, 2001.

MUIR, W.I.; BRYDEN, W.L.; HUSBAND, A.J. Evaluation of the efficacy of intraperitoneal immunization in reducing *Salmonella typhimurium* infection in chickens. **Poultry Science**, v. 77, p. 1874-1883, 1998.

NAKAMURA, M. *et al.* Evaluation of the efficacy of a bacterins against *Salmonella enteritidis* and the effect of stress after vaccination. **Avian Diseases**, v. 38, p. 717-724, 1994.

SOKOV, M.N. *et al.* Risk Factors Associated with *Salmonella enterica* Serovar *typhimurium* Infection in Danish Broiler Flocks. **Poultry Science**, v. 78, p. 848-854, 1999.

THE REPORT of the Chief Veterinary Officer. Animal Health 2001. **London: DEFRA Publication**, 2001.

3 CAPÍTULO II

3.1 Efeito do Probiótico e Vacinação Maternal na Infecção por *Salmonella* Enteritidis nos Primeiros Dias de Pintos de Corte

Resumo

Foram investigados os efeitos dos tratamentos com Probiótico e com Vacinação Maternal sobre pintos de um dia de idade desafiados por contato com *Salmonella* Enteritidis. Os tratamentos foram combinados em um arranjo fatorial 3x2 (Probiótico e Controle versus matrizes vacinadas via intramuscular, vacinadas via intraperitoneal e Controle). O estudo foi feito através de três experimentos conduzidos em unidades de isoladores. Os experimentos se caracterizaram pelos desafios empregados (número de células de SE por pinto semeador / horas de intervalo entre o alojamento e o início do desafio), que foram de $1,6 \times 10^8$ / 1 hora, $1,8 \times 10^6$ / 12 horas e $1,2 \times 10^4$ / 24 horas, para os experimentos I, II e III respectivamente. Foram pesquisados os números de cecos e fígados positivos para SE no 3º, 5º e 7º dia após o início do desafio e o número de unidades formadoras de colônia (ufc) no ceco no 5º e 7º dia após o desafio. O uso de Probiótico causou uma redução no número de ufc de SE nos cecos de 0,56 log₁₀ e 1,45 log₁₀ nos Experimentos II e III, respectivamente. A maior redução no Experimento III demonstra a importância da antecipação do uso do Probiótico em relação ao início do desafio. O tratamento com Probiótico resultou em um menor número de fígados positivos para SE a partir do 5º dia após o início do desafio no Experimento III. Embora não se verificou um efeito significativo da vacinação maternal no número de ufc de SE no ceco, observou-se um efeito significativo da vacinação maternal na presença de SE no fígado dos pintos no quinto dia após o desafio.

3.1.1 Introdução

As salmonelas causadoras do Paratifo Aviário estão entre os principais outros agentes patogênicos originários do trato digestivo de animais utilizados como fonte de alimento que causam toxi-infecção alimentar em humanos, constituindo-se em uma constante preocupação para a indústria avícola (ANÔNIMO, 1988; RODRIGUES *et al.*, 1990; HUMPHREY, 1994; POPPE, 2000). Estas salmonelas podem ser isoladas de uma variedade extremamente ampla de espécies, incluindo o homem e outros mamíferos, aves, répteis e insetos. Henzler e Opitz (1992) isolaram *S. Enteritidis* em 24% dos camundongos capturados em granjas com aves contaminadas e não conseguiram isolamento em camundongos obtidos de granjas com aves livres de *Salmonella*. Kopanic, Sheldon e Wright (1994) isolaram *Salmonella* de baratas e Mcallister, Steelman e Skeeles (1994) apontam o cascudinho (*Alphitobius diaperinus*) como vetor biológico para *Salmonella* Typhimurium. A inter-relação entre este grande número de hospedeiros e os frangos de corte resulta em uma maior pressão infecciosa, reduzindo as chances de sucesso das tentativas de diminuição da prevalência da enfermidade. Portanto, um combate mais efetivo à esta enfermidade demanda medidas de controle em várias áreas. Uma destas medidas, a vacinação, na grande maioria dos estudos tem apresentado como resultado uma diminuição da colonização do intestino e da eliminação do agente nas fezes (SILVA *et al.*, 1981; CHARLES *et al.*, 1993; GAST *et al.*, 1993; NAKAMURA *et al.*, 1994; DAVISON *et al.*, 1999; CERQUETTI e GHERARDI, 2000), sem contudo prevenir a instalação da enfermidade. Porém, Ward *et al.*, 2000, atribuem a redução de casos de toxi-infecções alimentares por *S. Enteritidis* na Inglaterra e País de Gales, desde 1994, à vacinação contra este agente. Outra medida de controle empregada é o tratamento profilático com flora de exclusão competitiva, através da administração aos pintos de cultura de bactérias intestinais de aves adultas, buscando aumentar a resistência das aves à invasão e colonização por *Salmonella*. Esta exclusão competitiva, relatada pela primeira vez por Nurmi e Rantala (1973), tem sido amplamente estudada e mostra como resultado uma diminuição significativa da colonização do ceco por salmonelas sem, no entanto, impedir a instalação da infecção (SNOEYENBOS, WEINACK e SMYSER, 1977; RIGBY E PETTIT, 1980; SNOEYENBOS *et al.*, 1985; PALMU e CAMELIN, 1997). Em um experimento relatado por CORRIER *et al.* (1994b), a administração de cultura de exclusão competitiva

diretamente no papo de pintos recém eclodidos e desafiados 2 dias após com 10^4 células de *S. Enteritidis*, impediu a instalação da infecção por esta bactéria.

O propósito do presente estudo foi avaliar o efeito individual e o sinergismo da imunidade passiva contra *Salmonella* e da flora de exclusão competitiva na proteção de pintos de corte na primeira semana de vida contra a infecção intestinal e sistêmica por *Salmonella Enteritidis*.

3.1.2 Materiais E Métodos

Matrizes e Pintos

Um lote com 9.000 fêmeas matrizes da linhagem Ross foi subdividido em três grupos: 1) - Grupo imunizado contra SE na 12^a e 16^a semanas de idade, via intramuscular; 2) - Grupo imunizado contra SE na 12^a semana de idade via intraperitonal e na 16^a semanas de idade via intramuscular; 3) - Grupo não imunizado contra SE. A vacina usada em todas as imunizações foi a vacina comercial Bio-Enteritidis (Biovet, Vargem Grande Paulista, São Paulo, Brasil), produzida através de cultivo de *Salmonella Enteritidis* em meios de cultura semi-sintéticos, inativada e micro emulsionada em adjuvante oleoso. Os pintos para os experimentos, independentes de sexo, foram obtidos destes grupos de matrizes nas idades de 45, 46 e 56 semanas, constituindo as Categorias de Vacinação Maternal: VAC-IM – pintos oriundos das matrizes que receberam duas doses de vacina via intramuscular; VAC-IP – pintos oriundos de matrizes que receberam a primeira dose via intraperitonal e a segunda dose via intramuscular; VAC-CTL – pintos oriundos de matrizes não vacinadas contra SE. As matrizes foram avaliadas durante a duração dos experimentos para ausência de *Salmonella spp*, através do cultivo convencional de suabes de arrasto e de restos de incubação. A resposta imune das matrizes foi medida através da titulação dos anticorpos com ELISA (IDEXX Laboratories, Inc., Westbrook, ME, EUA) na 34^a, 41^a, 53^a semanas de idades.

Tratamento com Probiótico

As aplicações do Probiótico (Bio Camp Laboratórios Ltda, Campinas, São Paulo, Brasil) foram feitas através de pulverização de 0,2 mL do produto, diluído 1:20 em solução fisiológica de NaCl 0,85%, em gotas grossas sobre os pintos no momento dos alojamentos, constituindo-se os Grupos PRO-TRA. Os grupos testemunhas (PRO-CTL) receberam na mesma ocasião o mesmo volume de solução fisiológica sem a adição de probiótico.

Desafios e Experimentos

Os desafios foram feitos através do contato entre pintos dos experimentos com os pintos semeadores. Os semeadores foram inoculados 3 horas após dos nascedouros por via oral, com 0,2 mL de uma diluição de culturas de 12 horas em caldo tripticase de soja (TBS) (DIFCO, Sparks, MD, EUA) de uma amostra de *Salmonella* Enteritidis resistente ao ácido nalidixico (SE NA^r), gentilmente cedida pelo Dr. Paul Barrow, AFRC Institute for Animal Health (Berkshire, Reino Unido). Foi utilizada a proporção de 1 pinto semeador para cada 5 pintos não inoculados. O número de unidades formadoras de colônia (ufc) dos inóculos foi determinado através da contagem do número de colônias nos cultivos de diluições seriadas em placas de ágar verde brilhante (Becton, Dickinson and Co., Franklin Lakes, NJ, EUA) contendo 40 µg/mL de novobiocina (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e 25 µg/mL de ácido nalidixico (Sigma Aldrich) (BGA NO-NA).

Este estudo constituiu-se de três experimentos com variações na quantidade de *Salmonella* usada para inocular pintos semeadores e no intervalo entre o alojamento e o início do desafio pela colocação dos pintos semeadores em contato com as demais aves. Os alojamentos dos pintos ocorreram 3 horas após as retiradas destes pintos dos nascedouros. No Experimento I os pintos semeadores foram inoculados com $1,6 \times 10^8$ ufc de SE e foram colocados em contato com os demais pintos do experimento 1 hora após o alojamento. No Experimento II, a dose infectante inoculada nos pintos semeadores foi de $1,8 \times 10^6$ ufc de SE e o contato com os pintos do experimento iniciou-se 12 horas após o alojamento. No Experimento III o número de ufc de SE inoculado nos pintos semeadores foi de $1,2 \times 10^4$ e o contato com os demais pintos iniciou-se 24 horas após o alojamento. Os experimentos com suas variações estão resumidos na Tabela 1.

Tabela 1. Diferenças entre os três experimentos no número de unidades formadoras de colônias (ufc) de SE inoculadas por pinto semeador e no intervalo entre o alojamento e o início do desafio por contato.

Item	Experimento I	Experimento II	Experimento III
Ufc de SE	$1,6 \times 10^8$	$1,8 \times 10^6$	$1,2 \times 10^4$
Intervalo de tempo	1 hora	12 horas	24 horas

Coleta de Órgãos e Procedimentos Laboratoriais

De cada arranjo fatorial, foram sacrificadas seis pintos no 3^o, 5^o e 7^o dia após desafio, por deslocamento cervical. De cada ave foram retirados asséptica e separadamente o fígado e o ceco, os quais foram colocados individualmente em sacos plásticos (WhirlpacTM, NASCO, Fort Atkinson, WI, EUA) identificados e, então, foram transportados para o laboratório. Em cada saco, foi colocado 10 mL de uma solução fisiológica de cloreto de sódio (0,85%) e, imediatamente, os sacos foram processados em um misturador Stomacher (Seward Medical, Londres, Inglaterra) durante 1 minuto. Uma alíquota de 1,0 mL desta mistura foi retirada e colocada em Caldo de Tetrionato (Merck, Darmstadt, Alemanha) e incubado a 42^o Centígrados por 24 horas e, após, foram repicadas para placas com BGA NO-NA. Nos Experimentos II e III e para os Cecos das coletas do 5^o e 7^o dia, retirou-se uma alíquota adicional de 0,5 mL da mistura e diluiu-se serialmente em tubos contendo 4,5 mL de solução fisiológica. Um volume de 0,10 mL de cada uma das diluições decimais foi distribuído na superfície de placas com BGA NO-NA. As placas com BGA NO-NA foram incubadas durante 24 horas a uma temperatura de 37^o C, a partir do que as colônias típicas de SE foram identificadas e as ufc foram contadas. Algumas colônias foram confirmadas através dos testes bioquímicos de Uréia (Merck), Lisina (Merck), Tríplice Açúcar Ferro (Merck) e Indol (Laborclin, São José dos Pinhais, Paraná, Brasil).

Desenho Experimental

Em cada experimento, os tratamentos foram distribuídos de maneira a formar um arranjo fatorial (3 x 2) entre os fatores categorias de Vacinação Maternal (VAC-IM, VAC-IP e VAC-CTL) e categorias de Probiótico (PRO-TRA e PRO-CTL). Assim, para cada categoria de Probiótico, vinte pintos de cada categoria de Vacinação Maternal foram identificados individualmente e alojados em uma unidade de isolamento de aço inoxidável para então receberem o tratamento.

Análise Estatística

As diferenças nos números de pintos com cecos ou fígados positivos para SE entre os grupos de tratamentos, experimentos, intervalos entre o desafio e a análise e suas interações foram analisadas pelo teste chi-quadrado e regressão logística. As quantidades de SE recuperadas do ceco foram transformadas em logaritmos e estão expressas em \log_{10} de ufc de SE. Estas quantidades foram analisadas através de Análise de Variância (PROC GLM) e a significância das comparações foi verificada através do Teste de Tukey. Em uma primeira análise foram consideradas todas as interações possíveis. Posteriormente, as interações não significativas foram omitidas das análises, resultando o modelo: Variável = média da variável + experimentos + intervalos + vacinação maternal + probiótico + (probiótico x experimentos) + erro experimental. As diferenças foram consideradas como sendo significativas com base no nível de probabilidade de 5% ($p \leq 0,05$). Os cálculos estatísticos foram realizados através do sistema Minitab Statistical Software versão 14.1 (Minitab Inc., State College, PA, EUA).

3.1.3 Resultados E Discussão

A contaminação através do contato com aves inoculadas via oral foi suficiente para provocar a colonização dos cecos de todas os pintos examinados nos dois primeiros experimentos, independente dos demais fatores. A grande difusão da doença nestes três experimentos, onde aproximadamente todas as aves tornaram-se positivas após sete dias do desafio por contato, contrasta com resultados de experimento conduzido em baias (dados

não publicados) com pintos de um dia de idade submetidos ao mesmo desafio, dos quais foram isolados SE de 60% (12/20) dos cecos e de apenas 20% (4/20) de fígados após sete dias ao desafio. Estes achados sugerem que o maior nível de desafio ocorrido nestes experimentos possa ser devido às condições ambientais dos isoladores.

Vacinação Maternal

As análises de anticorpos específicos contra SE através de ELISA nos soros das matrizes envolvidas nos experimentos (Tabela 2) mostraram que os dois processos de vacinação foram eficientes em estabelecer títulos compatíveis com aves positivas para *Salmonella*. Por sua vez, as matrizes não vacinadas não apresentaram indícios sorológicos da doença.

Tabela 2. Prova sorológica ELISA - Média \pm Erro Padrão dos valores^A de densidade ótica para os títulos de anticorpos contra *Salmonella* Enteritidis (SE) em matrizes^B submetidas à vacinação contra SE e seus controles.

Tratamentos	Idade da matriz (semana)		
	34 ^a	41 ^a	53 ^a
VAC-IM ^C	0,343 \pm 0,011	0,299 \pm 0,015	0,322 \pm 0,013
VAC-IP ^D	0,326 \pm 0,011	0,301 \pm 0,012	0,300 \pm 0,016
VAC-CTL ^E	0,766 \pm 0,034	0,809 \pm 0,036	0,791 \pm 0,026

^A Valores: Positivos < 0,60; ambíguos 0,60 – 0,74; negativo > 0,75. Os valores são inversamente proporcionais aos Títulos de anticorpos;

^B Foram testadas 36 matrizes por tratamento e idade;

^C Matrizes vacinadas contra SE através de duas doses via intramuscular;

^D Matrizes vacinadas contra SE primeira dose via intraperitoneal e segunda via intramuscular;

^E Matrizes não vacinadas contra SE.

Isolamento de *Salmonella* Enteritidis do ceco

Nos Experimentos I e II, foram isoladas SE dos cecos de todos os pintos, de todos os tratamentos, nos três intervalos. Enquanto que, na coleta do terceiro dia após o desafio do Experimento III (Tabela 3), o grupo controle apresentou 100% (18/18) de suas aves com SE no ceco, enquanto que o grupo tratado com probiótico apresentou 38,9% (7/18), indicando ter havido alguma ação do probiótico. Já nas coletas de 5 e 7 dias após o tratamento, praticamente foram isoladas SE de todos os pintos dos diferentes tratamentos, indicando que o desafio foi grande o suficiente para suplantar algum possível efeito de proteção do ceco à colonização por SE dada pela instalação de uma flora competitiva. Os resultados obtidos estão de acordo com os achados de Snoeyenbos *et al.* (1985) que indicam que a aplicação de uma flora competitiva limita, porém não impede a infecção por *Salmonella*.

Tabela 3. Experimento III - Detecção de *Salmonella* Enteritidis (SE) nos cecos de pintos desafiados por contato 24 horas após o tratamento com Probiótico, ^A

TRATAMENTOS	3º Dia ^B		5º Dia ^B		7º Dia ^B		TOTAL (%)
	PRO-TRA ^C	PRO-CTL ^D	PRO-TRA ^C	PRO-CTL ^D	PRO-TRA ^C	PRO-CTL ^D	
VAC-IM ^E	2/6	6/6	5/6	6/6	6/6	6/6	31/36 (86,1)
VAC-IP ^F	4/6	6/6	6/6	6/6	5/6	6/6	33/36 (91,6)
VAC-CTL ^G	1/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	31/36 (86,1)
Total (%)	7/18 (38,8)	18/18 (100)	17/18 (94,4)	18/18 (100)	17/18 (94,4)	18/18 (100)	95/108 (87,9)

^A – Número de amostras positivas para SE/Número de amostras examinadas – (%)

^B – Dia após o início do desafio.

^C – Grupos tratados com Probiótico no primeiro dia de Idade.

^D – Grupos sem tratamento com Probiótico.

^E – Grupos compostos de pintos oriundos de matrizes vacinadas contra SE através de duas doses via intramuscular.

^F – Grupos compostos de pintos oriundos de matrizes vacinadas contra SE primeira dose via intraperitoneal e segunda via intramuscular.

^G – Grupos compostos de pintos oriundos de matrizes não vacinadas contra SE.

Número de *Salmonella* Enteritidis no Ceco

Os resultados da ANOVA do número de ufc de SE no ceco de pintos estão apresentados na Tabela 4, onde se observa a significância do Intervalo entre o desafio e a análise sobre o número de ufc no ceco. Também mostra a ocorrência de uma interação significativa entre os fatores Experimento e Probiótico. A interação é melhor observada na Tabela 5, que mostra que as aves tratadas com Probiótico tiveram uma redução de ufc de SE no ceco ($0,56 \text{ Log}_{10}$ e $1,45 \text{ Log}_{10}$, nos experimentos II e III respectivamente) em comparação aos grupos controles. Quando as comparações são feitas entre os experimentos II e III, os grupos que receberam o tratamento com Probiótico tiveram uma redução significativa de $0,86 \text{ Log}_{10}$ ($7,03 \text{ Log}_{10}$ para $6,17 \text{ Log}_{10}$, experimentos II e III respectivamente) de ufc de SE no ceco. E, quando a mesma comparação é feita entre os grupos que não receberam probiótico, praticamente os resultados não se alteram ($7,59 \text{ Log}_{10}$ e $7,62 \text{ Log}_{10}$ ufc de SE no ceco, para os experimentos II e III respectivamente). Esta interação indica a importância de ter-se a flora do probiótico estabelecida antes que ocorra o desafio por SE e, portanto, reforça a necessidade do controle da SE no incubatório para se ter um efeito positivo do tratamento com probiótico, o que está em conformidade com os resultados obtidos por Bailey *et al.* (1998). A redução ocorrida no experimento III foi semelhante aos resultados obtidos por Chambers e Lu (2002), que indicam uma redução da ordem de aproximadamente $1,5 \text{ log}_{10}$ no número de ufc obtidos do ceco de frangos de corte tratados com probiótico ao nascimento e desafiados por contato através de aves semeadoras, três dias após receberem o tratamento com probiótico.

Na Tabela 6, observa-se que houve um aumento significativo de $0,73 \text{ Log}_{10}$ (de $6,74 \text{ Log}_{10}$ para $7,47 \text{ Log}_{10}$) no número de SE nos cecos entre a análise do 5º e 7º dia após o início do desafio, indicando que no 7º dia após o início do desafio, a infecção ainda está progredindo.

Tabela 4. ANOVA da contagem de *Salmonella* Enteritidis (Log_{10}) no ceco de pintos com diferentes intervalos^A de dias após início dos desafios^B por contato para os diferentes tratamentos de Probiótico^C e de Vacinação Maternal^D.

Fonte	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F	Probabilidade
Experimentos	1	6,312	4,96	0,028
Intervalos	1	19,002	14,93	0,000
Probiótico	1	36,005	28,30	0,000
Vacinação Maternal	2	0,377	0,30	0,744
Experimento x Probiótico	1	7,174	5,64	0,019
Erro Experimental	137	1,272		

^A Análise com intervalos de 5 e 7 dias após o início do desafio por contato

^B Desafio por contato com pintos inoculados com $1,8 \times 10^6$ e $1,2 \times 10^4$ SE, doze e vinte e quatro horas após o alojamento, respectivamente Experimentos II e III.

^C Tratamento com e sem Probiótico no alojamento

^D Pintos oriundos de matrizes vacinadas com duas doses via intramuscular, de matrizes vacinadas com a primeira dose intraperitoneal e a segunda Intramuscular e de matrizes não vacinadas.

Não foram observados efeitos da Vacinação Maternal no número de cecos colonizados por SE e no número de ufc de SE no ceco (Tabela 6), já que a principal ação da resposta imune neste órgão é dada pela secreção de anticorpos no seu lume a partir da estimulação local pelo antígeno, o que não ocorreu neste estudo. Isto está em conformidade com os achados de Chambers e Lu (2002), que não encontraram diferença no número de bactérias isoladas em cecos de pintos oriundos de aves vacinadas em comparação aos de pintos oriundos de aves não vacinadas.

Tabela 5. Média e erro padrão (EP) do número unidades formadoras de colônias (ufc) de *Salmonella* Enteritidis no ceco de pintos das categorias de Experimento e Probiótico.

Categorias	Média ± EP (Log ₁₀) ¹	
	Experimento II ²	Experimento III ²
Probiótico ³	7,03 ^{A,a} ± 0,20	6,17 ^{A,b} ± 0,23
Controle ³	7,59 ^{B,c} ± 0,17	7,62 ^{B,c} ± 0,18

¹ Letras maiúsculas diferentes dentro da mesma coluna indicam diferença estatística ($p < 0,05$), dentro da coluna. Letras minúsculas diferentes dentro da mesma linha indicam diferença estatística ($p < 0,05$), dentro da linha.

² Desafio por contato com pintos inoculados com $1,8 \times 10^6$ e $1,2 \times 10^4$ SE, doze e vinte e quatro horas após o alojamento, respectivamente nos Experimentos II e III; n = 36.

³ Pintos tratados com probióticos (Probiótico) ou com solução fisiológica (Controle) no alojamento; n = 36.

Isolamento de *Salmonella* Enteritidis do fígado

Através da pesquisa de SE no fígado, procurou-se avaliar a influência que os fatores e tratamentos têm sobre a capacidade da bactéria provocar uma infecção sistêmica. As informações do número de detecção de SE no fígado de pintos estão apresentadas na Tabela 7. Observam-se diferenças significativas entre os três experimentos no número de fígados positivos para SE 95,4% (103/108), 60,2% (65/108) e 44,4% (48/108) para os Experimentos I, II e III respectivamente.

Tabela 6. Média e erro padrão (EP) do número unidades formadoras de colônias (ufc) de *Salmonella* Enteritidis, no ceco de pintos no 5º e 7º dia após o desafio por contato e submetidos aos tipos de Vacinação Maternal, nos experimentos^A II e III.

Categories	Média ± EP (Log ₁₀) ^B
Intervalo ^C	
5º dia	6,74 ^a ± 0,18
7º dia	7,47 ^b ± 0,10
Tipos de Vacinação Maternal ^D	
Matrizes Vacinadas Intramuscular	7,16 ^c ± 0,19
Matrizes Vacinadas Intraperitonal	7,00 ^c ± 0,19
Matrizes não Vacinadas	7,15 ^c ± 0,18

^A Pintos semeadores inoculados com $1,8 \times 10^6$ e $1,2 \times 10^4$ ufc de SE, doze e vinte e quatro horas após o alojamento, respectivamente Experimentos II e III.

^B Letras diferentes dentro da mesma coluna e da mesma categoria indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

^C Intervalos: Análise feita no 5º e 7º após o início do desafio por contato; $n = 72$.

^D Pintos oriundos de matrizes vacinadas com duas doses via intramuscular, de matrizes vacinadas com a primeira dose intraperitonal e a segunda Intramuscular e de matrizes não vacinadas; $n = 48$.

As aves do Experimento I, desafiadas por contato com aves inoculadas com $1,6 \times 10^8$ ufc de SE iniciado uma hora após o alojamento, desenvolveram infecção sistêmica rapidamente. No terceiro dia após o desafio já apresentavam 86,1% (31/36) pintos com isolamento de SE no fígado e, no exame do quinto e sétimo dia, todas aves tornaram-se positivas. Já nos Experimentos II e III, com o desafio iniciado 12 e 24 horas após o alojamento e, respectivamente, com inoculação de $1,8 \times 10^6$ e $1,2 \times 10^4$ ufc de SE por ave semeadora, a difusão da forma sistêmica da doença ocorreu de maneira menos rápida. Porém, igualmente atingiu elevados níveis na análise do sétimo dia pós-desafio (97,2% e 77,7% nos Experimentos II e III, respectivamente), indicando que a velocidade do estabelecimento da infecção sistêmica está na dependência da dose infectante usada nas aves semeadoras, o que reflete a pressão infectiva local, concomitante com o intervalo de tempo ocorrido entre o alojamento e o início do desafio. Por outro lado não foi possível separar a influência da dose infectante e do intervalo de tempo em função destes dois fatores estarem confundidos no desenho experimental usado.

Tabela 7. Experimentos I, II e III - Detecção de SE no fígado de pintos desafiados por contato após o tratamento com Probiótico,^A

TRATAM ENTOS	3º Dia ^B		5º Dia ^B		7º Dia ^B		TOTAL (%)
	PRO- TRA ^C	PRO- CTL ^D	PRO- TRA ^C	PRO- CTL ^D	PRO- TRA ^C	PRO- CTL ^D	
EXPERIMENTO I ^H							
VAC-IM ^E	5/6	3/6	6/6	6/6	6/6	6/6	32//36 (88,8)
VAC-IP ^F	5/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	35/36 (97,2)
VAC- CTL ^G	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	36/36 (100)
Total (%)	16/18 (88,8)	15/18 (83,3)	18/18 (100)	18/18 (100)	18/18 (100)	18/18 (100)	103/108 (95,3)
EXPERIMENTO II ^I							
VAC-IM ^E	0/6	1/6	3/6	6/6	6/6	6/6	22//36 (61,1)
VAC-IP ^F	0/6	0/6	3/6	4/6	6/6	5/6	18/36 (50,0)
VAC- CTL ^G	2/6	1/6	4/6	6/6	6/6	6/6	25/36 (69,4)
Total (%)	2/18 (11,1)	2/18 (11,1)	10/18 (55,5)	16/18 (88,8)	18/18 (100)	17/18 (94,4)	65/108 (60,1)
EXPERIMENTO III ^J							
VAC-IM ^E	0/6	1/6	0/6	6/6	3/6	6/6	16//36 (44,4)
VAC-IP ^F	0/6	0/6	3/6	1/6	3/6	5/6	12/36 (33,3)
VAC- CTL ^G	1/6	2/6	0/6	6/6	5/6	6/6	20/36 (55,5)
Total (%)	1/18 (5,5)	3/18 (16,6)	3/18 (16,6)	13/18 (72,2)	11/18 (61,1)	17/18 (94,4)	48/108 (44,4)

^A – Número de amostras positivas para SE/Número de amostras examinadas.

^B – Dia após o início do desafio.

^C – Grupos tratados com Probiótico no primeiro dia de Idade.

^D – Grupos sem tratamento com Probiótico.

^E – Grupos compostos de pintos oriundos de matrizes vacinadas contra SE via intra-muscular.

^F – Grupos compostos de pintos oriundos de matrizes vacinadas contra SE via intra-peritoneal.

^G – Grupos compostos de pintos oriundos de matrizes não vacinadas contra SE.

^H – Experimento I – Desafio por contato a partir de uma hora após o tratamento com pintos inoculados com $1,6 \times 10^8$ ufc de SE.

^I – Experimento II – Desafio por contato a partir de doze horas após o tratamento com pintos inoculados com $1,8 \times 10^6$ ufc de SE.

^J – Experimento III – Desafio por contato a partir de vinte e quatro horas após o tratamento com pintos inoculados com $1,2 \times 10^4$ ufc de SE.

O tratamento com Probiótico provocou uma redução significativa no número de fígados positivos para SE no Experimento III, refletindo a importância do retardamento da exposição das aves ao desafio e/ou a dose deste desafio para que haja tempo suficiente para o estabelecimento da flora competitiva. Neste Experimento, o efeito não se manifestou na análise do 3º dia após início do desafio, tornando-se significativo no 5º dia, com positividade de 16,7% (3/18) e 72,2% (13/18) para os tratamentos de Probiótico e Controle, respectivamente. O mesmo permanece visível na análise do 7º dia após o desafio, onde 61,1% (11/18) das aves tratadas com Probiótico tiveram SE detectadas no fígado enquanto que as aves testemunhas tiveram 94,4% (17/18).

Nos Experimentos II e III, observa-se o efeito significativo da Vacinação Maternal na análise do 5º dia após o início do desafio dos pintos que não foram tratados com probiótico. Neste caso os pintos oriundos de matrizes vacinadas via intra peritonal tiveram 41,7% (5/12) fígados positivos para SE, enquanto que os pintos controle e oriundos de matrizes vacinadas via intramuscular tiveram 100% (12/12). Os pintos VAC-IP tiveram aproximadamente a mesma redução de positividade dos que foram tratados com probiótico, indicando que o efeito da imunidade passiva gerada pela vacinação não se somou à proteção gerada pelo tratamento com Probiótico. Mais pesquisas são necessárias para explicar esta interação ocorrida entre o tratamento com Probiótico e Vacinação Maternal. Já na análise do 7º dia após o desafio não ocorreu um efeito significativo detectável da Vacinação Maternal, provavelmente devido à menor disponibilidade de anticorpos passivos para fazer frente ao desafio.

Observando-se a dinâmica de evolução da doença nos grupos denota-se um aumento significativo da positividade, independentemente dos tratamentos usados. Análises além do 7º dia após o início do desafio poderiam indicar o impacto dos tratamentos na progressão da enfermidade, tanto no que se refere a um possível aumento da positividade, para sua

forma sistêmica nos grupos tratados com Probióticos do experimento III, quanto a provável recuperação das aves da forma intestinal e sistêmica da doença.

Estes resultados reforçam a idéia de que o uso de uma associação de medidas de prevenção (no presente estudo, probiótico e vacinação das matrizes) podem ser de grande valor na redução da presença de *Salmonella* nas diversas etapas da cadeia de produção avícola.

Referências

- ANÔNIMO. Salmonellosis control: the role of animal and product hygiene. Relatório do Comitê de Especialistas da Organização Mundial da Saúde. Série de Relatórios Técnicos número 774. Geneva, Suíça. 1988.
- BAILEY, J.S.; CASON, J.A.; COX, N.A. Effect of *Salmonella* in Young Chicks on Competitive Exclusion Treatment. **Poultry Science**, v. 77, p. 394-399, 1998.
- CERQUETTI, M. C.; GHERARDI, M. M. Orally administered attenuated *Salmonella enteritidis* reduces chicken cecal carriage of virulent *Salmonella* challenge organisms. **Veterinary Microbiology**, v. 76, p.185-192, 2000.
- CHAMBERS, J.R.; LU, X. Probiotics and Maternal Vaccination for *Salmonella* Control in Broiler Chickens. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 11, p. 320-327, 2002.
- CHARLES, S. D.; NAGAJARA, K. V.; SIVANANDAN, V. A Lipid-conjugated immunostimulating complex subunit vaccine against *Salmonella* infection in turkeys. **Avian Diseases**, v. 37, p. 477-484, 1993.
- CORRIER, D.E. *et al.* Competitive exclusion of *Salmonella enteritidis* in leghorn chicks: Comparison of treatment by crop gavage, drinking water, spray, or lyophilized alginate beads. **Avian Diseases**, v. 38, p. 297-303, 1994.
- DAVISON, S. *et al.* Field observations with *Salmonella enteritidis* bacterins. **Avian Diseases**, v. 43, p. 664-669, 1999.
- GAST, R. K., STONE, H. D.; HOLT, P. S. Evaluation of the efficacy of oil-emulsion bacterins for reducing fecal shedding of *Salmonella enteritidis* by laying hens. **Avian Diseases**, v. 37, p. 1085-1091, 1993.
- HENZLER D.J.; OPITZ H.M. The role of mice in the epizootiology of *Salmonella* Enteritidis infection on chicken layer farm. **Avian Diseases**, p. 36, v. 625-631, 1992.
- HUMPHREY, T.J. Contamination of egg shell and contents with *Salmonella* Enteritidis: a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 21, p.31-40, 1994.
- KOPANIC R.J. JR; SHELDON B.W.; WRIGHT C.G. Cockroaches as vectors of *Salmonella*: Laboratory and field trials. **Journal of Food Protection**, v. 57, p.125-132, 1994.
- MCALLISTER J.C.; STEELMAN C.D.; SKEELES J.K. Reservoir competence of the lesser mealworm (Coleptera: Tenebrionidae) for *Salmonella* Typhimurium (Eubacteriales: Enterobacteriaceae). **Journal of Medical Entomology**, v. 31, p. 369-372, 1994.

- NAKAMURA, M. *et al.* Evaluation of the efficacy of a bacterin against *Salmonella enteritidis* infection and the effect of stress after vaccination. **Avian Diseases**, v. 38, p. 717-724, 1994.
- NURMI, E.; RANTALA, M. New aspects of *Salmonella* infection in broiler production. **Nature**, v. 241, p. 210-211, 1973.
- POPPE, C. *Salmonella* infections in domestic fowl. In: C. Wray & A. Wray, **Salmonella in Domestic Animals**. Wallingford: CABI Publishing. 2000.
- RIGBY, C. E.; PETTIT, J. R. Observation on competitive exclusion for preventing *Salmonella typhimurium* infection of broiler chickes. **Avian Diseases**, v. 24, p. 604-615, 1980.
- RODRIGUE, D.C.; TAUXE, R.V.; ROWE, B. International increase in *Salmonella enteritidis*: A new pandemic? **Epidemiology and Infection**, v. 105, p. 21-27, 1990.
- SILVA, E. N. *et al.* Studies on the use of 9R Strain of *Salmonella gallinarum* as vaccine in chickens. **Avian Diseases**, v. 25, p. 38-52, 1981.
- SNOEYENBOS, G. H.; WEINACK, O. M.; SMYSER, C. F. Protecting chicks and poults from *Salmonella* by oral administration of "normal" gut microflora . **Avian Diseases**, v. 22, p. 273-287, 1977.
- SNOEYENBOS, G. H *et al.* Large-scale trials to study competitive exclusion of *Salmonella* in chickens. **Avian Diseases**, v. 29, p. 1004-1011, 1985.
- WARD, L.R. *et al.* *Salmonella enteritidis* epidemic. **Science**, v. 287, p. 1754, 2000.

3.2 Effects of Probiotics and Maternal Vaccination on Infection Caused by *Salmonella* Enteritidis in Broiler Chicks

L. A. F. Avila, V. P. Nascimento, C. T. P. Salle e H. L. S. Moraes

Affiliation: Centre for Diagnostics and Research in Avian Pathology (CDPA), Faculty of Veterinary Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul. Address: Av. Bento Goncalves 8824, Porto Alegre, CEP 91540-000, Rio Grande do Sul, Brazil.

<http://www.ufrgs.br/ppgcv/cdpa>.

Key words: *Salmonella* Enteritidis, probiotics, maternal vaccination, broilers.

Abbreviations: BGA NO-NA = Brilliant Green Agar supplemented with 40 µg/mL of novobiocin and 25 µg/ml of nalidixic acid; CFU = colony-forming units; ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay; NaCl = Sodium chloride; PRO-CTL = control groups for the probiotics treatment; PRO-TRA = groups of probiotics treatment; SE = *Salmonella* Enteritidis; VAC-CTL = groups of chicks from breeders non-vaccinated against *Salmonella* Enteritidis; VAC-IM = groups of chicks from breeders vaccinated against *Salmonella* Enteritidis twice intramuscularly; VAC-IP = groups of chicks from breeders given intraperitoneal vaccine in the first immunization and intramuscular in the second immunization.

Summary

The effects of probiotics and maternal vaccination on day-old chicks challenged with *Salmonella* Enteritidis (SE) were evaluated. A 2 x 3 factorial arrangement was used (with or without probiotics; breeders non-vaccinated, vaccinated intramuscularly or vaccinated intraperitoneally). Three trials were conducted in isolation cabinets and SE challenge was different between trials. The number of SE organisms per inoculated chick and the time interval between housing and introduction of seeder birds (hereafter called challenge) were 1.6×10^8 and 1 hour (Trial I), 1.8×10^6 and 12 hours (Trial II), and $1.2 \times$

10^4 and 24 hours (Trial III). SE recovery was assessed in ceca and liver at 3, 5 and 7 days post challenge, and the number of colony forming unities (CFU) in ceca was evaluated at 5 and 7 days post challenge. The number of SE (Log CFU) in the ceca reduced 0.56 and 1.45 due to the treatment with probiotics in Trials II and III, respectively. The greater reduction in Trial III indicates the importance of the early use of probiotics on the prevention of SE infection. Treatment with probiotics resulted in a smaller number of SE-positive livers after 5 days post-challenge on Trial III. Although there was no significant effect of maternal vaccination on the number of SE CFU in the ceca, a significant effect of maternal vaccination in the presence of SE in chicks' livers was observed at 5 days after challenge.

3.2.1 Introduction

Salmonellae that cause paratyphoid infection are among the main pathogenic agents originated from the digestive tract of food animals that might cause foodborne diseases in humans, representing a matter of great concern to the poultry industry (9, 15, 17). These *Salmonellae* may be isolated from an extremely wide range of animal species, including humans and other mammals, birds, reptiles and insects. *Salmonella* Enteritidis was isolated from 24% of the mice captured in poultry houses of contaminated bird flocks, but there was no isolation from mice captured in farms with salmonella-free birds (8). Kopanic, Sheldon and Wright (10) isolated *Salmonella* from cockroaches. The litter beetle (*Alphitobius diaperinus*) was considered to be a biological vector of *Salmonella* Typhimurium (11). The great number of potential hosts of *Salmonella* in broiler flocks results in greater infection pressure, and decreases the possibilities of a successful reduction in disease prevalence. Therefore, a more effective action against paratyphoid infections requires control measures involving diverse areas and tasks, such as vaccination. Reduced intestinal colonization and lower shedding of *Salmonella* in vaccinated birds have been shown in the majority of studies on this subject (2, 4, 6, 7, 12, 18), although disease has not been prevented. Nevertheless, the reduction of foodborne diseases caused by *Salmonella* Enteritidis since 1994 in England and Wales has been attributed to the vaccination against this pathogen (21). Also, another control measure is the prophylactic treatment of chicks using competitive exclusion, which has been widely studied. Competitive exclusion has been firstly reported by Nurmi and Rantala (13) and consists in administering to chicks bacterial

cultures of intestinal flora of healthy adult birds, in order to increase gut resistance to *Salmonella* invasion and colonization. Although it has not prevented infection installation, competitive exclusion has been shown to significantly decrease cecum colonization by *Salmonellae* (14, 16, 19, 20). On the other hand, the administration of competitive exclusion culture directly into the crop of newly hatched chicks prevented infection when the birds were challenged two days later with 10^4 cells of *Salmonella* Enteritidis (5).

The present study evaluated the individual effect of and the synergism between competitive exclusion and passive immunity against *Salmonella* on the protection of broiler chicks during the first week of life against intestinal and systemic infection by *Salmonella* Enteritidis.

3.2.2 Materials and Methods

Breeders and chicks

A Ross breeder flock of 9.000 hens was divided into three vaccination treatments: 1) Intramuscular immunization against SE at 12 and 16 weeks of age; 2) Intraperitoneal immunization against SE at 12 weeks and intramuscular immunization at 16 weeks of age; 3) Non-vaccinated group. The commercial vaccine BioEnteritidis (Biovet, Vargem Grande Paulista, São Paulo, Brazil) was used in all immunizations. An inactivated vaccine was produced using *Salmonella* Enteritidis cultivated in semi-synthetic media followed by microemulsion in oil adjuvant. The chicks used in the experiments were obtained when breeders were 45, 46 and 56 weeks old, according to the following Maternal Vaccination categories: VAC-IM – chicks from breeders vaccinated twice intramuscularly; VAC-IP – chicks from breeders given intraperitoneal vaccine in the first immunization and intramuscular in the second immunization; VAC-CTL – chicks from non-vaccinated breeders. Breeders were evaluated throughout the trials for the presence of *Salmonella spp* using microbiology analyses of samples of dragging swabs and hatchery waste. Breeder immune response was assessed at 34, 41 and 53 weeks of age by antibody titration using SE enzyme-linked-immunosorbent assay – ELISA (IDEXX – Laboratories, Inc. Westbrook, ME, USA) .

Probiotics Treatment

The chicks were sprayed using coarse droplets of 0.2 mL per chick of probiotics - Colostrum (BioCamp, Laboratórios Ltda, Campinas, São Paulo, Brazil) diluted 1:20 in saline (0.85% NaCl) during housing into the cabinets (groups PRO-TRA). Control groups (PRO-CTL) were sprayed with saline.

Challenges and Trials

Seeder chicks were placed together with contact birds at a proportion of 1 seeder chick to five non-inoculated chicks. Seeders were orally inoculated three hours after hatch using 0.2 mL of a 12-hour culture of nalidixic acid-resistant *Salmonella* Enteritidis diluted in Trypticase Soy Broth (DIFCO, Sparks, MD). The strain has been kindly provided by Dr. Paul Barrow, AFRC Institute for Animal Health (Berkshire, United Kingdom). The number of colony forming units (CFU) in the inocula was determined by counting the colonies of serial dilutions streaked onto Brilliant Green Agar (Becton, Dickinson and Co., Franklin Lakes, NJ) plates supplemented with 40 µg/mL novobiocin (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) and 25 µg/mL of nalidixic acid (Sigma Aldrich) (BGA NO-NA).

This study comprised three trials differing in the quantities of *Salmonella* used to inoculate the seeder chicks and in the interval between the housing of contact chicks and the introduction of seeders in the group (hereafter called challenge) (Table 1). In Trial I, seeder chicks were inoculated with 1.6×10^8 CFU SE and were placed together with trial chicks one hour after they had been housed. In Trial II, seeders were given 1.8×10^6 CFU SE and introduced 12 hours after housing. In Trial III, seeder chicks were inoculated with 1.2×10^4 CFU SE and housed 24 hours after the contact chicks.

Table 1. Number of colony forming units (CFU) of *Salmonella* Enteritidis (SE) inoculated in the seeder birds in Trials I, II and III and interval of time between housing and contact challenge onset.

Item	Trial I	Trial II	Trial III
SE CFU	1.6×10^8	1.8×10^6	1.2×10^4
Time interval	1 hour	12 hours	24 hours

Experimental Design

In each trial, treatments were distributed in a 3 x 2 factorial arrangement according to Maternal Vaccination (VAC-IM, VAC-IP and VAC-CTL) and Probiotics administration (PRO-TRA and PRO-CTL). Therefore, for each trial and for each Probiotics category twenty non-sexed chicks from each Maternal Vaccination category were individually identified, housed in stainless steel isolation cabinets and then sprayed. Non-inoculated and challenged chicks (contact birds) were housed three hours after they had been removed from the hatchers.

Organ Sampling and Laboratory Analyses

Six chicks were killed from each factorial arrangement at 3, 5 and 7 days post challenge. Liver and ceca were aseptically collected, individually placed into sterile sampling plastic bags (Whirl-pakTM, NASCO, Fort Atkinson, WI, EUA) and taken to the laboratory. Ten mL of saline (0.85% NaCl) was added in each bag and homogenized for 1 min using a Stomacher (Seward Medical, London, England). An aliquot (1 mL) was inoculated into tetrathionate broth (Merck, Darmstadt, Germany) and incubated at 42°C for 24 hours and then streaked onto BGA NO-NA plates. Additional 0.5-mL aliquots of the samples from Trials II and III and ceca collected at 5 and 7 days post challenge were serially diluted in saline solution (1:10). One hundred microliters of each dilution were plated onto BGA NO-NA and incubated 37°C for 24 hours. Typical SE colonies were identified and CFU were counted. Randomly selected colonies were biochemically confirmed using Urea (Merck), Lysine (Merck), Triple Sugar Iron (Merck) and Indole (Laborclin, Sao Jose dos Pinhais, Parana, Brazil).

Statistical Analyses

Positivity for SE in the ceca or liver of chicks was analyzed by chi-square and logistic regression between treatment groups, among trials, between the intervals of time from challenge until sampling, and the interactions between factors. The numbers of SE recovered from cecum were logarithmically transformed (\log_{10} CFU) and evaluated by analysis of variance (PROC GLM). Differences between means were evaluated by the test

of Tukey. Firstly, all possible interactions have been considered. Non-significant interactions were then omitted from the analyses and the final model was: Variable = variable mean + trials + intervals + maternal vaccination + probiotics + (probiotics x trial) + experimental error. Differences were considered at a significance level of 5% ($p \leq 0.05$). Statistical analyses were performed using the Minitab Statistical Software release 14.1 (Minitab Inc., State College, PA).

3.2.3 Results and Discussion

The contact with seeder chicks has been shown to trigger cecum colonization in all the chicks examined in the first two trials, independently of the other factors. The disease has spread rapidly in the three trials, and all contact birds were positive seven days after challenge. These findings contrast with results from trials carried out in pens using one-day-old chicks submitted to the same challenge, from which SE was isolated in 60% of the ceca (12/20) and only from 20% of the livers (4/20) seven days after the challenge (unpublished data). These results suggest that in the present study the environmental conditions inside the isolation cabinets contributed to a greater exposure to SE after challenge.

Maternal vaccination

Antibodies against SE were assessed by ELISA using sera collected from the breeders (Table 2). The results showed that both vaccination processes were effective to establish titers compatible with salmonella-positive birds. However, unvaccinated breeders showed no serological evidences of the disease.

Table 2. Optical densities^A (mean \pm SE) of the antibody titers against *Salmonella* Enteritidis (SE) in breeders^B vaccinated or non-vaccinated against SE as measured by ELISA .

Treatment	Breeder age (weeks)		
	34	41	53
VAC-IM ^C	0.343 \pm 0.011	0.299 \pm 0.015	0.322 \pm 0.013
VAC-IP ^D	0.326 \pm 0.011	0.301 \pm 0.012	0.300 \pm 0.016
VAC-CTL ^E	0.766 \pm 0.034	0.809 \pm 0.036	0.791 \pm 0.026

^A Values: Positive < 0.60; ambiguous 0.60 – 0.74; negative > 0.75. The values are inversely proportional to antibody titers;

^B It was tested 36 breeders per treatment and per age;

^C Breeders vaccinated against SE using two intramuscular doses;

^D Breeders vaccinated against SE using one intraperitoneal dose followed by an intramuscular dose;

^E Non-vaccinated breeders.

Isolation of *Salmonella* Enteritidis in cecum

SE was isolated in the ceca collected from all chicks in Trials I and II, from all treatments and in the three intervals post challenge. Nevertheless, on the sampling performed at day 3 after challenge in Trial III (Table 3), SE was recovered from the ceca of 100% of the PRO-CTL chicks (18/18), whereas SE in the probiotics-treated group was present in only 38.9% of the birds (7/18), suggesting a beneficial effect of the probiotics. SE was isolated from almost all chicks from the different treatments on sampling days 5 and 7 after challenge, indicating that the potential protective effect of the competitive flora was not able to inhibit SE colonization in the cecum after challenge. These findings corroborate results previously reported by Snoeyenbos *et al.* (20), which indicate that the competitive flora might limit, but do not prevent *Salmonella* infection.

Table 3. Trial III - Detection^A of *Salmonella* Enteritidis (SE) in the ceca of chicks challenged by contact 24 hours after probiotics treatment

Treatment	3 days ^B		5 days ^B		7 days ^B		TOTAL (%)
	PRO-TRA ^C	PRO-CTL ^D	PRO-TRA ^C	PRO-CTL ^D	PRO-TRA ^C	PRO-CTL ^D	
VAC-IM ^E	2/6	6/6	5/6	6/6	6/6	6/6	31/36 (86.1)
VAC-IP ^F	4/6	6/6	6/6	6/6	5/6	6/6	33/36 (91.6)
VAC-CTL ^G	1/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	31/36 (86.1)
Total (%)	7/18 (38.8)	18/18 (100)	17/18 (94.4)	18/18 (100)	17/18 (94.4)	18/18 (100)	95/108 (87.9)

^A – Number of SE positive samples / total of samples (%)

^B – Days after challenge onset.

^C – Groups treated with probiotics at one day of age.

^D – Groups without probiotics treatment.

^E – Groups composed by birds originated from breeders vaccinated against SE using two intramuscular doses.

^F – Groups composed by birds originated from breeders vaccinated against SE using one intraperitoneal dose followed by an intramuscular dose.

^G – Groups composed by birds originated from non-vaccinated breeders.

Number of *Salmonella* Enteritidis in ceca

The results of the analysis of variance from the number of CFU of SE in the ceca of chicks are shown in Table 4. The interval between challenge and laboratory analysis affected CFU counting in the ceca. There was a significant interaction between the sources of variation Trial and Probiotics. The interaction may be observed in Table 5, showing that probiotics-treated birds had a reduction in SE (\log_{10} CFU) in the cecum (0.56 and 1.45 in Trials II and III, respectively) when compared to the control groups within trials. The comparison between Trials II and III shows that the groups treated with probiotics had a significant reduction of 0.86 in the SE \log_{10} CFU in the cecum, i.e., from 7.03 to 6.17 SE \log_{10} CFU in Trials II and III, respectively. The same comparison between PRO-CTL groups from Trials II and III shows virtually no differences in SE \log_{10} CFU in the cecum, i.e., 7.59 and 7.62 in Trials II and III, respectively. Such interaction indicates the importance of the establishment of the probiotics flora before the chicks are challenged by SE. Besides, it reinforces the importance of controlling SE in the hatchery in order to have a positive effect of the probiotics treatment (1). The reduction seen in Trial III was similar

to the findings from Chambers and Lu (3), which indicated a reduction of approximately 1.5 log₁₀ CFU in the ceca of broiler chickens treated with probiotics at hatch and challenged by contact with seeder chicks three days later.

Table 6 shows a significant mean increase of 0.73 in the number of SE (log₁₀ CFU) in the ceca between the analyses at 5 and 7 days post challenge, i. e., from 6.74 to 7.47, indicating that the infection was still spreading 7 days after challenge.

There were no effects of Maternal Vaccination on the number of positive ceca and on the number of CFU of SE in the colonized ceca (Table 6). These findings might be explained by the fact that local antigen stimulation in the gut of chicks, which would be responsible for antibody secretion into the lumen, did not occur in the present trials. The results are in accordance with the findings of Chambers and Lu (3), who reported no difference in the number of bacteria isolated from ceca of chicks from vaccinated breeders when compared to chicks from non-vaccinated breeders.

Table 4. Analysis of variance from *Salmonella* Enteritidis counting (log₁₀) in the ceca of chicks at different day intervals^A after challenge by contact^B in the different treatments of Probiotics^C and Maternal Vaccinations^D.

Source of variation	Degrees of freedom	Mean Square	F value	Probability
Trials	1	6.312	4.96	0.028
Intervals	1	19.002	14.93	0.000
Probiotics	1	36.005	28.30	0.000
Maternal vaccination	2	0.377	0.30	0.744
Trial x Probiotics	1	7.174	5.64	0.019
Error	137	1.272		

^A Analysis with intervals of 5 and 7 days after the onset of the challenge by contact

^B Contact challenge with seeder birds inoculated with 1.8 x 10⁶ and 1.2 x 10⁴ SE, 12 and 24 h after housing, in Trials II and III, respectively.

^C Chicks sprayed with probiotics or saline at housing

^D Chicks from breeders vaccinated against SE using two intramuscular doses; from breeders vaccinated using one intraperitoneal dose followed by an intramuscular dose; and from non-vaccinated breeders.

Table 5. Colony forming units (CFU) of *Salmonella* Enteritidis (mean \pm SE) in the ceca of chicks according to Probiotics treatment in Trials II and III.

Classes	Mean \pm SE (\log_{10}) ¹	
	Trial II ²	Trial III ²
Probiotics ³	7.03 ^{A,a} \pm 0.20	6.17 ^{A,b} \pm 0.23
Control ³	7.59 ^{B,c} \pm 0.17	7.62 ^{B,c} \pm 0.18

¹ Means followed by capital letters in the column are different ($p < 0.05$). Means followed by different small letters in the row are statistically different ($p < 0.05$).

² Challenge by contact with seeder birds inoculated with 1.8×10^6 and 1.2×10^4 SE, 12 and 24 hours after housing in Trials II and III, respectively ($n = 36$).

³ Chicks treated with probiotics (Probiotics) or saline (Control) during housing; $n = 36$.

Table 6. Colony forming units (CFU) of *Salmonella* Enteritidis (mean \pm SE) in the ceca of chicks 5 and 7 days after challenge by contact and submitted to different Maternal Vaccination, in Trials^A II and III.

Categories	Mean \pm SE (Log_{10}) ^B
Days post-challenge ^C	
5 days	6.74 ^a \pm 0.18
7 days	7.47 ^b \pm 0.10
Maternal Vaccination ^D	
Intramuscular vaccination	7.16 ^c \pm 0.19
Intraperitoneal vaccination	7.00 ^c \pm 0.19
Non-vaccinated	7.15 ^c \pm 0.18

^A Seeder chicks inoculated with 1.8×10^6 and 1.2×10^4 CFU of SE, 12 and 24 hours after housing in Trials II and III, respectively.

^B Within the same category, means followed by different letters in the column are statistically different ($p < 0.05$).

^C Intervals: Analyses at 5 and 7 days after the challenge onset; $n = 72$.

^D Chicks from breeders vaccinated against SE using two intramuscular doses; from breeders vaccinated using one intraperitoneal dose followed by an intramuscular dose; and from non-vaccinated breeders; $n = 48$.

Isolation of *Salmonella* Enteritidis in the liver

The objective of assessing the presence of SE in the liver was to evaluate the influence of treatments on the ability of the bacteria to cause systemic infection. The results are shown in Table 7. There were significant differences among Trials on the number of positive livers for SE, which were 95.4% (103/108), 60.2% (65/108) and 44.4% (48/108) in Trials I, II and III, respectively. Contact birds from Trial I showed systemic infection shortly after being challenged with seeders (inoculated with 1.6×10^8 CFU of SE) one hour after housing. There were 86.1% (31/36) of chicks with positive recovery of SE in the liver at day 3 after challenge, and the evaluation at 5 and 7 days after challenge showed that all birds were positive. The systemic spread of the disease was slower in Trials II and III, in which the seeders were inoculated with 1.8×10^6 and 1.2×10^4 CFU of SE, respectively, and introduced 12 and 24 hours after housing. Nevertheless, high levels of SE were seen 7 days post challenge (97.2% and 77.7% in Trials II and III, respectively). These findings suggest that the establishment of the systemic infection depends on the infecting dose used to inoculate the seeder birds (which reflects the local infection pressure), concomitantly with the interval of time between housing and the challenge onset. On the other hand, it was not possible to assess the individual effect of infecting dose or time interval, since these two factors were confounded in the present experimental design.

The treatment with Probiotics lead to a significant reduction in the number of SE-positive livers in Trial III, indicating that a later exposure of birds to challenge and/or the inoculation dose given to seeders might be of importance in providing the appropriate time for the establishment of the competitive flora. In this Trial, such effect was not seen until 3 days post challenge, but the treatments with probiotics and control were significantly different 5 days post-challenge and showed positivity of 16.7% (3/18) and 72.2% (13/18), respectively. Similar results were seen at 7 days post challenge, when 61.1% (11/18) of the birds treated with probiotics had SE in the liver, whereas bacteria were recovered from 94.4% (17/18) of control birds.

Table 7. Recovery of SE from the liver of chicks challenged by contact after treatment with probiotics in Trials I, II and III ^A

TREATMENT	3 days ^B		5 days ^B		7 days ^B		TOTAL (%)
	PRO-TRA ^C	PRO-CTL ^D	PRO-TRA ^C	PRO-CTL ^D	PRO-TRA ^C	PRO-CTL ^D	
TRIAL I ^H							
VAC-IM ^E	5/6	3/6	6/6	6/6	6/6	6/6	32//36 (88.8)
VAC-IP ^F	5/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	35/36 (97.2)
VAC-CTL ^G	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	36/36 (100)
Total (%)	16/18 (88.8)	15/18 (83.3)	18/18 (100)	18/18 (100)	18/18 (100)	18/18 (100)	103/108 (95.3)
TRIAL II ^I							
VAC-IM ^E	0/6	1/6	3/6	6/6	6/6	6/6	22//36 (61.1)
VAC-IP ^F	0/6	0/6	3/6	4/6	6/6	5/6	18/36 (50.0)
VAC-CTL ^G	2/6	1/6	4/6	6/6	6/6	6/6	25/36 (69.4)
Total (%)	2/18 (11.1)	2/18 (11.1)	10/18 (55.5)	16/18 (88.8)	18/18 (100)	17/18 (94.4)	65/108 (60.1)
TRIAL III ^J							
VAC-IM ^E	0/6	1/6	0/6	6/6	3/6	6/6	16//36 (44.4)
VAC-IP ^F	0/6	0/6	3/6	1/6	3/6	5/6	12/36 (33.3)
VAC-CTL ^G	1/6	2/6	0/6	6/6	5/6	6/6	20/36 (55.5)
Total (%)	1/18 (5.5)	3/18 (16.6)	3/18 (16.6)	13/18 (72.2)	11/18 (61.1)	17/18 (94.4)	48/108 (44.4)

^A – Number of SE positive samples /Total number of samples.

^B – Days after challenge onset.

^C – Groups treated with Probiotics at one day of age.

^D – Groups without Probiotics.

^E – Groups composed by birds originated from breeders vaccinated against SE using two intramuscular doses.

^F – Groups composed by birds originated from breeders vaccinated against SE using one intraperitoneal dose followed by an intramuscular dose.

^G – Groups composed by birds originated from non-vaccinated breeders.

^H – Trial I – Contact challenge one hour after treatment using seeders inoculated with 1.6×10^8 CFU SE.

^I – Trial II – Contact challenge 12 hours after treatment using seeders inoculated with 1.8×10^6 CFU SE.

^J – Trial III – Contact challenge 24 hours after treatment using seeders inoculated 1.2×10^4 CFU SE.

In Trials II and III, there was a significant effect of Maternal Vaccination at 5 days after challenge in the chicks not treated with probiotics. In this circumstance, chicks from breeders vaccinated intraperitoneally (VAC-IP) showed 41.7% (5/12) of SE in the liver, whereas control chicks (VAC-CTL) and from breeders vaccinated intramuscularly (VAC-IM) showed 100% positivity (12/12). The chicks VAC-IP showed approximately the same reduction in positivity than the chicks treated with probiotics, indicating that the effect of passive immunity given by breeder vaccination did not sum up with the effect of the probiotics treatments. However, further studies are needed to explain the interaction between the sources of variation Probiotics and Maternal Vaccination. There was no significant effect of Maternal Vaccination at 7 days after challenge, probably due to the lower availability of passive antibodies to fight challenge.

The dynamics of disease evolution in the groups indicates a significant increase in positivity, irrespective of the treatments used. Maybe further analyses beyond 7 days after challenge onset might indicate the impact of treatments on disease development, both concerning a potential increase in positivity of systemic disease in the probiotics-treated groups in Trial III, and also concerning a recovery of the birds with systemic and intestinal infection.

In conclusion, these results reinforce the idea that the use of an association of control measures (in the present study, probiotics and maternal vaccination) might be of great value to reduce the presence of *Salmonella* in the various steps of the poultry production chain.

References

1. Bailey, J.S.; Cason, J.A. and Cox, N.A. Effect of Salmonella in Young Chicks on Competitive Exclusion Treatment. *Poult. Sci.* 77:394-399. 1998.
2. Cerquetti, M. C. and Gherardi, M. M. Orally administered attenuated Salmonella Enteritidis reduces chicken cecal carriage of virulent Salmonella challenge organisms. *Vet. Microbiol.* 76:185-192. 2000.
3. Chambers, J.R. and Lu, X. Probiotics and Maternal Vaccination for *Salmonella* Control in Broiler Chickens. *J. Appl. Poult. Res.* 11:320-327. 2002.
4. Charles, S. D.; Nagajara, K. V. and Sivanandan, V. A Lipid-conjugated immunostimulating complex subunit vaccine against Salmonella infection in turkeys. *Avian Dis.* 37:477-484. 1993.
5. Corrier, D.E.; Hollister, A.G.; Nisbet, D.J.; Scanlan, C.M.; Beier, R.C. and Deloach, J.R. Competitive exclusion of Salmonella Enteritidis in leghorn chicks: Comparison of treatment by crop gavage, drinking water, spray, or lyophilized alginate beads. *Avian Dis.* 38:297-303. 1994.
6. Davison, S.; Benson, C.E.; Henzler, D.J. and Eckroade, R.J. Field observations with Salmonella Enteritidis bacterins. *Avian Dis.* 43:664-669. 1999.
7. Gast, R. K., Stone, H. D. and Holt, P. S. Evaluation of the efficacy of oil-emulsion bacterins for reducing fecal shedding of Salmonella Enteritidis by laying hens. *Avian Dis.* 37:1085-1091. 1993.
8. Henzler D.J. and Opitz H.M. The role of mice in the epizootiology of Salmonella Enteritidis infection on chicken layer farm. *Avian Dis.* 36:625-631. 1992.
9. Humphrey, T.J. Contamination of egg shell and contents with *Salmonella* Enteritidis: a review. *Internat. J. Food Microbiol.* 21:31-40. 1994.
10. Kopanic R.J. Jr; Sheldon B.W. and Wright C.G. Cockroaches as vectors of Salmonella: Laboratory and field trials. *J. Food Protect.* 57:125-132. 1994.
11. Mcallister J.C.; Steelman C.D. and Skeeles J.K. Reservoir competence of the lesser mealworm (Coleptera: Tenebrionidae) for Salmonella Typhimurium (Eubacteriales: Enterobacteriaceae). *J. Med. Entomol.* 31:369-372. 1994.
12. Nakamura, M.; Nagamine, N.; Takahashi, T.; Suzuki, S. and Sato, S. Evaluation of the efficacy of a bacterin against Salmonella Enteritidis infection and the effect of stress after vaccination. *Avian Dis.* 38:717-724. 1994.
13. Nurmi, E. and Rantala, M. New aspects of Salmonella infection in broiler production. *Nature* 241:210-211. 1973.

14. Palmu, L. and Camelin, I. The use of competitive exclusion in broilers to reduce the level of *Salmonella* contamination on the farm and at the processing plant. *Poult. Sci.* 76:1501-1505. 1997.
15. Poppe, C. *Salmonella* infections in domestic fowl. In: C. Wray & A. Wray, *Salmonella* in Domestic Animals. Wallingford: CABI Publishing. 2000.
16. Rigby, C. E. and Pettit, J. R. Observation on competitive exclusion for preventing *Salmonella typhimurium* infection of broiler chicks. *Avian Dis.* 24:604-615. 1980.
17. Rodrigue, D.C.; Tauxe, R.V. and Rowe, B. International increase in *Salmonella* Enteritidis: A new pandemic? *Epidemiol. Infect.* 105:21-27. 1990.
18. Silva, E. N.; Snoeyenbos, G.H.; Weinack, O.M. and Smyser, C.F. Studies on the use of 9R Strain of *Salmonella gallinarum* as vaccine in chickens. *Avian Dis.* 25:38-52. 1981.
19. Snoeyenbos, G. H.; Weinack, O. M. and Smyser, C. F. Protecting chicks and poults from *Salmonella* by oral administration of "normal" gut microflora . *Avian Dis.* 22:273-287. 1977.
20. Snoeyenbos, G. H; Weinack, O.M.; Soerjadi-Liem, A.S.; Miller, B.M.; Woodward, D.E. and Weston, C.R. Large-scale trials to study competitive exclusion of *Salmonella* in chickens. *Avian Dis.* 29:1004-1011. 1985.
21. Ward, L.R.; Threlfall, J.; Smith, H.R. and O'Brien, S.J. *Salmonella* Enteritidis epidemic. *Science* 287:1754, 2000.

4 CAPÍTULO III

4.1 Efeito da Administração de *Salmonella Gallinarum* Cepa 9r em Pintos de Corte Artificialmente Desafiados com *Salmonella Enteritidis*

Resumo

Em quatro experimentos foram investigados os efeitos da pulverização da cepa 9R de *Salmonella Gallinarum* (SG-9R) em pintos de corte de um dia de idade sobre a infecção provocada artificialmente por *Salmonella Enteritidis* (SE). Os experimentos se caracterizaram pelo desafio empregado (número de células de SE por pinto semeador / horas de intervalo entre o alojamento e o início do desafio), que foram de $1,6 \times 10^8$ / 1 hora, $1,8 \times 10^6$ / 12 horas, $1,2 \times 10^4$ / 24 horas e $1,5 \times 10^4$ / 24 horas, para os experimentos I, II, III e IV respectivamente. Os três primeiros experimentos foram conduzidos em unidades de isoladores e o Experimento IV foi realizado em baias com cama de maravalha. Acessou-se os números de cecos e fígados positivos para SE e, nos experimentos II e III, o número de unidades formadoras de colônia (ufc) no ceco. Todos os pintos dos experimentos em isoladores (I-III) tiveram os cecos infectados por SE no 3º, 5º e 7º dia após o início do desafio. No experimento IV, o número de aves com a presença de SE nos cecos no 40º dia foi de 19,5% (8/41) e 36,5% (16/44) para os tratamentos SG-9R e controle, respectivamente. Não ocorreram diferenças significativas entre os tratamentos nos Experimentos I, II e IV no número de fígados com presença de SE, enquanto que, no Experimento III, o tratamento SG-9R 29,6% (16/54) e o tratamento controle 68,4% (35/54) das aves tiveram SE detectada no fígado. Esta diferença entre os três primeiros experimentos pode ser resultante do retardamento da exposição dos pintos ao desafio e do número de bactérias usadas na inoculação das aves semeadoras, o que reforça a importância do retardamento da exposição dos pintos a um ambiente desafiador para que os tratamentos baseados em competição biológica possam produzir um efeito benéfico. O tratamento SG-9R provocou uma redução média em relação ao tratamento controle de $0,70 \log_{10}$ no número de SE nos cecos sem, no entanto, diminuir o número de aves com a presença desta bactéria no órgão. A aplicação da SG-9R em pintos de um dia apresenta potencial para

auxiliar no controle da infecção por SE. Em que pese essa conclusão, estudos adicionais são necessários para verificar a magnitude da efetividade desta medida, bem como determinar a probabilidade de reversão da patogenicidade da SG-9R.

4.1.1 Introdução

Os programas de combate a *Salmonella* Gallinarum (SG), através de testes e abate de lotes positivos, levou à erradicação da doença provocada por este agente nos lotes comerciais do Estados Unidos, Inglaterra e País de Gales (BULLIS, 1977; SOJKA; FIELD, 1970). Rodrigue, Tauxe e Rowe (1990) indicam o aumento de infecção por *Salmonella* Enteritidis (SE) em humanos em ambos os lados do oceano Atlântico, questionando se estávamos enfrentando uma nova pandemia. Mishu *et al.* (1994) reportam que a *Salmonella* Enteritidis como sendo o sorovar mais freqüente nos Estados Unidos. Bäumlér, Hargis e Tsolis (2000) levantam a hipótese de que a relação inversa entre a infecção por *S. Gallinarum* em aves e a infecção por SE em humanos seja devido ao preenchimento pela SE de um nicho ecológico deixado pela erradicação da *Salmonella* Gallinarum. Rabsch *et al.* (2000) demonstraram, com base em análise retrospectiva de levantamentos epidemiológicos feitos na Alemanha, que o número de casos humanos de SE está inversamente relacionado com a prevalência de SG em aves, sendo que a aplicação de modelos matemáticos combinando epidemiologia com a biologia populacional sugerem que a SG excluiu competitivamente a SE dos lotes de aves no início do século XX. Há evidências sorológicas que a SG é mais imunogênica do que a SE, sugerindo que a imunização com uma cepa viva e atenuada de SG possa ser uma abordagem mais efetiva para produzir proteção em frangos (RABSCH *et al.*, 2000). Ainda nessa seara, experimentos indicam que aves expostas a SG adquirem uma forte imunização cruzada contra a colonização com SE, e a imunização de frango com a cepa 9R leva à proteção contra SE (BARROW, 1990; WITVLIET *et al.*, 1997; STERNER; HEIN, 1998).

A cepa 9R da *Salmonella* Gallinarum tem sido usada extensivamente como vacina contra o tifo aviário e confere uma forte proteção contra a doença sistêmica em aves adultas (GORDON; GARSIDE; TUCKER, 1959; SILVA *et al.*, 1981), embora mantenha alguma virulência para linhagens de aves susceptíveis. A cepa 9R da *Salmonella* Gallinarum curada

de seu plasmídio de virulência mostrou-se atenuada para pintos jovens (BARROW, 1987). A vacinação intramuscular com esta variante atenuada tornou as aves resistentes a um desafio oral, mas a resistência não foi tão completa quanto a induzida pela cepa vacinal 9R administrada oralmente (BARROW, 1990).

O uso da exclusão competitiva, relatada pela primeira vez por Nurmi e Rantala (1973), busca aumentar a resistência das aves à invasão por *Salmonella* através da administração aos pintos de cultura de bactérias intestinais de aves adultas. Esta exclusão sugere que duas bactérias que competem pelo mesmo sítio de fixação são mutuamente exclusivas. Estes conceitos são de extrema importância quando um antígeno participa da interface entre o agente infeccioso e o hospedeiro e, por proximidade filogenética, a infecção por uma espécie deve, em tese, reduzir as chances de infecção por outra espécie do mesmo gênero, e tanto mais a infecção por outra cepa da mesma espécie (FIORENTIN, 2000).

O propósito do presente estudo é avaliar o efeito da administração oral da cepa 9R de *Salmonella Gallinarum* na proteção de pintos de corte na primeira semana de vida contra a infecção intestinal e sistêmica causada por *Salmonella Enteritidis*.

4.1.2 Materiais E Métodos

Experimentos

Este estudo foi realizado através de quatro experimentos. Três experimentos (I, II e III) foram conduzidos em unidades de isoladores biológicos e um experimento (IV) foi realizado em aviários experimentais. Os experimentos feitos nos isoladores tiveram variações na quantidade de *Salmonella Enteritidis* usada para inocular os pintos semeadores e no intervalo entre o alojamento e o início do desafio por contato. No Experimento I os pintos semeadores foram inoculados com $1,6 \times 10^8$ ufc de SE e colocados em contato com os demais pintos do experimento 1 hora após o alojamento. No Experimento II, a dose infectante inoculada nos pintos semeadores foi de $1,8 \times 10^6$ ufc de SE e o contato com os pintos do experimento iniciou-se 12 horas após o alojamento. No Experimento III, o número de ufc de SE inoculado nos pintos semeadores foi de $1,2 \times 10^4$ e o contato com os demais pintos iniciou-se 24 horas após o alojamento. No Experimento IV, $1,5 \times 10^4$ ufc de

SE foram inoculadas em cada pinto semeador e, 24 horas após o alojamento, iniciou-se o desafio por contato. Os experimentos com suas variações estão resumidos na Tabela 1.

Tabela 1. Diferenças entre os experimentos no número de ufc de SE inoculada por pinto semeador, no intervalo entre o alojamento e início do desafio por contato e no ambiente de criação.

Item	Experimento I	Experimento II	Experimento III	Experimento IV
Nº de ufc SE	$1,6 \times 10^8$	$1,8 \times 10^6$	$1,2 \times 10^4$	$1,5 \times 10^4$
Intervalo	1 hora	12 horas	24 horas	24 horas
Ambiente	Isoladores	Isoladores	Isoladores	Baias

Pintos

Os pintos foram obtidos de um lote de matriz da linhagem Ross, avaliado no período de duração dos experimentos para ausência de *Salmonella spp* através do cultivo convencional de suabes de arrasto e de restos de incubação. Nos experimentos I, II e III, logo após o nascimento, foram alojados separadamente 60 pintos por tratamento em duas unidades de isolamento construídas em aço inoxidável. No experimento IV, 60 pintos por tratamento foram alojados logo após o nascimento em baias separadas fisicamente e com piso coberto de maravalha de madeira.

Aplicação da *Salmonella Gallinarum* cepa 9R

Por ocasião do alojamento, a vacina comercial CNN SG VAC R (CNN Laboratórios Veterinários Ltda, Campinas, São Paulo, Brasil) de *Salmonella Gallinarum* cepa 9R foi reconstituída em 100 mL de solução fisiológica e foi aplicada na proporção de 0,2 mL por pinto através de pulverização grossa, resultando em uma concentração de $10^{9,52}$ bactérias por pinto. Na mesma ocasião, os grupos testemunhas receberam o mesmo volume de solução fisiológica sem a adição da vacina.

Desafios

Os desafios foram feitos através do contato entre pintos dos experimentos com os pintos semeadores. Os semeadores foram inoculados logo após o nascimento por via oral, com 0,2 mL de uma diluição de culturas de 12 horas em caldo tripticase de soja (TBS) (DIFCO, Sparks, MD, EUA) de uma amostra de *Salmonella* Enteritidis resistente ao ácido nalidixico (SE NA^r), gentilmente cedida pelo Dr. Paul Barrow, AFRC Institute for Animal Health (Berkshire, Reino Unido). Foi utilizada a proporção de 1 pinto semeador para cada 5 pintos não inoculados. O número de unidades formadoras de colônia (ufc) de cada inóculo foi determinado através da contagem do número de colônias nos cultivos de diluições seriadas em placas de ágar verde brilhante (Becton, Dickinson and Co.m Franklin Lakes, NJ, EUA) contendo 40 µg/mL de novobiocina (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e 25 µg/mL de ácido nalidixico (Sigma Aldrich) (BGA NO-NA).

Coleta de órgãos e procedimentos laboratoriais

Nos experimentos I, II e III, seis pintos por tratamento foram sacrificados por deslocamento cervical no 3^o, 5^o e 7^o dia após desafio. No Experimento IV, dez pintos por tratamento foram sacrificados no 7^o dia e as demais aves foram sacrificadas no 40^o dia após o desafio. De cada ave foram retirados asséptica e separadamente o fígado e o ceco e colocados individualmente em sacos plásticos (Whirl-pacTM, NASCO, Fort Atkinson, WI, EUA) identificados, então transportados para o laboratório. 10 mL de uma solução fisiológica de cloreto de sódio (0,85%) foram colocados em cada saco, os quais foram imediatamente processados em um misturador Stomacher (Seward Medical, Londres, Inglaterra) durante 1 minuto. Uma alíquota de 1,0 mL desta mistura foi retirada e colocada em Caldo de Tetrionato (Merck, Darmstadt, Alemanha) e incubado a 42^o Centígrados por 24 horas e, após, foram repicadas para placas com BGA NO-NA. Nos Experimentos II e III e para os Cecos das coletas do 5^o e 7^o dia, retirou-se uma alíquota adicional de 0,5 mL da mistura e diluiu-se serialmente em tubos contendo 4,5 mL de solução fisiológica. Um volume de 0,10 mL de cada uma das diluições decimais foi distribuído na superfície de placas com BGA NO-NA. As placas com BGA NO-NA foram incubadas durante 24 horas a uma temperatura de 37^o C. As colônias típicas de SE foram identificadas e as colônias foram contadas. Algumas colônias foram confirmadas através dos testes bioquímicos de

Uréia (Merck), Lisina (Merck), Tríplice Açúcar Ferro (Merck) e Indol (Loborclin, São José dos Pinhais, Paraná, Brasil).

Análise Estatística

As diferenças nos números de pintos com cecos ou fígados positivos para SE entre os tratamentos, experimentos, intervalos entre o desafio e a análise e suas interações foram analisadas pelo teste chi-quadrado e regressão logística. As quantidades de SE recuperadas do ceco foram transformadas em logaritmos e estão expressas em \log_{10} de ufc de SE. Estas quantidades foram analisadas através de Análise de Variância, procedimento de Modelo Linear Geral (PROC GLM); em uma primeira análise incluiu-se todas as possíveis interações entre as fontes de variabilidade, posteriormente, em função da não significância das interações, estas interações foram incluídas no erro experimental. A significância das comparações foram verificada através do Teste de Tukey. As diferenças foram consideradas como sendo significativas com base no nível de probabilidade de 5% ($p \leq 0,05$). Os cálculos estatísticos foram realizados através do sistema Minitab Statistical Software versão 14.1 (Minitab Ins., State College, PA, EUA).

4.1.3 Resultados e Discussão

Enquanto duraram os experimentos, não foi isolada *Salmonella spp.* dos restos de incubação e dos suabes de arrasto do lote de matrizes que originou os pintos envolvidos no estudo.

Isolamento de *Salmonella* Enteritidis do ceco

Nos experimentos I, II e III, foram isoladas SE dos cecos de todos os pintos, de todos os tratamentos no 3º, 5º e 7º dia após o início do desafio por contato.

Já no Experimento IV (Tabela 2), na primeira coleta, 7º dia após o início do desafio, 50% (5/10) dos pintos infectados com a cepa 9R da SG tiveram SE isolada dos cecos, enquanto que a positividade para SE dos pintos controles foi de 70% (7/10). Na análise do 40º dia após o início do desafio, a positividade para SE dos cecos foi de 19,5% (8/41) e 36,3% (16/44) para os tratamentos com a cepa 9R da SG e controle, respectivamente. Apesar dos resultados mostrarem um maior isolamento de SE entre os pintos controles, as comparações

entre os dois tratamentos não foram estatisticamente significativas ($p = 0,36$ no 7º dia e $p = 0,08$ no 40º dia), indicando que, nas condições experimentais usadas, a pulverização da vacina 9R em pintos recém nascidos não resulta em diminuição no número de pintos com cecos infectados por SE, ao nível de significância estatística usada neste experimento ($p \leq 0,05$). Porém, no 40º dia de idade, a redução causada pela pulverização da cepa 9R da SG nos pintos recém nascidos foi muito próxima ao nível de significância estatística utilizado, indicando a possibilidade de obter-se uma diferença em 92% das ocasiões, sob as mesmas condições experimentais.

Tabela 2. Experimento IV - Detecção de *Salmonella* Enteritidis (SE) nos cecos e no fígado de pintos criados em baia e desafiados por contato 24 horas após o alojamento^A.

TRATAMENTOS	7º Dia ^B		40º Dia ^B	
	CECOS ^C	FÍGADO ^D	CECOS ^C	FÍGADO ^D
Cepa 9R de SG ^E	5/10 (50,0)	0/10 (0,0)	8/41 (19,5)	0/41 (0,0)
Controle ^F	7/10 (70,0)	4/10 (40,0)	16/44 (36,3)	0/44 (0,0)

^A – Número de amostras positivas para SE/Número de amostras examinadas – (%).

^B – Dia após o início do desafio.

^C – Isolamento dos cecos.

^D – Isolamento do fígado.

^E – Pintos pulverizados com cepa 9R da *Salmonella* Gallinarum no alojamento.

^F – Pintos controles, pulverizados com solução fisiológica no alojamento.

Número de *Salmonella* Enteritidis no ceco

A Tabela 3 apresenta a análise de variância do número do ufc nos cecos dos pintos dos Experimentos II e III, onde se observa que não houve diferença entre os dois experimentos conduzidos, enquanto que houve uma diferença significativa entre os pintos tratados com a cepa 9R da SG e os pintos controles e, também, entre as análises do 5º dia e 7º dia após o início do desafio. As possíveis interações entre estes fatores foram testadas e não foram significantes e, como conseqüência, as variabilidades das interações foram incluídas no erro experimental. As diferenças são melhores observadas na Tabela 4, onde as médias e os erros padrões do número do ufc no ceco dos experimentos II e III estão relacionadas. Os pintos tratados com a vacina de SG cepa 9R tiveram uma redução média significativa de 0,69 \log_{10} no número de ufc de SE no ceco em relação aos pintos controle.

Esta redução no número de *Salmonella* Enteritidis nos cecos possivelmente é devida a um efeito de exclusão provocado pela cepa 9R da *Salmonella* Gallinarum, já que, pelo curto espaço de tempo entre a administração desta bactéria e as análises, não se espera que uma resposta imunológica específica possa provocar algum efeito perceptível. Ao observar-se na Tabela 4 a diferença nos resultados do número de ufc de SE entre os intervalos do 5º e 7º dia após o início do desafio, vê-se que esta diferença decorre principalmente do aumento no número de ufc do 5º para o 7º dia entre os pintos controles, embora não se tenha achado interação entre os fatores testados. Esta observação sugere que possa haver um efeito da SG na evolução da infecção e, portanto, suscita a indagação da qual seria a influência da pulverização da vacina com a cepa 9R de SG em pintos sobre a velocidade e grau de resolução da infecção. Em alinhamento a esta suposição se encontram os resultados do Experimento IV, que fornecem indícios ($p = 0,92$) de haver uma redução no número de cecos positivos para SE após quarenta dias do início do desafio.

Tabela 3. ANOVA da contagem de *Salmonella* Enteritidis (Log_{10}) no ceco de pintos com diferentes intervalos ^A de dias após início dos desafios ^B por contato para e pulverizados com a cepa 9R da *Salmonella* Gallinarum no alojamento ^C.

Fonte	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F	Probabilidade
Experimentos ^B	1	0,103	0,09	0,760
Intervalos ^A	1	4,651	4,22	0,042
Tratamentos ^C	1	17,542	15,90	0,000
Erro Experimental	140	1,103		

^A Análise com intervalos de 5 e 7 dias após o início do desafio por contato

^B Desafio por contato com pintos inoculados com $1,8 \times 10^6$ e $1,2 \times 10^4$ SE, doze e vinte e quatro horas após o alojamento, respectivamente Experimentos II e III.

^C Tratamento com e sem pulverização com cepa 9R da *Salmonella* Gallinarum no alojamento.

Tabela 4. Média e erro padrão (Log_{10}) do número unidades formadoras de colônias de *Salmonella* Enteritidis no ceco de pintos submetidos controles e pulverizados com cepa 9R da *Salmonella* Gallinarum no alojamento.

Tratamentos	Experimento ^A		Intervalo ^B		Média ^C
	II	III	5º Dia	7º Dia	
Cepa 9R de SG ^D	6,86 ± 0,24	6,97 ± 0,08	6,83 ± 0,14	7,00 ± 0,13	6,92 ± 0,10
Controle ^C	7,59 ± 0,17	7,62 ± 0,18	7,34 ± 0,22	7,89 ± 0,11	7,62 ± 0,11

^A – Desafio por contato com pintos inoculados com $1,8 \times 10^6$ e $1,2 \times 10^4$ SE, doze e vinte e quatro horas após o alojamento, respectivamente nos Experimentos II e III; n = 36.

^B – Dia da análise após o início do desafio por contato; n = 36.

^C – Média geral dos experimentos; n = 72.

^D – Pintos pulverizados com cepa 9R da *Salmonella* Gallinarum no alojamento.

^C – Pintos controles, pulverizados com solução fisiológica no alojamento.

Isolamento de *Salmonella* Enteritidis do fígado

Através da pesquisa de SE no fígado procurou-se avaliar qual a influência da pulverização dos pintos com uma suspensão de bactérias da cepa 9R da SG sobre a capacidade da SE provocar uma infecção sistêmica. Observam-se diferenças significativas entre os três primeiros experimentos no número de fígados positivos para SE 91,6% (99/108), 58,3% (63/108) e 47,2% (51/108) para os experimentos I, II e III, respectivamente. As aves do Experimento I, desafiadas por contato com aves inoculadas com $1,6 \times 10^8$ ufc de SE iniciado uma hora após o alojamento, desenvolveram infecção sistêmica rapidamente. No terceiro dia após o desafio já apresentavam 83,3% (30/36) pintos com isolamento de SE no fígado e, no exame do quinto e sétimo dia, 96,8% (69/72) das aves tornaram-se positivas. Já nos Experimentos II e III, com o desafio iniciado 12 e 24 horas após o alojamento e, respectivamente, com inoculação de $1,8 \times 10^6$ e $1,2 \times 10^4$ ufc de SE por ave semeadora, a difusão da forma sistêmica doença ocorreu de maneira menos rápida. Todavia, elevados níveis foram atingidos na análise do sétimo dia pós-desafio (94,4% e 69,4% nos Experimentos II e III, respectivamente), corroborando os resultados obtidos no estudo ‘Efeito do Probiótico e Vacinação Maternal na Infecção por *Salmonella* Enteritidis nos primeiros dias de Pintos de Corte’, apresentado no capítulo II desta tese. Estes achados confirmam que a velocidade do estabelecimento da infecção sistêmica está na dependência da dose infectante usada nas aves semeadoras, que reflete a pressão

infectiva local, concomitante com o intervalo de tempo ocorrido entre o alojamento e o desafio, ou seja, a idade dos pintos no início do desafio. Pelo desenho experimental usado não foi possível separar as influências destes dois fatores.

Nos experimentos I e II não foram detectadas diferenças entre o grupo vacinado e o grupo controle no número de fígados infectados por SE. Já no Experimento III, o uso da cepa 9R da SG resultou em uma redução significativa de 68,4% (35/54) para 29,6% (16/54) no número de fígados positivos. O desafio empregado no Experimento III, o número de bactérias usadas para infectar as aves semeadoras e/ou intervalo de tempo entre a aplicação dos tratamentos e a exposição das aves ao contato com os pintos semeadores, pode ter permitido uma difusão prévia mais efetiva da *Salmonella Gallinarum* cepa 9R entre as aves e, possivelmente, a mobilização de defesas sistêmicas inespecíficas.

No experimento IV foi detectada SE no fígado em 40% (4/10) pintos do grupo controle no 7º dia de idade e em nenhum pinto do grupo que recebeu a cepa 9R da SG. Já na análise do 40º dia, não foi detectada a presença de SE no fígado de todas aves examinadas (Tabela 2).

No experimento IV, conduzido em baias, no 7º dia após o início do desafio 60% (12/20) dos pintos examinados tiveram SE detectada no ceco e 20% (4/20) no fígado, enquanto que, no 7º dia do Experimento III, a positividade foi de 100% (36/36) e 94% (34/36) para os cecos e fígados, respectivamente. A comparação entre estes resultados, considerando-se que os Experimentos III e IV tiveram desafios semelhantes, indica um possível aumento do nível de desafio decorrente das condições ambientais dos isoladores em comparação ao ambiente proporcionada pelo alojamento em baias tradicionais, que se assemelham mais às condições das criações comerciais.

A administração da cepa 9R da SG por pulverização no alojamento dos pintos provocou uma redução no número de SE no ceco sem, no entanto, diminuir o número de aves com SE neste órgão. Ainda nesse ponto, a administração em questão teve efeito sobre o nível de infecção sistêmica caracterizada pela redução no número de fígados positivos para SE quando a aplicação antecedeu em 24 horas o início do desafio. Estudos adicionais serão necessários para verificar a efetividade desta medida em lotes de frangos de corte, já que os desafios usados nas unidades isoladoras possivelmente não reproduzam o desafio natural. Da mesma maneira, um aprofundamento nos estudos sobre o envolvimento do

sistema imunológico específico e, principalmente, inespecífico poderá explicar melhor os efeitos observados.

Referências

- BARROW P.A. Immunity to experimental fowl typhoid in chickens induced by a virulence plasmid-cured derived of *Salmonella gallinarum*. **Infection and Immunity**, v. 58, p. 2283-2288, 1990.
- BARROW, P.A. *et al.* Observations on the pathogenesis of experimental *Salmonella typhimurium* infection in chickens. **Research in Veterinary Science**, v. 42, p.194-199, 1987.
- BÄUMLER A.J.; HARGIS B.M.; TSOLIS R.M. Tracing the origins of *Salmonella* outbreaks. **Science**, v. 287, p. 50-52, 2000.
- BULLIS K.L. The history of avian medicine in the U.S. II. Pullorum disease and fowl typhoid. **Avian Disease**, v. 21, p. 422-429, 1977.
- FIorentin L. **Anuário da Embrapa**, v. Dez.00 – Jan.01. 2000, p. 20-25, 2001.
- GORDON, R.F.; GARSIDE, J.S.; TUCKER, J.S. The use of living attenuated vaccines in the control of fowl typhoid. **Veterinary Record**, v. 71, p. 300-305, 1959.
- MISHU B. *et al.* Outbrakes of *Salmonella* Enteritidis infections in the United States, 1985-1991. **Journal of Infection Diseases**, v. 169, p. 547-552, 1994.
- NURMI, E.; RANTALA, M. New aspects of *Salmonella* infection in broiler production. **Nature**, v. 241, p. 210-211, 1973.
- RABSCH W. *et al.* Competitive Exclusion of *Salmonella* Enteritidis by *Salmonella* Gallinarum in Poultry. **Emerging Infectious Diseases**, v. 6, p. 443-448, 2000.
- RODRIGUE, D.C.; TAUXE, R.U.; ROWE, B. International increase in *Salmonella enteritidis*: a new pandemic? **Epidemiology and Infection**, v. 105, p. 21-27, 1990.
- SILVA, E. N. *et al.* Studies on the use of 9R Strain of *Salmonella gallinarum* as a vaccine in chickens. **Avian Diseases**, v. 25, p. 38-52, 1981.
- SOJKA W.J.; FIELD H.I. Salmonellosis in England and Wales, 1958-1967. **Veterinary Bulletin**, v. 40, p. 515-531, 1970.
- STERNER F.; HEIN R. An attenuated *Salmonella* gallinarum live vaccine induces long-term protection against *Salmonella* Enteritidis challenged chickens. International Symposium on Food Borne *Salmonella* in Poultry. Baltimore, MD. 1998.

WITVLIET M. *et al.* The *Salmonella gallinarum* 9R vaccine: homologous protection and cross-protection against *Salmonella enteritidis*. Proceedings of the International Symposium on *Salmonella* and Salmonellosis. Ploufragan. St. Brieuc, França. 1997. 503-505.

5 CAPÍTULO IV

5.1 Efeito da Acidificação da Água de Bebida no Pré-Abate na Recuperação de *Salmonella* Enteritidis do Inglúvio de Frangos

Autores: Luiz Antonio Faccenda de Avila, Vladimir Pinheiro do Nascimento, Cláudio Wageck Canal, Carlos Tadeu Pippi Salle e Hamilton Luiz de Souza Moraes

Afiliação: Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária (CDPA), Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 8824, Porto Alegre, CEP 91540-000, Rio Grande do Sul, Brasil, <http://www.ufrgs.br/ppgcv/cdpa>.

Autor para correspondência: Luiz Antonio Faccenda de Avila

e-mail: luiz.favila@terra.com.br

Resumo

O inglúvio é conhecido com uma importante fonte de contaminação de *Salmonella* para o produto final. Foram avaliados os efeitos da acidificação da água de bebida com ácido cítrico, ácido láctico e a combinação destes com *d*-Limoneno e sulfato de cobre sobre o número de *Salmonella* Enteritidis (SE) no inglúvio de frangos de corte experimentalmente infectados. Os tratamentos foram administrados durante o período de jejum pré abate (8 horas) (Experimentos I e II) e durante as últimas 32 horas de vida do frango (Experimento III). O consumo de água no período de jejum pré abate foi afetado pela adição de ácidos quando a administração do tratamento teve início com o jejum, influenciando uma possível ação destes tratamentos sobre a SE (Experimentos I e II). Não houve diferença no consumo de água no período de jejum quando a administração dos ácidos começou 24 horas antes do início do período de jejum (Experimento III). Estes tratamentos reduziram o número de SE ($p < 0,05$) recuperado do inglúvio. No Experimento III, o ácido láctico 0,470% causou uma redução de 99% no número de SE recuperadas do inglúvio. Os resultados obtidos deste estudo sugerem que o uso de ácidos orgânicos na água de bebida começando 24 horas antes do início do jejum pode diminuir a colonização da SE

no inglúvio dos frangos de corte e que esta pode ser uma medida importante para reduzir a contaminação por SE nos produtos de frango dentro do abatedouro.

Unitermos: Frango de corte, *Salmonella* Enteritidis, ácidos orgânicos, inglúvio, ácido láctico, ácido cítrico, d-Limoneno, sulfato de cobre, jejum pré-abate.

5.1.1 Introdução

Salmonelas em aves constituem uma constante preocupação para a indústria avícola mundial como fonte de infecção de origem alimentar causada principalmente por *Salmonella* Enteritidis (SE) (ANÔNIMO, 1988; RODRIGUE; TAUXE; ROWE, 1990; HUMPHREY, 1994; POPPE, 2000).

A prática de submeter os frangos de corte a um jejum alimentar, antecedendo ao abate, é amplamente usada na avicultura industrial e objetiva a diminuição da contaminação das carcaças durante o processo de abate, pelo esvaziamento do trato gastro-intestinal. Entretanto, foi observado um aumento da presença de SE no inglúvio de galinhas de postura submetidas a jejum alimentar em relação a aves com acesso *ad libitum* à ração (HUMPHREY *et al.*, 1993). Hargis *et al.* (1995), estudando a persistência de SE no inglúvio e no ceco de frangos experimentalmente inoculados e analisando as informações relativas ao número de inglúvios e cecos rompidos, concluíram que o inglúvio pode servir de fonte de contaminação para as carcaças de frangos de corte. Por sua vez, Ramirez *et al.* (1997) indicaram que o jejum aumentou a incidência de *Salmonellae* no inglúvio de frangos de corte antes do abate evidenciando que este órgão possa ser um importante ponto crítico de controle para redução de contaminação das carcaças por estas bactérias. Quanto à quantidade de células do agente, a incidência de contaminação do inglúvio por *Salmonella* pode aumentar até cinco vezes durante o jejum pré abate (CORRIER *et al.*, 1999a). Estudos recentes demonstraram que o jejum resulta em alterações no inglúvio caracterizadas pela redução de ácido láctico, aumento do pH e conseqüente elevação contaminação por *Salmonella* (CORRIER *et al.*, 1999b). Os resultados obtidos por Barnhart *et al.* (1999), usando uma associação de ácido cítrico e *d*-Limoneno, sugeriram que um sanitizante adequado poderia ser administrado durante o jejum pré abate com a finalidade de reduzir o número de patógenos no inglúvio. Byrd *et al.* (2001) demonstraram que a incorporação de

ácido láctico na água de bebida durante o período de jejum pré abate pode reduzir a contaminação por *Salmonella* e *Campylobacter* dos ingluvios e, possivelmente, nas carcaças de frango de corte.

O propósito deste trabalho foi avaliar o efeito da acidificação da água de bebida com os ácidos láctico, cítrico e de uma mistura destes com *d*-Limoneno e sulfato de cobre sobre a recuperação de SE do inglúvio de frango de corte artificialmente infectados com este patógeno.

5.1.2 Materiais e Métodos

Experimentos

O estudo foi conduzido em três experimentos. Os tratamentos consistiram das diferentes concentrações de ácido láctico (Purac Síntese, São Paulo, São Paulo, Brasil) (referido como LACTO), de ácido cítrico (Tate & Lyle, Santa Rosa do Viterbo, São Paulo, Brasil) (referido como CITRO), da mistura composta de 92,9% de ácido láctico, de 1,6% *d*-Limoneno (Firmenich, Cotia, São Paulo, Brasil) solubilizado e de 5,5% sulfato de cobre (Microsal, Capivari, São Paulo, Brasil) (referida como LACTOMIX) e da mistura composta de 95,5% de ácido cítrico, de 1,0% de *d*-Limoneno solubilizado e de 3,5% de sulfato de cobre⁴ (referida como CITROMIX). O *d*-Limoneno foi solubilizado em Tween-80 (Beraca Ind e Com Ltda, São Paulo, São Paulo, Brasil) a uma concentração final de 50%. Os grupos de controle receberam somente água. Os graus de pureza dos ácidos láctico e cítrico usados foram de 85% e 50% respectivamente. As percentagens das concentrações dos tratamentos indicadas neste texto referem-se ao produto comercial diluído em água potável. A Tabela 1 resume as concentrações e as durações dos consumos dos tratamentos em cada experimento.

A unidade experimental para os Experimentos I e II foi uma ave e foram feitas 16 e 8 repetições por tratamento, respectivamente. A unidade experimental para o Experimento III foi uma gaiola com duas aves cada, sendo as medições feitas individualmente por ave e, após, foram calculadas e utilizadas as médias de cada unidade experimental como resultado. O Experimento III constou de 8 repetições por tratamento.

Aves

Os frangos, independentes de sexo, submetidos aos tratamentos nas idades entre 40 e 44 dias, foram obtidos de lotes de corte avaliados aos 28 dias de idade para ausência de *Salmonella spp.* através de cultivo convencional de suabes de arrasto. Os frangos, na idade de 36 dias, foram re-allocados em uma granja para adaptação ao novo sistema de bebedouros, onde permaneceram pelo período de 2 a 6 dias, quando foram transferidos para um infectório, onde permaneceram por mais dois dias até serem submetidos aos tratamentos. No período final de 4 a 8 dias, as aves receberam ração peletizada sem adição de promotores de crescimento ou antibióticos. No infectório, as aves foram alojadas em gaiolas modificadas pela colocação de piso de madeira coberto por maravalhas, criando condições para que houvesse a possibilidade de infecção fecal-oral por ingestão de cama.

Tabela 1. Concentração e duração do consumo dos diferentes tratamentos nos três experimentos. ^A

Tratamentos	Experimento I ^B	Experimento II ^C	Experimento III ^D
LACTO	0,470%	0,350%	0,470%
LACTOMIX	0,506%	-	-
CITRO	-	0,800%	0,800%
CITROMIX	0,800%	0,400%	0,400%
Duração do Consumo	8 Horas de Jejum	8 Horas de Jejum	Últimas 24 horas de arraçoamento e 8 Horas de Jejum

^A Todos os experimentos foram controlados por grupo de aves que receberam água sem aditivo.

^B n = 16 repetições de uma ave por tratamento.

^C n = 8 repetições de uma ave por tratamento.

^D n = 8 repetições de duas aves por tratamento.

Inoculação

Os inóculos foram constituídos de culturas de 12 horas em caldo tripticase de soja (DIFCO, Sparks, MD, EUA) (TBS) de uma amostra de SE resistente ao ácido nalidíxico (*Salmonella* Enteritidis NA^r) gentilmente cedida pelo Dr. Paul Barrow, AFRC Institute for Animal Health (Berkshire, Reino Unido). O número de unidades formadoras de colônia (ufc) dos inóculos foi determinado através da contagem de colônias do cultivo de diluições seriadas em placas de ágar verde brilhante (Becton, Dickinson and Co., Franklin Lakes, NJ, EUA) contendo 40 µg/mL de novobiocina (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e 25 µg/mL de ácido nalidíxico (Sigma Aldrich) (BGN NO-NA).

As aves, provenientes da granja de adaptação, foram inoculadas duas vezes diretamente no inglúvio com 1 mL do inóculo, contendo $10^{8,96 \pm 0,22}$ ufc de SE. A primeira inoculação foi realizada na transferência para o infectório, 48 horas antes de iniciar o período de jejum. A segunda foi feita no início do período de jejum, 8 horas antes do sacrifício.

Coleta dos inglúvios e procedimentos laboratoriais

As aves foram retiradas das gaiolas e colocadas em uma caixa de transporte após 7 horas e 15 minutos do início de jejum e da última inoculação, permanecendo na caixa durante 45 minutos, simulando o tempo médio de transporte entre a granja e o abatedouro. Logo após, as aves foram sacrificadas por deslocamento cervical, os inglúvios retirados assepticamente, colocados individualmente em sacos plásticos (Whirl-pacTM, NASCO, Fort Atkinson, WI, EUA) transportados para o laboratório. Em cada saco, foram colocados 10 mL de uma solução fisiológica estéril de cloreto de sódio (0,85%) e, imediatamente, os sacos foram processados em um misturador Stomacher (Seward Medical, Londres, Inglaterra) durante 1 minuto. Uma alíquota de 0,5 mL desta mistura foi diluída em série decimal em tubos contendo 4,5 mL de solução fisiológica até a diluição de 1:100.000. Um volume de 0,10 mL de cada uma das diluições decimais e, adicionalmente, 0,50 mL da diluição 1:10, foram plaqueadas na superfície de BGN NO-NA. As placas foram incubadas durante 24 horas a uma temperatura de 37° C e as ufc foram contadas. Algumas colônias foram confirmadas através dos testes bioquímicos de Uréia (Merck, Darmstadt, Alemanha) Lisina (Merck), Tríplice Açúcar Ferro (Merck) e Indol (Laborclin, São José dos Pinhais, Paraná, Brasil).

O pH do homogeneizado de Inglúvio foi medido eletronicamente com o potenciômetro (Quimis, Diadema, São Paulo, Brasil) logo após a retirada da alíquota para a diluição seriada.

Análise estatística

Os números de SE recuperados do Inglúvio foram transformados em logaritmos na base 10 antes das análises e estão expressos em \log_{10} de ufc. Os dados foram analisados através de Análise de Variância (PROC GLM), em blocos completamente casualizados, representado pelo modelo: Variável = Média da variável + efeito dos blocos + efeito dos tratamentos + erro experimental, sendo que, para a comparação entre as médias de pH e de ufc, foi utilizado o teste de Tukey. Para as médias de consumo de água, foi usado o PROC LSMEANS do programa SAS Versão 6.12 (SAS Institute, Cary, NC, EUA).

5.1.3 Resultados

O pH da água de controle e das soluções de ácido no momento da preparação estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. pH da água e das diferentes soluções dos tratamentos imediatamente após a preparação.

Tratamentos	pH
LACTO 0,470%	2,71
LACTOMIX 0,506%	2,88
LACTOMIX 0,350%	3,11
CITRO 0,800%	2,52
CITROMIX 0,800%	2,73
CITROMIX 0,400%	2,69
CONTROLE (ÁGUA)	7,28

Experimento I

O pH e o número de ufc de SE recuperadas do inglúvio dos frangos submetidos aos tratamentos com 0,470% de LACTO, 0,506% de LACTOMIX e 0,800% de CITROMIX na água de bebida durante o período de jejum pré-abate, não foram estatisticamente diferentes das aves controles ($p>0,05$) (Tabela 3). Os frangos submetidos ao tratamento 0,470% de LACTO e os frangos Controle tiveram um consumo de água superior ($p<0,05$) aos frangos tratados com 0,506% de LACTOMIX e 0,800% de CITROMIX (Tabela 3).

Tabela 3. Efeito da acidificação da água de bebida durante o jejum pré-abate de 8 horas no pH e na colonização do inglúvio por SE no Experimento I. ^A

Grupos	<i>Salmonella</i> ^B (Log ₁₀ /inglúvio)	pH do inglúvio ^B	Consumo ^C (mL/ave)
Controle	3,81 ± 1,16 ^a	6,21 ± 0,68 ^a	94,6 ± 29,5 ^a
LACTO 0,470% ^D	3,02 ± 1,24 ^a	5,53 ± 1,01 ^a	82,4 ± 52,7 ^a
LACTOMIX 0,506% ^E	3,74 ± 1,03 ^a	6,03 ± 0,59 ^a	37,7 ± 59,5 ^b
CITROMIX 0,800% ^F	3,70 ± 1,44 ^a	5,76 ± 0,70 ^a	41,7 ± 43,7 ^b

^A Letras diferentes dentro da mesma coluna indicam diferença estatística ($p<0,05$)

^B Médias ± desvio padrão de 16 frangos

^C Médias ± desvio padrão do consumo de água de 8 frangos em mL/ave no período pré-abate

^D LACTO = ácido láctico

^E LACTOMIX = 92,9% ácido láctico, 1,6% d-Limoneno e 5,5% sulfato de cobre

^F CITROMIX = 95,6% ácido láctico, 1% d-Limoneno e 3,5% sulfato de cobre

Experimento II

O pH e o número ufc de SE recuperadas do inglúvio dos frangos submetidos aos tratamentos com 0,350% de LACTO e 0,400% de CITROMIX na água de bebida durante o período de jejum pré-abate, não foram diferentes dos frangos controles ($p>0,05$). Os frangos tratados com 0,800% de CITRO tiveram o número de ufc de *Salmonella* recuperada

do inglúvio reduzido ($p < 0,05$) em relação aos frangos controles e aos tratados com 0,350% de LACTO. Não foram detectadas diferenças estatísticas no pH do inglúvio dos frangos oriundos dos diferentes tratamentos ($p > 0,05$). Todos os grupos experimentais consumiram volume menor ($p < 0,05$) de água comparativamente ao controle (Tabela 4).

Tabela 4. Efeito da acidificação da água de bebida durante o jejum pré-abate de 8 horas no pH e na colonização do inglúvio por SE no Experimento II. ^A

Grupos	<i>Salmonella</i> ^B (Log ₁₀ /inglúvio)	pH do inglúvio ^B	Consumo ^C (mL/ave)
Controle	3,79 ± 0,43 ^b	6,28 ± 0,42 ^a	91,5 ± 67,8 ^a
LACTO 0,350% ^D	3,93 ± 0,68 ^b	6,18 ± 0,79 ^a	25,3 ± 27,7 ^b
CITRO 0,800% ^E	2,67 ± 0,70 ^a	5,57 ± 0,80 ^a	39,8 ± 30,8 ^b
CITROMIX 0,400% ^F	3,47 ± 0,86 ^{ab}	6,06 ± 0,53 ^a	35,9 ± 24,7 ^b

^A Letras diferentes dentro da mesma coluna indicam diferença estatística ($p < 0,05$)

^B Médias ± desvio padrão de 8 frangos^C Médias ± desvio padrão de 8 frangos do consumo de água em mL/ave no período pré-abate.

^D LACTO = ácido láctico^E CITRO = ácido cítrico.

^F CITROMIX = 95,6% ácido láctico, 1% d-Limoneno e 3,5% sulfato de cobre

Experimento III

Os frangos tratados com 0,470% de LACTO tiveram o número de ufc de SE recuperada do inglúvio reduzido significativamente ($p < 0,05$) em relação aos frangos controles e aos tratados com 0,400% de CITROMIX. Os tratamentos com 0,800% de CITRO e 0,400% CITROMIX reduziram o número de ufc em comparação com os números obtidos dos frangos controles, porém não se diferenciaram entre si. Não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas no pH do inglúvio dos frangos oriundos dos diferentes tratamentos. Os frangos tratados com CITRO 0,800% tiveram um consumo de água menor do que os frangos controles e tratados com LACTO 0,470%; porém, não se diferenciaram dos frangos tratados com CITROMIX 0,400%. O consumo de água durante o período de jejum não apresentou diferença entre os tratamentos (Tabela 5).

Tabela 5. Efeito da acidificação da água de bebida durante o jejum pré-abate no pH e na colonização do inglúvio por SE no Experimento III. ^A

Grupos	<i>Salmonella</i> ^B (Log ₁₀ /inglúvio)	pH do inglúvio ^B	Consumo 24 Horas ^{BC} (mL/ave)	Consumo 8 Horas ^{BD} (mL/ave)
Controle	4,17 ± 0,53 ^c	5,96 ± 0,50 ^a	305,2 ± 98,6 ^a	72,0 ± 21,0 ^a
LACTO 0,470% ^E	2,17 ± 1,07 ^a	5,47 ± 0,74 ^a	308,7 ± 94,3 ^a	68,6 ± 27,7 ^a
CITRO 0,800% ^F	2,56 ± 0,95 ^{ab}	5,48 ± 0,70 ^a	197,0 ± 60,4 ^b	77,0 ± 25,5 ^a
CITROMIX 0,400% ^G	3,21 ± 1,11 ^b	5,39 ± 0,75 ^a	268,0 ± 95,9 ^{abertura}	65,0 ± 17,5 ^a

^A Letras diferentes dentro da mesma coluna indicam diferença estatística (p<0,05)

^B Médias ± desvio padrão de 8 unidades experimentais

^C Consumo de água em mL/ave durante as últimas 24 horas de arraçoamento

^D Consumo de água em mL/ave no período de jejum pré-abate^E LACTO = ácido láctico

^F CITRO = ácido cítrico^G CITROMIX = 95,6% ácido láctico, 1% d-Limoneno e 3,5% sulfato de cobre

5.1.4 Discussão

A importância da manutenção dos plantéis reprodutores de frango de corte livres de *Salmonella* com vistas ao controle deste patógeno no produto final é de importância indiscutível. Porém, a habilidade que as salmonelas têm de infectar várias espécies animais (HENZLER; OPITZ, 1992; KOPANIC *et al.*, 1994; MCALLISTER; STEELMAN; SKEELES, 1994) faz com que aumente a possibilidade de permanência da bactéria no ambiente das granjas e, em consequência, eleve a chance de obter-se lotes de frangos de corte contaminados, mesmo quando oriundos de reprodutores livres. Na avicultura brasileira, o monitoramento de *Salmonella* em lotes de frangos de corte tem sido uma prática crescente. Os lotes positivos para *Salmonella* têm recebido cuidados especiais, que vão do abate no final do turno de produção à destinação para industrialização de produtos

especiais. Mesmo assim, a existência de medidas que possam reduzir a contaminação dos produtos de lotes positivos pode representar uma importante arma na obtenção de produtos mais saudáveis.

A contaminação do produto final é decorrente, principalmente, do abate de aves contaminadas por *Salmonella*, que acabam servindo de fonte de propagação para os produtos em processamento (LILLARD, 1989). A importância do inglúvio na contaminação das carcaças tem sido descrita mais recentemente por vários pesquisadores (HARGIS *et al.*, 1995; RAMIREZ *et al.*, 1997 e CORRIER *et al.*, 1999a). Esta importância está fundamentada em três pontos básicos: no jejum pré abate, com a redução da flora produtora de ácido láctico com conseqüente redução deste ácido e aumento do pH, ocorre uma proliferação de bactérias da família *Enterobacteriaceae* (HINTON; BUHR; INGRAM, 2000); no jejum pré-abate há um aumento da ingestão de cama (CORRIER *et al.*, 1999a), a qual pode estar contaminada; no processo de evisceração pode ocorrer rompimento do inglúvio (HARGIS *et al.*, 1995). Os principais processos industriais atuais de extração do inglúvio propiciam esta contaminação, seja por rompimento ou extravasamento de seu conteúdo. Assim, a busca de um sanitizante que possa reduzir a presença de *Salmonella* no inglúvio imediatamente antes do abate é uma importante medida na diminuição do número de carcaças contaminadas (BARNHART *et al.*, 1999).

Byrd *et al.* (2001) demonstraram a redução do pH no inglúvio de aves submetidas ao tratamento com ácido acético (0,5%), ácido láctico (0,5%) e ácido fórmico (0,5%) durante um período de jejum pré-abate de 8 horas. No presente estudo não foi possível detectar diferenças no pH do inglúvio entre os tratamentos dentro de cada experimento, apesar de, em todos os três experimentos, o pH dos grupos controle ter sido maior (diferença não significativa) do que os demais grupos. Dois fatores podem ter contribuído para a diferença entre os resultados deste estudo e os achados de Byrd *et al.* (2001). Em primeiro lugar, no trabalho de Byrd *et al.*, as informações de cinco experimentos foram analisadas em conjunto, possibilitando o número de 40 repetições por tratamento e, conseqüentemente, elevando a sensibilidade da análise. No presente trabalho a análise de cada experimento foi independente, pois os tratamentos foram diferentes em cada experimento, resultando um número inferior de repetições. Também, Byrd *et al.* (2001) fizeram a medição do pH *in situ*, ou seja, através da incisão do inglúvio e a colocação do

eletrodo diretamente em contato com a mucosa do órgão. No presente trabalho, o pH foi determinado no homogeneizado do inglúvio com solução fisiológica e o processo de homogeneização pode ter liberado substâncias tamponantes intracelulares, influenciando assim os resultados.

O consumo de água acidificada durante o período de jejum tem sido uma das limitações encontradas para a aplicação de substâncias na descontaminação do inglúvio. No Experimento I, os tratamentos LACTOMIX 0,506% e CITROMIX 0,800% provocaram uma redução do consumo de água. No Experimento II reduziu-se a concentração de ácido láctico e Citromix com o objetivo de normalizar o consumo de água no período de jejum baseando-se nos achados de Byrd *et al.* (2001) que reduziram a concentração de ácido láctico em relação a um experimento prévio e não encontram diferença de consumo de água ao comparar dois aviários tratados com ácido láctico a 0,44% contra dois aviários controles. Esta estratégia não foi efetiva, pois todos os tratamentos deprimiram o consumo de água. No caso do ácido láctico em específico, observou-se uma diminuição do consumo de água e uma redução do efeito bactericida quando se comparam os resultados do Experimento I com os do Experimento II.

No Experimento III, também com o objetivo de normalizar o consumo de água no jejum, adotou-se a estratégia de iniciar o fornecimento dos tratamentos enquanto as aves ainda tivessem acesso à ração, ou seja, quando a necessidade de ingestão de água é maior. Para tanto, iniciou-se a administração dos tratamentos 24 horas antes do começo do período de jejum. Esta estratégia foi efetiva, não havendo diferenças de consumo de água no período de jejum entre os tratamentos e o controle. Esta constatação confirma observações não publicadas de que as aves, após algum tempo de exposição, tendem a adaptar-se ao consumo de uma substância estranha. Também, com o objetivo de superar a diminuição do consumo dos tratamentos, Barnhart *et al.* (1999) colocaram uma mistura de ácido cítrico e *d*-Limoneno em cápsulas de gelatina e obtiveram uma redução de SE no inglúvio quando a administração das cápsulas foi limitada aos últimos 45 minutos do período de jejum pré-abate.

A redução do consumo de água no período de jejum e, conseqüentemente, dos tratamentos, influenciou a capacidade dos ácidos em diminuir o número de SE viáveis no inglúvio. Nos três experimentos, sempre que houve redução do consumo de água na

comparação dos grupos de tratamentos em relação aos grupos de controle, não foi possível detectar diferenças no número de SE recuperadas do ingluvío entre os tratamentos e seus controles. Por outro lado, sempre que não houve diferença no consumo de água, teve-se diferenças nos números de SE recuperados. Para esta última afirmativa, uma exceção se apresenta no Experimento I, quando os dados de todos os tratamentos e controle são analisados em conjunto. Nesse Experimento, as aves submetidas ao tratamento LACTO 0,470% tiveram o consumo semelhante ao das aves do grupo controle e não apresentaram diferença no número de salmonelas recuperado. Porém, retirando-se os tratamentos LACTOMIX 0,506% e CITROMIX 0,800% da análise estatística e comparando-se isoladamente o grupo controle com o grupo LACTO 0,470%, observa-se uma redução no número de salmonelas recuperadas ($p < 0,01$).

Resultados de experimentos *in vitro*, conduzidos previamente por estes autores (dados não apresentados), indicaram que a adição de *d*-Limoneno e sulfato de cobre ao ácido cítrico aumentou a capacidade de reduzir a recuperação de SE deste ácido. Os resultados obtidos nos Experimentos I e II demonstraram que a adição de *d*-Limoneno e sulfato de cobre aos ácidos láctico e cítrico (LACTOMIX e CITROMIX) não reproduziu os achados observados nos experimentos *in vitro*. Já no Experimento III, mesmo com a concentração de CITROMIX reduzida pela metade, porém com o consumo de água considerado normal, observou-se uma redução no número de SE recuperadas do ingluvío. Estas constatações levam a concluir presuntivamente que a não reprodução do efeito potencializador da adição de *d*-Limoneno e sulfato de cobre verificado *in vitro* possa dever-se à redução do consumo de água observada nos dois primeiros experimentos e, juntamente com o aumento da ação do LACTO 0,470%, causando queda na recuperação da SE, observada entre os Experimentos I e III, reforçam a conclusão do benefício em antecipar o início da administração dos ácidos para 24 horas antes do começo do período de jejum.

O tratamento LACTO 0,470%, junto com a estratégia de iniciar-se a administração 24 horas antes do início do jejum, proporcionou uma redução de 2 Log₁₀ (4,17 para 2,17 Log₁₀) na recuperação de SE do ingluvío, representando uma diminuição de 99% no número destas bactérias. Uma diminuição desta monta no número de células contaminantes presentes no ingluvío poderá representar uma redução de produtos contaminados no final do processo de industrialização.

Os resultados obtidos neste estudo sugerem que o uso de ácido láctico ou cítrico na água de bebida, durante o jejum pré abate, tem efeito redutor sobre a recuperação de SE do inglúvio das aves. A antecipação do início da administração destes ácidos para as 24 horas que antecedem ao início e a manutenção desta administração durante o jejum, podem ser medidas auxiliares na redução de contaminação por SE do inglúvio de frangos.

Agradecimentos

Agradecemos à Sadia S.A. e à Btech Tecnologias Agropecuárias e Comércio Ltda pelo apoio material e técnico propiciados à execução deste trabalho, bem como aos funcionários do Laboratório Central da Sadia S.A. pelo o auxílio na condução dos experimentos.

Referências

- ANÔNIMO. Salmonellosis control: the role of animal and product hygiene. Relatório do Comitê de Especialistas da Organização Mundial da Saúde. **Série de Relatórios Técnicos** número 774. Geneva, Suíça. 1988.
- BARNHART E.T. *et al.* Evaluation of potencial disinfectants for preslaughter broiler crop decontamination. **Poultry Science**, v. 78, p. 32-37, 1999.
- BYRD J.A. *et al.* Effect of lactic acid administration in the drinking water during preslaughter feed withdrawal on *Salmonella* and *Campylobacter* contamination of broilers. **Poultry Science**, v. 80, p. 278-283, 2001.
- CORRIER D.E. *et al.* Presence of *Salmonella* in the crop and ceca of broiler chickens before and after preslaughter feed withdrawal. **Poultry Science**, v. 78, p. 45-49, 1999a.
- CORRIER D.E. *et al.* Survival of *Salmonella* in the crop contents of market-age broilers during feed withdrawal. **Avian Diseases**, v. 43, p. 453-460, 1999b.
- HARGIS B.M. *et al.* Evaluation of the chicken crop as a source of *Salmonella* contamination for broiler carcasses. **Poultry Science**, v. 74, p. 1548-1552, 1995.
- HENZLER D.J., OPITZ H.M. The role of mice in the epizootiology of *Salmonella* Enteritidis infection on chicken layer farm. **Avian Diseases**, v. 36, p. 625-631, 1992.
- HINTON JR. A., BUHR R.J., INGRAM K.D. Physical, chemical, and microbiological changes in the crop of broiler chickens subjected to incremental feed withdrawal. **Poultry Science**, v. 79, p. 212-218, 2000.
- HUMPHREY T.J. *et al.* Influence of feeding patterns on artificial infection of laying hens with *Salmonella* Enteritidis phage type 4. **The Veterinary Record**, v. 132, p. 407-409, 1993.
- HUMPHREY, T.J. Contamination of egg shell and contents with *Salmonella* Enteritidis: a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 21, p.31-40, 1994.
- KOPANIC R.J. Jr, Sheldon B.W., Wright C.G. Cockroaches as vectors of *Salmonella*: Laboratory and field trials. **Journal of Food Protection**, v. 57, p. 125-132, 1994.
- LILLARD H.S. Factors affecting the persistence of *Salmonella* during the processing of poultry. **Journal of Food Protection**, v. 52, p. 829-832, 1989.
- MCALLISTER J.C., STEELMAN C.D., SKEELES J.K. Reservoir competence of the lesser mealworm (Coleptera: Tenebrionidae) for *Salmonella* Typhimurium (Eubacteriales: Enterobacteriaceae). **Journal of Medical Entomology**, v. 31, p. 369-372, 1994.
- POPPE, C. *Salmonella* infections in domestic fowl. In: C. Wray & A. Wray, **Salmonella in Domestic Animals**. Wallingford: CABI Publishing. 2000.

POTTER M.E. The changing face of food borne disease. **Journal of the American Veterinary Association**, v. 201, p. 250-253, 1992.

RAMIREZ G.A. *et al.* Effect of feed withdrawal on the incidence of Salmonella in the crops and ceca of market age broiler chickens. **Poultry Science**, v. 76, p. 654-656, 1997.

RODRIGUE, D.C.; TAUXE, R.V.; ROWE, B. International increase in *Salmonella* Enteritidis: a new pandemic? **Epidemiology and Infection**, v. 105, p. 21-27, 1990.

5.2 Effect of Acidified Drinking Water on the Recovery of *Salmonella* Enteritidis from Broiler Crops.

AVILA, L.A.F.; NASCIMENTO, V.P.; CANAL, C.W.; SALLE, C.T.P.; MORAES, H.L.S.

Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária (CDA).

Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Av. Bento Gonçalves, 8824 – Porto Alegre-RS - 91.540-000

<http://www.ufrgs.br/ppgcv/cdpa>

Keywords: Broilers, citric acid, crop, cupric sulphate, *d*-Limonene, lactic acid, organic acids, preslaughter feed withdrawal, *Salmonella* Enteritidis.

Acknowledgments:

We would like to thank Sadia S.A. and Btech Tecnologias Agropecuárias e Comércio Ltda for material and technological support, which made this work possible, as well the staff from Laboratório Central da Sadia S.A. for the assistance during field trials.

Abstract

Crop is a known source of *Salmonella* contamination during broiler carcass processing. The effect of drinking water acidification by lactic acid or citric acid or a combination of those with cupric sulfate and d-limonene in the reduction of *Salmonella* Enteritidis (SE) recovered from the crop of broilers was evaluated. Treatments were administered during the last 8 hours of preslaughter (Experiment I and II) and during the last 32 hours of preslaughter (Experiment III). It was observed that acidification reduced water intake when treatments began at preslaughter feed withdrawal, and affected the possible reducing effect of these acids on SE recovering (Experiment I and II). Water intake during preslaughter feed withdrawal was not affected when treatments began 32 hours before slaughter (Experiment III). Treatments reduced SE recovering from crop ($p < 0.05$). In Experiment III, 0,470% of lactic acid reduced the number of recovered SE in 99%. This study suggested that the addition of organic acids in the drinking water 24 hours before beginning the preslaughter feed withdrawal might reduce crop SE colonization and might be an important strategy to reduce SE contamination on broiler products during processing.

5.2.1 Introduction

Salmonella in birds is a major problem to international poultry industry because of its importance in diet intoxication, mainly caused by *Salmonella* Enteritidis (SE) Anônimo, 1988; Rodrigues *et al.*, 1999; Humphrey, 1994; Poppe, 2000).

Broiler chickens are usually submitted to preslaughter feed withdrawal to promote gastro-intestinal emptying to reduce carcass contamination during slaughter. However, Humphrey *et al.* (1993) reported more SE in the crop of laying hens submitted to feed withdrawal than broilers fed *ad libitum*. Hargis et al (1995) evaluated SE persistence in the crop and ceca of broilers experimentally inoculated, and concluded that the crop might be an important source of *Salmonella* contamination in broiler carcasses. Additionally, Ramirez et al. (1997) found that fasting increased *Salmonella* incidence in broiler crops at preslaughter, evidencing the importance of such organ in the control of carcass bacterial contamination. In relation to number of *Salmonella* cells, the incidence of crop contamination may be increased up to five fold since feed withdrawal until slaughter (Corrier *et al.*, 1999a). Recent studies showed that feed withdrawal causes changes in the crop, which are characterized by lactic acid reduction, pH increase and a consequent increase of *Salmonella* contamination (Corrier *et al.*, 1999b). According to Barnhart *et al.* (1999), an association between citric acid and *d*-Limonene should be administered during preslaughter feed withdrawal to reduce the number of pathogens in the crop. Lactic acid given in drinking water during preslaughter feed withdrawal may reduce *Salmonella* and *Campylobacter* in the crop and probably broiler carcass contamination as well (Byrd *et al.*, 2001). This work evaluated the effect of the acidification of drinking water, using lactic acid or citric acid or a combination of these with *d*-Limonene and cupric sulfate on SE recovery from the crop of artificially infected broilers.

5.2.2 Material and Methods

Experiments

Three experiments were carried out to test different concentration of lactic acid (Purac Síntese, São Paulo, São Paulo, Brazil) (LACTO) or citric acid (Tate & Lyle, Santa Rosa do Viterbo, São Paulo, Brazil) (CITRO) or a mix composed of 92.9% of lactic acid,

1.6% soluble *d*-Limonene (Firmenich, Cotia, São Paulo, Brazil) and 5,5% of cupric sulphate (Microsal, Capivari, São Paulo, Brazil) (LACTOMIX) and a mix compose of 95.5% of citric acid, 1.1% of soluble *d*-Limonene and 3.5% of cupric sulphate (CITROMIX). *d*-Limonene was diluted in Tween-80 (Beraca Ind e Com Ltda, São Paulo, São Paulo, Brazil) to a final concentration of 50%. For each experiment one control group of birds received only pure water (additive-free water). Purity levels of lactic acid and citric acids were 85% and 50%, respectively. Such percentages a related to the commercial product diluted in drinking water. Table 1 summarizes the intake period and concentration of each experimental treatment.

Table 1. Concentration of additives and intake period in each experiment. ¹

Treatments (%)	Experiment I ²	Experiment II ³	Experiment III ⁴
LACTO ⁵	0.470	0.350	0.470
LACTOMIX ⁶	0.506	-	-
CITRO ⁷	-	0.800	0.800
CITROMIX ⁸	0.800	0.400	0.400
Intake period	Feed withdrawal (8h)	Feed withdrawal (8h)	24 hours before feed withdrawal and during feed withdrawal (8h)

¹ All experiments had a control group of birds receiving additive-free water.

² n = 16 repetitions of one bird per treatment.

³ n = 8 repetitions of one bird per treatment.

⁴ n = 8 repetitions of two birds per treatment.

⁵ LACTO – lactic acid;

⁶ LACTOMIX – 92.9% lactic acid + 1.6% soluble *d*-Limonene + 5.5% of cupric sulphate;

⁷ CITRO – citric acid;

⁸ CITROMIX – 95.5% citric acid + 1.0% soluble *d*-Limonene + 3.5% of cupric sulphate.

In Experiments I and II, each bird was the experimental unit and it was used 16 and 8 repetitions per treatment. In Experiment III, there were 9 repetitions per treatment and a cage with two birds was used as experimental unit with individual evaluation.

Birds

Sex-mixed broilers were submitted to treatments from 40 to 44 days of age. All birds were originated from broiler chickens lots evaluated at 28 days of age for the absence of *Salmonella spp.* Using drag-swab sampling. Broilers with thirty-six day-old were housed in a poultry house for 2 to 6 days to adapt to the drinker system. They were then transferred to an infection room and were kept for two more days or until the beginning of the experimental period. At the end of this period (4-8 days), birds were fed pellet diet without antibiotics or growth promoters. In the infection room, birds were placed in cages with wood floor covered with wood shavings as litter material.

Inoculation

Inoculums of nalidixic acid-resistant SE (*Salmonella* Enteritidis NA¹), kindly provided by Dr. Paul Barrow (AFRC Institute for Animal Health, Berkshire, UK), were prepared, with bacteria growing in tryptic soy broth (Difco, Sparks, MD, USA) (TSB) for 12 hours. The number of colony forming units (cfu) was determined by plate count of cultures serially diluted, using brilliant green agar (Becton, Dickinson and Co., Franklin Lakes, NJ, USA) plates with 40 µg.mL⁻¹ of novobiocin (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) and 25 µg.mL⁻¹ of nalidixic acid (Sigma Aldrich) (BG NO-NA).

Adapted birds were inoculated twice directly in the crop with 1 mL of inoculums containing $10^{8.96 \pm 0.22}$ cfu of SE. The first inoculation was done when birds were transferred to the infection room (48 hours prior to feed withdrawal), and the second inoculation was performed at the beginning of the fasting period (8 hours before slaughter).

Crop sampling and procedures

Birds were taken from experimental cages and placed in boxes. They were kept in the boxes for 45 minutes to simulate the time spent with transportation from the poultry farm to the slaughterhouse. Afterwards, birds were slaughtered by cervical dislocation. Crops were aseptically removed, individually placed in plastic bags (Whirl-pac, NASCO, Fort Atkinson, WI, USA), and taken to the laboratory. Immediately after addition of 10 mL of sterile saline (0.85% NaCl) to the bags, crops were homogenized in a Stomacher for 1 minute. Homogenate aliquots (0.5 mL) were serially diluted in a 10-fold series using test tubes containing 4.5 mL of saline until a dilution rate of 1:100,000. One volume of 0.10 mL of each dilution and 0.50 mL of 1:10 dilute were plated in BG NO-NA surface. Plates were incubated at 37°C for 24 h and the number of colony forming units was determined. Some colonies were confirmed by the biochemical tests of urease (Merck, Darmstadt, Germany), lysine (Merck), triple sugar-iron (Merck) and indole (Laborclin, São José dos Pinhais, Paraná, Brazil).

The pH of the homogenized crop was measured using an electronic potentiometer (Quimis, Diadema, São Paulo, Brazil) just after sampling for serial dilution.

Statistical analysis

Raw data of SE recovered from the crop were transformed into log 10 base and expressed in \log_{10} of cfu. Transformed data were submitted to analysis of variance with the GLM procedure (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA, 1998) in completely randomized blocks design, according to the following model: variable = overall mean for the variable + block effect + treatment effect + experimental error. Means of pH and cfu were compared by Tukey's test. Water intake (volume expressed as mL/bird during the preslaughter period) was compared using Ls means procedure (SAS, 1998).

5.2.3 Results

The pH values of plain water and freshly prepared acid solutions are presented in Table 2.

Table 2. pH of water and freshly prepares acid solution.

Treatments	pH
0.470% LACTO	2.71
0,506% LACTOMIX	2.88
0,350% LACTOMIX	3.11
0,800% CITRO	2.52
0,800% CITROMIX	2.73
0,400% CITROMIX	2.69
CONTROL (WATER)	7.28

Experiment I

pH and SE cfu recovered from the crop of broilers receiving drinking water treated with 0.470% LACTO, 0.506% LACTOMIX and 0.800% CITROMIX at preslaughter period are not different ($p>0.05$) from control birds (Table3). Water intake was higher ($p<0.05$) in control broilers and those submitted to the 0.470% LACTO than in broilers given 0.506% LACTOMIX and 0.800% CITROMIX (Table 3).

Table 3. Water intake, crop pH and SE crop colonization in birds given acidified drinking water during an 8-hour preslaughter feed withdrawal in Experiment I.

Treatments ¹	<i>Salmonella</i> ² (Log ₁₀ .crop ⁻¹)	Crop pH ²	Preslaughter water intake ³ (mL.bird ⁻¹)
Control	3.81 ± 1.16 ^a	6.21 ± 0.68 ^a	94.6 ± 29.5 ^a
LACTO 0,470% ⁴	3.02 ± 1.24 ^a	5.53 ± 1.01 ^a	82.4 ± 52.7 ^a
LACTOMIX 0,506% ⁵	3.74 ± 1.03 ^a	6.03 ± 0.59 ^a	37.7 ± 59.5 ^b
CITROMIX 0,800% ⁶	3.70 ± 1.44 ^a	5.76 ± 0.70 ^a	41.7 ± 43.7 ^b

¹ different letter within columns is different (p<0,05) by Tukey's test.

² Means ± SD (n=16 birds).

³ Means ± SD (n=8 birds).

⁴ LACTO – lactic acid.

⁵ LACTOMIX – 92.9% lactic acid + 1.6% soluble *d*-Limonene + 5.5% of cupric sulphate.

⁶ CITROMIX – 95.5% citric acid + 1.0% soluble *d*-Limonene + 3.5% of cupric sulphate.

Experiment II

pH and SE cfu recovered from the crop of broilers receiving drinking water treated with 0.350% LACTO and 0.400% CITROMIX during preslaughter feed withdrawal were not different (p>0.05) from control. Broilers of the 0.800% CITRO treatment had reduced (p<0.05) number of *Salmonella* cfu recovered from the crop compared to the control and to the 0.350% LACT treatment. There no statistical differences (p>0.05) in crop pH values among treatments. All experimental groups had lower (p<0.05) water intake than the control group (Table 4).

Table 4. Water intake, crop pH and SE crop colonization in birds given acidified drinking water during an 8-hour preslaughter feed withdrawal in Experiment II

Treatments ¹	<i>Salmonella</i> ² (Log ₁₀ .crop ⁻¹)	Crop pH ²	Preslaughter water intake ³ (mL.bird ⁻¹)
Control	3.79 ± 0.43 ^b	6.28 ± 0.42 ^a	91.5 ± 67.8 ^a
LACTO 0,350% ⁴	3.93 ± 0.68 ^b	6.18 ± 0.79 ^a	25.3 ± 27.7 ^b
CITRO 0,800% ⁵	2.67 ± 0.70 ^a	5.57 ± 0.80 ^a	39.8 ± 30.8 ^b
CITROMIX 0,400% ⁶	3.47 ± 0.86 ^{ab}	6.06 ± 0.53 ^a	35.9 ± 24.7 ^b

¹ Different letters within columns are different (p<0,05) by Tukey's test.

² Means ± SD (n=8 birds).

³ Means ± SD (n=8 birds).

⁴ LACTO – lactic acid.

⁵ CITRO – citric acid.

⁶ CITROMIX – 95.5% citric acid + 1.0% soluble *d*-Limonene + 3.5% of cupric sulphate.

Experiment III

In the 0.470% LACTO treatment, broilers had lower (p<0.05) cfu of recovered SE than those of the control group and the 0.400% CITROMIX treatment. The treatments 0.800% CITRO and 0.400% CITROMIX reduced the number of recovered SE cfu compared to the control group, but there was no difference (p>0.05) between the treatments. Concerning crop pH of broilers from different treatments, no statistical differences (p>0.05) were observed. Broilers treated with 0.800% CITRO had similar water intake to those treated with 0.400% CITROMIX, but had lower intake than the control group and the 0.470% LACTO treatment. During the preslaughter period, water intake was similar among broilers of different treatments (Table 5).

Table 5. Water intake, crop pH and SE crop colonization in birds given acidified drinking water during an 8-hour preslaughter feed withdrawal in Experiment III

Treatments ¹	<i>Salmonella</i> ² (Log ₁₀ .crop ⁻¹)	Crop pH ²	24 hours water intake ^{2,4} (mL.bird ⁻¹)	8 hours water intake ^{2,4} (mL.bird ⁻¹)
Control	4.17 ± 0.53 ^c	5.96 ± 0.50 ^a	305.2 ± 98.6 ^a	72.0 ± 21.0 ^a
LACTO 0,470% ⁵	2.17 ± 1.07 ^a	5.47 ± 0.74 ^a	308.7 ± 94.3 ^a	68.6 ± 27.7 ^a
CITRO 0,800% ⁶	2.56 ± 0.95 ^{ab}	5.48 ± 0.70 ^a	197.0 ± 60.4 ^b	77.0 ± 25.5 ^a
CITROMIX 0,400% ⁷	3.21 ± 1.11 ^b	5.39 ± 0.75 ^a	268.0 ± 95.9 ^{ab}	65.0 ± 17.5 ^a

¹ Different letters within columns are different (p<0,05) by Tukey's test.

² Means ± SD (n=8 birds).

³ Water intake (mL.bird⁻¹) in the last 24 hours of feeding.

⁴ Water intake (mL.bird⁻¹) during preslaughter feed withdrawal.

⁵ LACTO – lactic acid.

⁶ CITRO – citric acid.

⁷ CITROMIX – 95.5% citric acid + 1.0% soluble *d*-Limonene + 3.5% of cupric sulphate.

5.2.4 Discussion

It is essential to maintain a *Salmonella*-free environment in poultry facilities to avoid broiler carcass contamination. However, the ability of this bacterium to infect many different animal species (Henzler & Optiz, 1992; Kopanic *et al.*, 1994; McAllister *et al.*, 1994) increases the possibility of its persistence in the environment of poultry facilities and, consequently, the chance of broiler contamination even when they are originated from *Salmonella*-free breeders. In the Brazilian poultry industry, *Salmonella* monitoring in broiler houses is an increasing practice and special care during slaughtering have been adopted. This practice represents an important decision to obtain healthier products.

The contamination of final products is caused mainly by the slaughter of *Salmonella*-infected birds, which become a source of transmission to products that are being processed (Lillard, 1989). Many reports (Hargis *et al.*, 1995; Ramirez *et al.*, 1997;

Corrier *et al.*, 1999a) have described the importance of the broiler crop in carcass contamination, which is related to three basic facts: first, preslaughter feed withdrawal causes a reduction in the bacteria responsible for lactic acid production, which increases crop pH and proliferation of *Enterobacteriaceae* bacteria (Hinton *et al.*, 2000); second, during the preslaughter period, litter intake increases (Corrier *et al.*, 1999a), which might enhance the possibility of contamination; third, during the evisceration process, crop might be disrupted (Hargis *et al.*, 1995). The major part of the industrial processes used for crop collection promote carcass contamination due to crop disruption or leaking of the crop content. Thus, it is important to find a disinfectant to reduce *Salmonella* contamination in the crop immediately before slaughter and, consequently, the number of contaminated carcasses (Barnhart *et al.*, 1999).

Byrd *et al.* (2001) reported crop pH reduction in birds submitted to 0.5% acetic acid, 0.5% lactic acid and 0.5% formic acid treatments for 8 hours during preslaughter feed withdrawal. In our study there were not statistical differences in crop pH between treatments and control groups, although pH values showed a higher trend in control compared to the treated birds. In Byrd *et al.* (2001) study the data of five experiments were analyzed all together, resulting 40 repetitions per treatment and, consequently, increasing analysis sensitivity. In the present study, statistical analysis was carried out for each experiment treatments in each experiment, and thus, the number of repetitions was smaller. Also, Byrd *et al.* (2001) measured pH *in situ*, through a crop incision where electrode was placed in direct contact with the mucosa. In our work, pH was determined in the crop homogenized with saline, and homogenization might have released intracellular buffering substances, which might affected the results.

The low intake of acidified water during preslaughter feed withdrawal has been considered a disadvantage in using such substances for crop decontamination. In Experiment I, the treatments 0.506% LACTOMIX and 0.800% CITROMIX showed reduced water intake. In Experiment II, lactic acid concentration in LACTO and CITROMIX treatments was reduced trying to normalize water intake during preslaughter, similarly to Byrd *et al.* (2001), who reduced lactic acid from one experiment to the other and found no difference in water intake, when birds treated with 0.44% lactic acid were compared with control. This approach resulted in no benefit in our study, because water

intake was reduced in treated groups. Specially, lactic acid decreased when data of Experiments I and II were compared.

In Experiment III, another strategy was used to normalize water intake at pre-slaughter fasting. Treatments began before preslaughter fasting, when birds were still being fed and thus, when water requirement was still higher. Therefore, acidified water was administered 24 hours earlier than the beginning of the fasting period. This strategy had a good result because there was no difference in water intake between treated and control birds. Barnhart *et al.* (1999) were also interested in avoiding the reduction in water intake due to treatment. They offered a combination of citric acid and *d*-Limonene in gelatin capsules, and crop SE was reduced when capsules were fed in the last 45 minutes of preslaughter feed withdrawal.

The reduced water intake during the preslaughter feed withdrawal and the consequent decrease in acid intake reduced the effect that the acids might have in the number of viable SE in the crop. In the three experiments, the reduced water intake was associated to the lack of difference in the number of SE recovered from the crop between the treated and control groups. On the other hand, when water intake was not affected, differences in number of recovered SE were seen, except for Experiment I, when all data from treated and control groups was analyzed together. In this case, birds submitted to the 0.470% LACTO treatment had water intake similar to control birds, but there were no differences in the number of recovered *Salmonella*. However, when the 0.506% LACTOMIX and the 0.800% CITROMIX treatments and the control group were compared only to the 0.470% LACTO treatment, the number of recovered *Salmonella* was reduced ($p < 0.01$).

Recent *in vitro* experiments of our laboratory (unpublished data) indicated that the addition of *d*-Limonene and cupric sulphate to citric acid increased the ability to reduce SE recovery. Results from Experiments I and II demonstrated that the addition of *d*-Limonene and cupric sulphate to citric and lactic acids (LACTOMIX and CITROMIX) did not show similar findings than the *in vitro* study. In Experiment III, even with half concentration of CITROMIX, water intake was normal and was observed a reduction in the number of SE recovered from crop. Thus, we can conclude that the amplification effect of *d*-Limonene and cupric sulphate addition, as seen *in vitro*, could not be repeated due to the reduction in

water intake and the increased effect of 0.470% LACTO, which reduced the recovery of SE in the crop in all the experiments. These findings confirm the benefit of starting the administration of acids 24 hours before the beginning of the preslaughter feed withdrawal.

The 0.470% LACTO treatment, administered 24 hours before starting the preslaughter feed withdrawal, reduced SE recovery from the crop in 2 Log₁₀ (from 4.17 to 2.17 Log₁₀), which means a great reduction in the number of this bacterium. Such reduction in the number of contaminant cells might also reduced final contamination by the end of industrialization process.

In conclusion, finding of this study suggested that the use of lactic acid in drinking water during preslaughter feed withdrawal has a decreasing effect on SE recovery from the crop. The addition of acids, if started 24 hours before the beginning of preslaughter feed withdrawal, might help to reduce crop contamination by SE.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O objetivo desta tese é fornecer à indústria avícola um conjunto de meios práticos para o controle do Paratifo Aviário e, conseqüentemente, para a produção de alimentos mais seguros ao consumo humano.

Os esforços empregados na busca de uma medida única e definitiva para o controle do Paratifo Aviário têm sido frustrados em função das características dos agentes e da infecção provocada. É indiscutível a importância, para o processamento de frangos de corte livres de salmonelas, da desinfecção e desinfestação dos criatórios, em conjunto com o alojamento de pintos livres dos agentes do Paratifo Aviário. Todavia, muitos sistemas de produção dependem da aquisição de pintos ou matrizes de terceiros, o que pode dificultar o controle das condições sanitárias do material recebido. Soma-se a esta dificuldade, a capacidade das principais salmonelas causadoras de Paratifo Aviário de infectarem várias espécies animais e, com isso, propiciarem que a doença se torne endêmica nos criatórios. Desta maneira, ganha força a estratégia de utilizar-se um conjunto de medidas que busquem a redução gradativa da pressão infectiva em um sistema de produção, levando a uma melhora crescente do grau de contaminação dos produtos finais disponibilizados aos consumidores. Medidas que melhorem a resistência das aves à infecção, principalmente nos primeiros dias de idade, podem desempenhar um papel muito importante na adoção da estratégia do controle gradativo do Paratifo Aviário, até que se atinja uma condição de ausência da enfermidade.

Na busca de ampliar esta resistência, foi explorado o conceito de exclusão competitiva aliado à imunização maternal dos pintos, avaliando os efeitos individuais e procurando detectar uma possível interação entre estas duas medidas. Também foram estudados os efeitos da administração de *Salmonella* Gallinarum cepa 9R sobre a infecção causada por *Salmonella* Enteritidis em pintos. Em um experimento com aves adultas, foi avaliada a proteção contra o Paratifo Aviário proporcionada pela vacinação de matrizes de frangos de corte. Paralelamente, estudou-se a utilização da acidificação da água de bebida no pré-abate em frangos de corte para a redução do grau de contaminação do ingluvío por *Salmonella* Enteritidis, como medida a ser aplicada no abate de frangos contaminados por este agente. Desta forma, o conjunto de medidas estudadas cobriu o aumento de resistência

das matrizes e dos pintos de corte, além de estabelecer uma ação paliativa para reduzir o grau de contaminação dos frangos infectados imediatamente antes do abate.

Na avaliação dos efeitos da vacinação de matrizes com uma bacterina de *Salmonella* Enteritidis, foi possível verificar que o grupo vacinado passou a apresentar título de anticorpos compatíveis com aves que receberam um estímulo imunológico específico, mantendo o nível de anticorpos até a 53^a semana de idade, quando feita a última análise. Porém, em uma análise realizada após três semanas do início do desafio por aves semeadoras, não foi possível detectar uma diferença na proteção contra *Salmonella* Enteritidis. É provável que um estudo analisando um maior número de aves e ovos férteis, durante intervalos regulares da fase produtiva da matriz, possa definir com maior precisão se a vacinação com bacterina de *Salmonella* Enteritidis confere ou não alguma proteção às matrizes contra uma infecção homóloga. A maior resistência das aves adultas exige experimentos mais extensos para que se obtenham resultados conclusivos.

Tanto a administração de flora de exclusão competitiva, como de *Salmonella* Gallinarum cepa 9R, proporcionam uma alteração positiva na resistência dos pintos à infecção provocada por *Salmonella* Enteritidis. Por outro lado, esta resistência demonstra ser dependente do número de bactérias usadas para infectar os pintos semeadores e/ou a idade dos pintos ao serem submetidos ao desafio por contato. Os efeitos das medidas testadas tornaram-se perceptíveis nos experimentos que usaram menores números de SE para infectar os pintos semeadores e, também, quando houve um retardamento de 12 ou 24 horas após a aplicação dos tratamentos para que se iniciasse o desafio por contato. Estes resultados reforçam a importância do uso de medidas de controle que impeçam ou reduzam a incubação de ovos contaminados por *Salmonella*. Não atendida essa recomendação, a propagação da doença começa logo após a eclosão, quando o ambiente propicia condições favoráveis para a multiplicação e difusão da bactéria e quando os pintos são altamente susceptíveis à infecção. Em decorrência da relação observada entre a resistência dos pintos à infecção e ao desafio artificial usado, também pode-se concluir, presuntivamente, que a condição de contaminação inicial dos pintos pode ser responsável por aumentar a variabilidade dos resultados de aplicação de medidas que aumentem a resistência inicial à infecção por salmonelas. Desta forma, medidas de higiene ao nível de produção de ovos

férteis e incubação podem ser determinantes para a redução da pressão infectiva em um sistema de produção.

A comparação feita entre experimentos semelhantes quanto aos tratamentos e desafios empregados indicam que os experimentos executados em isoladores proporcionam uma pressão infectiva maior aos pintos do que os experimentos no qual as aves são criadas em condições normais, isto é, sobre cama de maravalhas e em aviários tradicionais. Esta maior pressão infectiva pode ter encoberto parte dos efeitos das medidas testadas. Experimentos conduzidos em aviários tradicionais poderiam fornecer informações sobre a resistência dos pintos à infecção por *Salmonella* Enteritidis mais próximas da realidade vivida pelas criações comerciais. Os efeitos da imunidade passiva na proteção sistêmica dos pintos à infecção por *Salmonella* Enteritidis, que somente foram perceptíveis no 5º dia após o início do desafio e entre os pintos que não receberam o tratamento de probiótico, podem ter sido afetados pela magnitude dos desafios. O desaparecimento da proteção sistêmica no 7º dia após o desafio pode ser explicado por uma possível depleção dos anticorpos passivos disponíveis para fazerem frente à crescente pressão de infecção.

A acidificação da água de bebida dos frangos de corte, medida de fácil aplicação e baixo custo, mostrou-se efetiva em reduzir a contaminação do ingluvío por SE. Durante o período de jejum pré-abate há uma exacerbação das enterobactérias no ingluvío e, no processo industrial de evisceração deste órgão, há uma grande probabilidade que seu conteúdo contamine a carcaça, possibilitando, desta forma, que haja uma elevação no número de salmonelas na carcaça dos frangos contaminados por esta bactéria. Esta elevação no número de bactérias na carcaça aumenta a contaminação da água de resfriamento e distribui as bactérias às demais carcaças que participam deste processo. Desta maneira, a acidificação da água no pré-abate, apesar de não ser uma ação sobre a causa, pode ser uma importante medida para reduzir o nível de contaminação dos produtos finais.

Os resultados dos estudos conduzidos indicaram que o estabelecimento de uma flora de exclusão através do uso de Probióticos ou a administração de *Salmonella* Gallinarum cepa 9R aos pintos recém eclodidos provocam uma elevação de sua resistência à infecção por *Salmonella* Enteritidis. Há indícios de que a resistência é maximizada pelo maior intervalo entre a aplicação das medidas e o início do desafio.

Os estudos feitos proporcionaram uma série de novas indagações que, uma vez respondidas, poderão ser úteis na busca do controle do Paratifo Aviário e diminuição da contaminação dos produtos finais. Como, por exemplo: a) Reavaliação da imunidade passiva sobre a infecção sistêmica em aves criadas em aviários tradicionais e submetidas a desafio artificial por contato; b) Avaliação dos efeitos da imunização de matrizes sobre o número de ovos férteis contaminados por *Salmonella* Enteritidis; c) Reavaliação dos efeitos da administração de Probióticos e *Salmonella* Gallinarum cepa 9R em frangos na idade de abate e criados em aviários tradicionais; d) Determinação da probabilidade de reversão de patogenicidade da SG 9R; e) Investigação da capacidade dos frangos eliminarem a SG 9R até a idade de abate; f) Avaliação do efeito da acidificação da água de bebida diretamente no nível de contaminação dos produtos finais.

Não menos importante para o controle das salmoneloses em aves é a hipótese levantada por Bäumlér, Hargis e Tsoilis e referendada por Rabsch *et al.*, através de estudos matemáticos de dados epidemiológicos, de que a *Salmonella* Enteritidis está preenchendo um nicho ecológico deixado pela erradicação da *Salmonella* Gallinarum. A confirmação desta hipótese poderá redefinir o grau de importâncias das medidas de controle do Paratifo Aviário, provavelmente dando uma grande importância às vacinas vivas para o efetivo controle da doença.

REFERÊNCIAS

ALMONACID, S. *et al.* *Salmonella* Enteritidis risk assessment: a kinetic analysis. **Food Science**, v 67, p. 1115-1120, 2002.

ANDRETTI FILHO, R.F. *et al.* Sorovares de *Salmonella* isolados de materiais avícolas no período de 1994 a 1999. **Revista de Educação Contínua CRMV-SP**, v. 4, v. 3, p. 90-101, 2001.

AVICULTURA Industrial, vol.16, n. 3, 1998.

RELATÓRIO Anual da União Brasileira de Avicultura, 2004.

ASERKOFF, B.; SCHOROEDER, S.A.; BRACHMAN, P.S. Salmonellosis in the United States – a five years review. **American Journal of Epidemiology**, v. 92, p. 13-24, 1970.

BAILEY, J.S.; CASON, J.A.; COX, N.A. Effect of *Salmonella* in Young Chicks on Competitive Exclusion Treatment. **Poultry Science**, v. 77, p. 394-399, 1998.

BARNHART, E. T. *et al.* Effect of lactose administration in drinking water prior to and during feed withdrawal on *Salmonella* recovery from broiler crops and ceca. **Poultry Science**, v. 78, p. 211-214, 1999b.

BARNHART, E. T. *et al.* Evaluation of potencial disinfectants for preslaughter broiler crop decontamination. **Poultry Science**, v. 78, p. 32-37, 1999a.

BARROW, P.A. *Salmonella* control – past, present and future. **Avian Pathology**, v. 22, p. 631-669, 1993.

BARROW, P.A.; HASSAN, J.O.; BERCHIERI, A. Reduction in faecal excretion of *Salmonella* Typhimurium strain 98 in chickens vaccinated with live and killed *S.* Typhimurium organisms. **Epidemiology and Infection**, v. 104, p. 413-426, 1990.

BLANKENSHIP, L.C. Population dynamics of the intestinal tract. In: **Colonization Control of Human Bacterial Enteropathogens in Poultry**. San Diego, United States, Academic Press, 1991a. p. 58-75.

BLANKENSHIP, L.C. Developments in competitive exclusion to control *Salmonella* carriage in poultry. In: **Colonization Control of Human Bacterial Enteropathogens in Poultry**. San Diego, United States, Academic Press, 1991b, p. 91-104.

BLANKENSHIP, L.C. *et al.* Two-step mucosal competitive exclusion flora to diminish salmonellae in commercial broiler chickens. **Poultry Science**, v. 72, p. 1667-1672, 1993.

BÄUMLER A.J.; HARGIS B.M.; TSOLIS R.M. Tracing the origins of *Salmonella* outbreaks. **Science**, v. 287, p. 50-52, 2000.

BOYDE, E.F.; HARTL, D.L. Recent horizontal transmission of plasmid between natural populations of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. **Journal of Bacteriology**, v. 179, n. 4, p. 1622-1627, 1997.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Portaria n 126, de 03 de novembro de 1995. **Normas para Credenciamento e Monitoramento de Laboratórios de Diagnóstico das Salmoneloses Aviárias (*S. Enteritidis*, *S. Gallinarum*, *S. Pullorum* e *S. Typhimurium*)**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, n. 212, p. 1182-1184, 06 nov.1995. Seção I.

CHAMBERS, J.R.; LU, X. Probiotics and Maternal Vaccination for *Salmonella* Control in Broiler Chickens. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 11, p. 320-327, 2002.

COLIN, P.; LE GOUX, J.M.; CLEMENT, G. Field study to demonstrate the efficacy of Aviguard against intestinal *Salmonella* colonization in broilers. In: **Proceedings, Salmonella and Salmonellosis**, Ploufragan, France, 1997. p. 523-525.

COOPER, G.L. Salmonellosis – infections in man and the chicken: pathogenesis and the development of live vaccines – a review. **Veterinary Bulletin**, v. 64, n. 2, p. 123-143, 1994.

COPPEN, P.; FENNER, S.; SALVAT, G. Antimicrobial efficacy of AvGard R carcass wash under industrial processing conditions. **British Poultry Science**, v. 39, p. 229-234, 1998.

CORRIER, D.E. *et al.* Survival of *Salmonella* in the crop contents of market-age broilers during feed withdrawal. **Avian Diseases**, v. 43, p. 453-460, 1999.

CORRIER, D.E. *et al.* Effect of dietary lactose on cecal pH, bacteriostatic volatile fatty acids, and *Salmonella* typhimurium colonization of broiler chicks. **Avian Diseases**, v. 34, p. 617-625, 1990.

CORRIER, D.E. *et al.* Treatment of commercial broiler chickens with a characterized culture of cecal bacteria to reduce salmonellae colonization. **Poultry Science**, v. 74, p. 1093-1101, 1995.

COX, N.A. *et al.* Fifty percent colonization dose for *Salmonella* thyphimurium administrated orally and intracloacally to young broiler chicks. **Poultry Science**, v.69, p. 1809-1812, 1990.

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 Pathology**, v. 33, v. 2, p.133-144, 2004.

DAVISON, S. *et al.* Field observation with *Salmonella* enteritidis bacterins. **Avian Diseases**, v. 43, p. 664-669, 1999.

DOYLE, M.P.; CLIVER,D.O. *Salmonella*. **Foodborn Diseases**, p.185-204, 1990.

FEBERWEE, A. *et al.* Results of a *Salmonella* Enteritidis vaccination field trial in broiler-breeder flocks in the Netherlands. **Avian Diseases**. v. 44, p. 249-255, 2000.

GAST, R.K. Paratyphoid Infections. In: CALNEK, B.W. *et al.* **Diseases of poultry**. 10. ed. Ames: Iowa State University Press 1997. cap. 3, p. 97-121.

GAST, R.K.; STONE, H.D.; HOLT, P.S. Evaluation of the efficacy of oil-emulsion bacterins for reducing fecal shedding of *Salmonella* Enteritidis by laying hens. **Avian Diseases**, v. 37, p. 1085-1091, 1993.

GENIGEORGIS, C. Problems associated with perishable processed meats. **Food Technology**, v. 40, p. 140-154, 1986.

GORDON, W.A.M.; LUKE, D. A note on the use of the 9R fowl typhoid vaccine in poultry breeding flocks. **Veterenary Record**, v. 71, p. 926-927, 1959.

GOREN, E. *et al.* Reduction of *Salmonella* infection of broilers by spray application of intestinal microflora: a longitudinal study. **Veterinary Quarterly**, v. 6, p. 73-79, 1988.

GRIFFIN, H.G.; BARROW, P.A. Construction of an *aroA* mutant of *Salmonella* serotype Gallinarum: its effectiveness against experimental fowl typhoid. **Vaccine**, v. 11, p. 457-462, 1993.

GUARD-PETTER, J. The chicken, the egg and *Salmonella* Enteritidis. **Environmental Microbiology**, v. 3, p. 421-430, 2001.

HARGIS, B.M. *et al.* Evaluation of the chicken crop as a source of *Salmonella* contamination for broiler carcasses. **Poultry Science**, v. 74, p. 1548-1552, 1995.

HASSAN, J.O.; CURTISS, R. Development and evaluation of an experimental vaccination program using a live-avirulent *Salmonella* Typhimurium strain to protect immunized chickens against challenge with homologous and heterologous *Salmonella* serotypes. **Infection and Immunity**, v. 62, p. 5519-5527, 1994.

HASSAN, J.O.; CURTISS, R. Efficacy of a live avirulent *Salmonella* Typhimurium vaccine in preventing colonization and invasion of laying hens by *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Enteritidis. **Avian Diseases**, v. 41, p. 783-791, 1997.

HENZLER, D.J.; OPITZ, H.M. The role of mice in the epizootiology of *Salmonella enteritidis* infection on chicken layer farm. **Avian Diseases**, v. 36, p. 625-631, 1992.

HICKMAN-BRENNER, F.W.; STUBBS, A.D.; FARMER, J.J. Phage typing of *Salmonella* Enteritidis in United States. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, p. 2817-2823, 1991.

HINTON JR, A. *et al.* DELOACH, J.R. Biological control of *Salmonella typhimurium* in young chickens. **Avian Disease**, v. 34, p. 626-633, 1990.

HINTON JR., A.; BUHR, R. J.; INGRAM, K. D. Physical, chemical, and microbiological changes in the crop of broiler chickens subjected to incremental feed withdrawal. **Poultry Science**, v. 79, p. 212-218, 2000.

HINTON, M.; LINTON, A. H.; PERRY, F. G. Control of *Salmonella* by acid disinfection of chick's food. **Veterinary Record**, v. 116, p. 502, 1985.

HINTON, M.; MEAD, G. C.; IMPEY, C. S. Protection of chicks against environmental challenge with *Salmonella enteritidis* by competitive exclusion and acid treated feed. **Letter of Applied Microbiology**, v. 12, p. 69-71, 1991.

HOLT, P.S.; GAST, R.K.; KELLU-AEHLE, S. Use of a live *Salmonella* Typhimurium vaccine to protect hens against *Salmonella* Enteritidis infection while undergoing molt. **Avian Diseases**, v. 47, p. 656-661, 2003.

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

IMPEY, C.S.; MEAD, G.C. Fate of salmonellas in the alimentary tract of chicks pre-treated with a mature caecal microflora to increase colonization resistance. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 66, p. 469-475, 1989.

IZAT, A. L. *et al.* Effects of a buffered propionic acid in diets on the performance of broiler chickens and on microflora of the intestine and carcass. **Poultry Science**, v. 69, p. 818-826, 1990.

JONES, F. T. Effect of direct fed microbial compound (Primalac) on cecal and carcass *Salmonella* countd obtained from broilers experimentally infected with *Salmonella typhimurium*. **Poultry Science**, v. 69, p. 70, 1990.

KOPANIC, R.J., JR; SHELDON, B.W.; WRIGHT, C.G. Cockroaches as vectors of *Salmonella*: Laboratory and field trials. **Journal of Food Protection**, v. 57, p. 125-132, 1994.

LEE, J.A. Recent trends in human salmonellosis in England and Wales: the epidemiology of prevalent serotypes other than *Salmonella typhimurium*. **Journal of Hygiene (Cambridge)**, v. 72, p. 185-195, 1974.

LEVINE, W.C. *et al.* Foodborne disease outbreaks in nursing homes, 1975 through 1987. **Journal of Americam Medical Association**, v. 266, p. 2105-2109, 1991.

LIU, W. *et al.* Induction of humoral immune response and protective immunity in chickens against *Salmonella* Enteritidis after a single dose of killed bacterium-loaded microspheres. **Avian Diseases**, v. 45, p. 797-806, 2001.

MACALLISTER, J.C.; STEELMAN, C.D.; SKEELES, J.K. Reservoir competence of the lesser mealworm (Coleptera: Tenebrionidae) for *Salmonella* Typhimurium (Eubacteriales: Enterobacteriaceae). **Journal of Medical Entomology**, v. 31, p. 369-372, 1994.

McHAN, F.; SHOTTS, E. B. Effect of feeding selected short-chain fatty acids on the in vivo attachment of *Salmonella* typhimurium in chick ceca. **Avian Diseases**, v. 36, p. 139-142, 1992.

METHNER, U. *et al.* Combination of vaccination and competitive exclusion to prevent *Salmonella* colonization in chickens: experimental studies. **International Journal of Food Microbiology**, v. 49, p. 35-42, 1999.

MISHU, B. *et al.* Outbreaks of *Salmonella* Enteritidis infections in the United States, 1985-1991. **Journal of Infectious Diseases**, v. 52, p. 547-552, 1994.

MULLERAT, J.; KLAPES, N. A.; SHELDON, B. W. Efficacy of Salmide R, a sodium chlorite-based oxy-halogen disinfectant, to inactivate bacterial pathogens and extend shelf-life of broiler carcasses. **Journal of Food Protection**, v. 57, p. 596-603, 1994.

NAKAMURA, M. *et al.* Evaluation of the efficacy of a bacterins against *Salmonella* Enteritidis and the effect of stress after vaccination. **Avian Diseases**, v. 38, p. 717-724, 1994.

NAKAMURA, M. *et al.* The effect of killed *Salmonella* Enteritidis vaccine prior to induced molting on the shedding of *S. Enteritidis* in laying hens. **Avian Diseases**, v. 48, p. 183-188, 2004.

NASCIMENTO, V.P. *et al.* Qualidade microbiológica dos produtos avícolas. In: **II Simpósio Goiano de Avicultura**, 1996, Goiânia, Anais. Goiânia. 1996a. p. 13-17.

NASCIMENTO, V.P.; SILVA, A.B.; SALLE, C.T.P. Ocorrência de *Salmonella* sp. em carcaças de frango industrialmente processadas. In: **Conferência Apinco 1966 de Ciência & Tecnologia Avícola**, out. 1996, Curitiba: Anais da Conferência Apinco 1966 de Ciência & Tecnologia Avícola. Curitiba, 1996b. p. 81.

NISBET, D.J. *et al.* Effect of a defined continuous-flow derived bacterial culture and dietary lactose on *Salmonella typhimurium* colonization in broiler chickens. **Avian Diseases**, v. 37, p. 1017-1025, 1993.

NURMI, E.; RANTALA, M. New aspects of *Salmonella* infection in broiler production. **Nature**, v, 241, p, 210-211, 1973.

OLIVEIRA, Sílvia Dias de. **Detecção e Identificação de *Salmonella* sp., *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Gallinarum* e *S. Pullorum* através da reação em cadeia pela polimerase (PCR) em materiais de origem avícola.** Porto Alegre: UFRGS, 2000.104p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias), Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

OLSEN, J.E. *et al.* Clonal lines of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis documented by IS 200, ribo-pulsed-field gel electrophoresis and RFLP typing. **Journal Medical Microbiology**, v. 40, p. 15-22, 1994.

PALMU, L.; CAMELIN, I. The use of competitive exclusion in broilers to reduce the level of *Salmonella* contamination on the farm and at the processing plant. **Poultry Science**, v. 76, p. 1501-1505, 1997.

POPOFF, M.Y.; LE MINOR. **Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars.** 7. ed. rev. Paris: Institute Pasteur. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*, 1997, p. 1-93.

POTTER, M.E. The changing face of food borne disease. **Journal of American Veterinary Association**, v. 201, p. 250-253, 1992.

RABSCH, W. *et al.* Competitive exclusion of *Salmonella* Enteritidis by *Salmonella* Gallinarum in poultry. **Emerging Infectious Diseases**, v. 6, n. 5, p. 443-448, 2000.

RABSCH W. *et al.* Competitive Exclusion of *Salmonella* Enteritidis by *Salmonella* Gallinarum in Poultry. **Emerging Infectious Diseases**, v. 6, p. 443-448, 2000.

RABSCH, W.; TSCHAPE, H.; BÄUMLER, A.J. Non-typhoidal salmonellosis: emerging problems. **Microbes and Infection**, v. 3, p. 237-247, 2001.

RAMIREZ, G.A. *et al.* Effect of feed withdrawal on the incidence of *Salmonella* in the crops and ceca of market age broiler chickens. **Poultry Science**, v. 76, p 654-656, 1997.

RATHGEBER, B. M.; WALDROUP, A. L. Antibacterial activity of a sodium acid pyrophosphate product in chiller water against selected bacteria on broiler carcasses. **Journal of Food Protection**, v. 58, p. 530-534, 1995.

REYNOLDS, D.J. *et al.* Evaluation of combined antibiotic and competitive exclusion treatment in broiler breeder flocks infected with *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. **Avian Pathology**, v. 26, p. 83-95, 1997.

RIGBY, C. E.; PETTIT, J. R. Observation on competitive exclusion for preventing *Salmonella typhimurium* infection of broiler chickes. **Avian Diseases**, v. 24, p. 604-615, 1980.

RODRIGUE, D.C.; TAUXE, R.U.; ROWE, B. International increase in *Salmonella enteritidis*: a new pandemic? **Epidemiology and Infection**, v. 105, p. 21-27, 1990.

SANTOS, D.M.S. *et al.* *Salmonella* em carcaças de frango congeladas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 20, n. 1, p. 39-42, 2000.

SANTOS, Luciana Ruschel dos. Fagotipagem e análise por RAPD/PCR (amplificação de DNA através de iniciadores aleatórios) de amostras de *Salmonella* Enteritidis isoladas de materiais de origem avícola e de alimentos e humanos envolvidos em casos de toxinfecções alimentares. **Porto Alegre: UFRGS, 2001.10p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.**

SHEFET, S. M.; SHELDON, B. W.; KLAENHAMMER, T. R. Efficacy of optimized nisin-based treatments to inhibit *Salmonella typhimurium* and extend shelf life of broiler carcasses. **Journal of Food Protection**, v. 58, p. 1077-1082, 1995.

SILVA, E. N.; DUARTE, A. *Salmonella* Enteritidis em Aves: Retrospectiva da Situação Atual. **Anais da Conferência Apinco 2002 de Ciência e Tecnologia Avícola**, p. 215-228, 2002.

SILVA, E. N. *et al.* Studies on the use of 9R Strain of *Salmonella gallinarum* as a vaccine in chickens. **Avian Diseases**, v. 25, p. 38-52, 1981.

SNOEYENBOS, G. H.; WEINACK, O. M.; SMYSER, C. F. Protecting chicks and poult from *Salmonella* by oral administration of “normal” gut microflora. **Avian Diseases**, v. 22, p. 273-287, 1977.

SNOEYENBOS, G. H. *et al.* Large-scale trials to study competitive exclusion of *Salmonella* in chickens. **Avian Diseases**, v. 29, p. 1004-1011, 1985.

TURNBULL, P.C.B. Food poisoning with special reference to *Salmonella* – its epidemiology, pathogenesis and control. **Clinics in Gastroenterology**, v. 8, p. 663-714, 1979.

VAN DER WAL, P. *Salmonella* control of feedstuffs by pelleting or acid treatment. **Zootecnica**, v. Nov, p. 28-31, 1980.

VARNAN, A. H.; EVANS, M. G. *Salmonella* In: **Foodborn Pathogens**. Aglesbury: Wolp Publishing, 1991. p.51-85, 1991.

WALL, P.G.; WARD, L.R. Epidemiology of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis phage type 4 in England and Wales In: SAEED, A.M.; GAST, R.K.; POTTER, M.E.; WALL, P.G. **Salmonella enterica serovar Enteritidis in humans and animals – epidemiology, pathogenesis and control**. 1. ed. Ames: Iowa State University, 1999, p.19-25.

WARD, L.R. *et al.* *Salmonella enteritidis* epidemic. **Science**, v. 287, p. 1754, 2000.

WEINACK, O.M. *et al.* Therapeutic trials with native intestinal microflora for *Salmonella typhimurium* infection in chickens. **Avian Diseases**, v. 29, n. 4, p. 1230-1234, 1985.

WIERUP, M. WAHLSTRÖM, H.; ENGSTRÖM, B. Experience of a 10-year use of competitive exclusion treatment as part of the *Salmonella* control programme in Sweden. **International Journal of Food Microbiology**, v. 15, p. 287-291, 1992.

WOODWARD, M.J. *et al.* The efficacy of Selenvac, a *Salmonella enterica* subsp. Enterica serotype Enteritidis iron-restricted bacterin vaccine, in laying chickens. **Avian Pathology**, v. 31, p. 383-392, 2002.

ZHANG-BARBER, L.; TURNER, A.K.; BARROW, P.A. Vaccination for control of *Salmonella* in poultry. **Vaccine**, v. 17, p. 2538-2545, 1999.

ZIPRIN, R. L. *et al.* Colonization control of lactose-fermenting *Salmonella typhimurium* in young broiler chickens by use of dietary lactose. **American Journal of Veterinary Research**, v. 51, p. 833-837, 1991.

ZIPRIN, R.L.; CORRIER, D.E.; DELOACH, J.R. Control of established *Salmonella typhimurium* intestinal colonization with in vivo-passaged anaerobes. **Avian Diseases**, v. 37, p. 183-188, 1993.