

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS  
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS  
UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE  
COLONIZAÇÃO E TRÂNSITO INTESTINAL DE *Salmonella* Enteritidis E  
*Salmonella* Typhimurium EM FRANGOS DE CORTE NO PRÉ ABATE

GRAZIELA PEREIRA PESTANA DE CASTRO

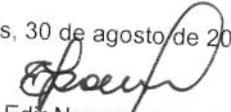
ORIENTADOR: PROF. DR. EDIR NEPOMUCENO DA SILVA

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da  
Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de mestre  
em Tecnologia de Alimentos

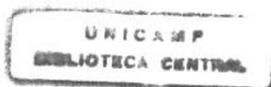
PARECER

Este exemplar corresponde à  
redação final da tese defendida por  
Graziela Pereira Pestana de Castro  
aprovada pela Comissão Julgadora  
em 30 de agosto de 2000.

Campinas, 30 de agosto de 2000.

  
Prof. Dr. Edir Nepomuceno da Silva  
Presidente da Banca

Campinas, SP  
2000



200016 272

UNIDADE	3c
N.º CHAMADA:	T/UNICAMP
	C279c
V.	Ex.
TOMBO BC/	42895
PROC.	16-278100
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREC.º	R\$11,00
DATA	24/10/00
N.º CPD	

CM-00147024-6

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA F.E.A. - UNICAMP

C279c

Castro, Graziela Pereira Pestana de  
Colonização e trânsito intestinal de *Salmonella* Enteritidis  
e *Salmonella* Typhimurium em frangos de corte no pré abate  
/Graziela Pereira Pestana de Castro. – Campinas, SP: [s.n.],  
2000.

Orientador: Edir Nepomuceno da Silva  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de  
Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. *Salmonella* Enteritidis. 2. *Salmonella* Typhimurium.  
3. Frango de corte. 4. Stress (Fisiologia) I. Silva, Edir  
Nepomuceno da. II. Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

## BANCA EXAMINADORA



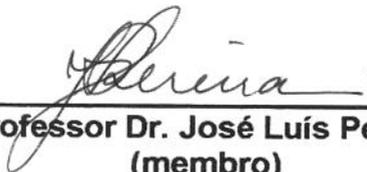
---

**Professor Dr. Edir Nepomuceno da Silva**  
(orientador)



---

**Professor Dr. Mauro Faber Freitas Leitão**  
(membro)



---

**Professor Dr. José Luís Pereira**  
(membro)

---

**Professor Dr. Pedro Eduardo de Felício**  
(suplente)

**AOS**  
**MEUS PAIS, JOÃO ROBERTO E VERA**  
**pela minha formação**  
**e exemplo de vida**

**AO JAIRO,**  
**pelo amor, incentivo e confiança**

**DEDICO E AGRADEÇO**

## AGRADECIMENTOS

- A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a existência deste trabalho, e em especial:
- Ao **Prof. Edir** sou grata, pela forma que conduziu o trabalho, pela minha formação profissional, pela compreensão da minha necessidade de conhecer outras atividades mesmo que isto tenha prejudicado o andamento do nosso trabalho, pela amizade e confiança depositada.
- Ao **Departamento de Tecnologia de Alimentos (UNICAMP)**, em especial aos professores Dr. Mauro Leitão e Dr. Pedro Felício, pela correção e sugestões na boneco de tese e ao Prof. Serrano (*in memoriam*) pela introdução da microbiologia de alimentos na minha formação e auxílio durante a parte prática do trabalho.
- Ao **Tio Fernando**, pelo estímulo na minha decisão de cursar o mestrado e pela correção e sugestões na redação do trabalho.
- Ao **Laboratório de Higiene de Alimentos (DTA/ FEA/ UNICAMP)**, e todos os alunos que como eu lá desenvolveram seus trabalhos e dividiram os bons momentos em especial a Raquel, a Dirce e a D. Jacinta.
- A **Profa. Irenilza (FEAGRI/ UNICAMP)**, pelo espaço cedido para alojar as aves.
- A **Predileto Pena Branca**, por ter gentilmente cedido as aves e a ração para o experimento.
- A **Tech-Lab Análises**, pelo espaço cedido para os experimentos da segunda fase do trabalho e aos funcionários pelo incentivo.
- Aos amigos e colegas do curso da Unicamp, em especial C athia, Luciana, Enilene, M arcia, Viviane, Manuela e a Ana Paola. E a Carolina, pela colaboração, incentivo e paciência no decorrer do trabalho.

# ÍNDICE

	páginas
<b>RESUMO</b>	i
<b>ABSTRACT</b>	iii
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	01
<b>2. OBJETIVOS</b>	03
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	
3.1 Características da <i>Salmonella spp</i>	04
3.2 Importância da <i>Salmonella spp</i> para a saúde pública e avicultura	06
3.2.1 Fatores responsáveis pela colonização por <i>Salmonella spp</i> nas aves	12
3.2.2 Controle na colonização da <i>Salmonella spp</i> nas aves	16
3.3 A susceptibilidade de frangos no pré-abate à colonização por salmonelas	20
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b>	
4.1. Aves experimentais utilizadas	25
4.2. Culturas de salmonelas	26
4.2.1. Desenvolvimento de cepas mutantes resistentes ao ácido nalidíxico e novobiocina	26
4.2.2. Inoculação das aves	28
4.2.2.1. Inóculo e enumeração	28
4.3. Experimentos	28
4.3.1. Redução da colonização intestinal e excreção fecal de frangos experimentalmente inoculados com <i>S. Enteritidis</i> (S.E.) e tratados com soro de leite desidratado na concentração de 5% de lactose	30

4.3.1.1. Colonização intestinal de frangos experimentalmente inoculados com $4,7 \times 10^5$ ufc de S.E.	32
4.3.1.2 Colonização intestinal de frangos experimentalmente inoculados com $2,1 \times 10^5$ ufc de S.E.	33
4.3.1.3 Colonização intestinal de frangos experimentalmente inoculados com $1,0 \times 10^3$ ufc de S.E.	33
4.3.1.4. Colonização intestinal de frangos experimentalmente inoculados com $1,3 \times 10^5$ ufc de S.E.	34
4.3.1.5 Colonização intestinal de frangos experimentalmente inoculados com $1,1 \times 10^5$ ufc de S.E.	34
4.3.1.6. Colonização intestinal de frangos experimentalmente inoculados com $4,1 \times 10^8$ ufc de S.E.	34
4.3.1.7 Colonização intestinal de frangos experimentalmente inoculados com $3,3 \times 10^7$ ufc de S.E.	35
4.3.2. Infecção experimental de pintos inoculados oralmente com $5,5 \times 10^5$ ufc	35
4.3.3. Colonização intestinal de frangos experimentalmente inoculados com $2,2 \times 10^8$ ufc de S.E. após tratamento com antibiótico	35
4.3.4. Cinética do trânsito da S.E. e S.Typhimurium (S.T.), Nal <sup>R</sup> após inoculação experimental via oral em aves de 35 dias de idade	37
4.3.4.1. Colonização e o trânsito gastrintestinal de S.E. Nal <sup>R</sup> em aves com 35 dias de idade e a interferência do estresse sobre a colonização	40
4.3.4.2. Colonização e o trânsito gastrintestinal de S.E. Nal <sup>R</sup> em aves com 35 dias de idade e a interferência do estresse sobre a colonização	40
4.3.4.3. Colonização e o trânsito gastrintestinal de S.E. Nal <sup>R</sup> em aves com 35 dias de idade e a interferência do estresse sobre a colonização	40
4.3.4.4. Colonização e o trânsito gastrintestinal de S.T. Nal <sup>R</sup> em aves com 35 dias de idade e a interferência do estresse sobre a colonização	41

<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	42
5.1. Colonização intestinal de frangos de 35 dias de idade alimentados com ração adicionada de 5% de lactose e oralmente inoculados com 1,0 ml de S.E.	43
5.2. Ganho de peso corporal durante o período de teste, de frangos de 35 dias de idade alimentados com ração adicionada de 5% de lactose e oralmente inoculados com 1,0 ml de suspensão de S.E. contendo de $10^3$ a $10^8$ ufc/ml. Resultados dos experimentos 2º, 3º, 5º, 6º, 7º e 9º	49
5.3. Inoculação de pintos de um dia com 0,1ml de suspensão de S.E. contendo $5,5 \times 10^6$ ufc sobre a colonização cecal	51
5.4. Colonização intestinal de frangos de 35 dias de idade alimentados com ração adicionada de 5% de lactose e oralmente inoculados com 1,0 ml de S.E. contendo $2,2 \times 10^8$ ufc após serem previamente tratados com antibiótico flumequina via água de bebida	54
5.5. Efeito do estresse por jejum hídrico e alimentar na recuperação de S.E. do trato intestinal e sistêmica de frangos de 35 dias oralmente inoculados com 1,0 ml de S.E. contendo $10^8$ ufc do agente	55
5.6. Efeito do estresse por jejum hídrico e alimentar na recuperação de S.E. do trato intestinal e sistêmica de frangos de 35 dias oralmente inoculados com 1,0 ml de S.E. contendo $10^8$ ufc do agente	59
5.7. Efeito do estresse por jejum hídrico e alimentar na recuperação de S.T. do trato intestinal e sistêmica de frangos de 35 dias oralmente inoculados com 1,0 ml de S.T. contendo $10^8$ ufc do agente	61
<b>6. CONCLUSÕES</b>	64
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	66
<b>8. APÊNDICE</b>	79

## LISTA DE TABELAS

	páginas
<b>TABELA 01.</b> Experimentos realizados para a determinação da colonização intestinal de aves inoculadas experimentalmente com cepas mutantes de S.E. respectivamente resistentes ao ácido nalidixico (Nal <sup>R</sup> ) e ácido nalidixico e novobiocina (Nal/Nob <sup>R</sup> )	29
<b>TABELA 02.</b> Experimentos realizados para o estudo do trânsito gastrintestinal da S.E. Nal <sup>R</sup> e S.T. Nal <sup>R</sup> em aves com 35 dias de idade experimentalmente inoculadas e submetidas ou não ao estresse	39
<b>TABELA 03.</b> Recuperação da S.E. em diferentes períodos pós inoculação, de frangos de 35 dias de idade alimentados com ração contendo 5% de lactose e oralmente inoculados com 1,0 ml de suspensão de S.E. contendo de 10 <sup>3</sup> a 10 <sup>8</sup> ufc/ml. Resultados dos experimentos 1º ao 7º e 9º.	44
<b>TABELA 04.</b> Resultados do tratamento de frangos de 35 dias de idade com ração adicionada de 5% de lactose e oralmente inoculados com 1,0 ml de suspensão de S.E. contendo de 10 <sup>3</sup> a 10 <sup>8</sup> ufc sobre o peso corporal. Resultados dos experimentos 2º, 3º, 5º, 6º, 7º e 9º.	50
<b>TABELA 05.</b> Análise comparativa do ganho de peso corporal durante o período experimental de frangos de 35 dias de idade alimentados com ração adicionada de 5% de lactose e oralmente inoculados com 1,0 ml de suspensão de S.E. contendo de 10 <sup>3</sup> a 10 <sup>8</sup> ufc	51
<b>TABELA 06.</b> Resultados do cultivo de cecos após 96 horas da inoculação oral de pintos de um dia com 0,1 ml de suspensão de S.E. Nal <sup>R</sup> contendo 5,5x10 <sup>6</sup> ufc	53
<b>TABELA 07.</b> Resultados da recuperação da S.E. do trato intestinal e sistêmica de frangos de 35 dias oralmente inoculados com 1,0 ml de S.E. Nal <sup>R</sup> contendo 10 <sup>8</sup> ufc de S.E., em aves sem estresse e após terem sofrido estresse por jejum hídrico e alimentar	58

**TABELA 08.** Resultados da recuperação da S.E. do trato intestinal e sistêmica de frangos de 35 dias oralmente inoculados com 1,0 ml de S.E. Nal<sup>R</sup> contendo 10<sup>8</sup> ufc de S.E, em aves sem estresse e após terem sofrido jejum hídrico e alimentar 60

**TABELA 09.** Resultados da recuperação da S. Typhimurium (S.T.) do trato intestinal e sistêmica de frangos de 35 dias oralmente inoculados com 1,0 ml de S.T. Nal<sup>R</sup> contendo 10<sup>8</sup> ufc de S.T., em aves sem estresse e após terem sofrido jejum hídrico e alimentar 63

## Resumo

A contaminação de carcaças de frangos por salmonelas está diretamente relacionada ao nível de contaminação com que a ave viva entra no abatedouro. Nestes experimentos, procurou-se estudar a dinâmica do trânsito de salmonelas no intestino de frangos no pré-abate, o efeito do uso de lactose (5% na ração) no controle da colonização intestinal, e o efeito da destruição da microbiota intestinal com o uso de antibiótico. Em alguns experimentos, os frangos eram estressados por meio de restrição de água e ração. Foram utilizadas *Salmonella* Enteritidis (S.E.), *S. Typhimurium* (S.T.) e frangos com 35 dias de idade. Frangos de criação comercial livres de salmonelas eram infectados oralmente com 1,0 ml de suspensão de cultura de salmonela. O efeito dos tratamentos sobre o ganho de peso corporal foi medido pela diferença de ganho de peso das aves dos diferentes grupos no período experimental de uma semana. O uso de lactose apenas afetou a consistência das fezes e apresentou uma pequena influência sobre o ganho de peso corporal. Em algumas situações, aves dos grupos inoculados, ganharam menos peso que as do grupo controle. A ação da lactose na redução das salmonelas não foi possível avaliar pois o agente não se instalou. Frangos de 35 dias de idade foram incapazes de estabelecer uma infecção intestinal por S.E. ou S.T. detectável 24 horas após infecção com doses que variavam de  $10^3$  a  $10^8$  ufc por ml da cultura. O estresse hídrico e alimentar propiciou um ligeiro aumento na colonização intestinal e redução da velocidade de excreção do agente do trato gastrintestinal da ave. O uso do antibiótico flumequina por três dias consecutivos e posterior inoculação de  $10^8$  ufc de S.E. (três dias após interrupção do tratamento) não favoreceu a colonização intestinal mesmo com sua microbiota protetora natural desestabilizada pelo antibiótico. Após 30 minutos da inoculação, os frangos apresentavam intensa contaminação do inglúvio que translocava rapidamente para os cecos já na segunda hora, com queda rápida desta colonização. Somente neste período de duas horas era possível reisolar S.E. do fígado de algumas aves. O papo e os cecos apresentaram maior intensidade de colonização.

As cepas de salmonelas mantinham intensa capacidade de colonização intestinal quando inoculadas em pintos de 1 dia de idade. Estes dados sugerem que a infecção de frangos de 35 dias de idade e criados comercialmente é auto-limitante e que permanece por menos de 24 horas no trânsito intestinal destas aves.

## Abstract

The contamination of poultry carcasses by *Salmonella* is directly related to the contamination levels presented by the chickens when it enters the slaughterhouse. The experiments presented here aimed to the study of the dynamics of *Salmonella* in the bowells of chickens before slaughtering, including the effect of lactose in the diet (5% in the food) and the destruction of the intestinal microbial community by antibiotic use. In some experiments, the poultry were stressed out by feed and water withdrawal. Thirty-five-day old birds, raised commercially and salmonella-free, were infected by *Salmonella* Enteritidis (S.E.), *S. Typhimurium* (S.T.) by oral inoculation of 1,0 ml of bacterial suspension. The effect of different treatments on the chickens weight was measured by comparing their weights after one week from the beginning of the different treatments. The lactose effect seen only noticed to the consistency of the feces and had little effect on the weight gain. In some cases, the chickens from the inoculated groups had a smaller weight gain in comparison to the control group. It was not possible to evaluate the effect of lactose in the reduction of *Salmonella* population, because the infection did not take place after the inoculation. S.E. or S.T. did not induce the development of infection, detectable in 24h, in 35-day old birds, after inoculation of suspensions with concentrations ranging from  $10^3$  to  $10^8$  cfu/ml. The water and nutritional stresses evoked a slight increase in the bowell colonization and reduction of the excretion of the infectious agent from the gastrointestinal tract of the chicken.

Previous treatment of birds with the antibiotic flumequine for three consecutive days, followed by inoculation with  $10^8$  cfu.suspension of S.E., did not enhance the intestine colonization by the agent, even with the intestinal microbial community "unstabilized" by the antibiotic. The chicken presented intense contamination of the ingluvío 30 minutes past the inoculation and fast translocation of the pathogens to the caecum in the second hour post inoculation, with rapid decrease of the colonization process. Only in that period of two hours ( a 2h period was enough) was possible to reisolate S.E. from the liver of some chickens. The crop and caecum were under the most intense colonization by the pathogen. The *Salmonella* strains retained the ability to colonize intensively the

intestines of the poultry, when inoculated in 1-day old chicks. These data suggest that the infection of 35-day old birds, commercially grown, is self-limiting and stays for at least 24 h in the intestines of these birds.

# 1. INTRODUÇÃO

As salmonelas sempre estiveram entre os principais agentes de toxinfecção de origem alimentar. Nos últimos anos, a ocorrência da salmonelose humana tem aumentado em todo o mundo, com predominância de sorovares que não eram usuais como a *Salmonella*. Enteritidis (S.E.).

Os alimentos de origem animal, em especial os de origem avícola, como ovos e carne frango, são apontados como importantes veiculadores de infecções humanas por salmonelas nos últimos anos.

O considerável aumento do número de surtos por S.E. detectados pode ser consequência do aumento do consumo de carne de frango, uma vez que há, também, um aumento do número de S.E. isoladas de frangos.

As aves de criação industrial apresentam índices elevados de contaminação por salmonelas. Excetuando os sorovares específicos (*S. Pullorum* e *S. Gallinarum*), esta contaminação raramente afeta a produtividade da ave, que funciona como um reservatório assintomático.

Sabe-se que a infecção das aves por salmonelas, está relacionada a uma série de fatores, entre eles, a idade do hospedeiro, o estresse, a dose infectante, o sorovar, o tipo de alimento (presença de aditivos), as diferenças genéticas e a sanidade geral das aves.

O processo tecnológico de abate das aves não garante um produto final livre de salmonelas, podendo, no máximo, reduzir os níveis de contaminação das carcaças e suas partes. Os níveis de contaminação das carcaças de frangos por salmonelas em todo o mundo estão, geralmente, acima de 20%.

Esforços no desenvolvimento de medidas de controle da colonização intestinal das aves, podem resultar em uma ave com menos salmonelas ao entrar no abatedouro.

Teoricamente, a garantia total de isenção de salmonelas na matéria prima (carcaças e partes) seria dada pela introdução de aves livres de salmonelas no abatedouro. Portanto, em se conseguindo uma redução da contaminação da ave viva, conseqüentemente, um menor número de bactérias seria introduzido no abatedouro.

Na criação industrial são utilizados processos que, de uma forma indireta, auxiliam na redução da contaminação dos frangos por salmonelas, como a compra de aves livres, o uso contínuo de aditivos químicos nas rações, conhecidos como promotores de crescimento e a adoção de medidas higiênicas gerais.

O uso de lactose na alimentação das aves tem sido proposto, também, como uma forma de redução da colonização intestinal por salmonelas. Geneticamente as aves não produzem a enzima lactase, desta maneira a lactose funciona, para as aves, como uma substância probiótica alimentando as bactérias lácticas intestinais como os *Lactobacillus* e as *Bifidobactérias*. Além do abaixamento do pH, desta fermentação são resultantes vários compostos com ação sobre a colonização intestinal por salmonelas.

O estresse a que está sujeito o frango do momento da captura até o abate, em aves infectadas por salmonelas, pode provocar a translocação da bactéria do intestino para os órgãos comestíveis como o fígado o que dificultaria, em muito, sua eliminação durante o processo industrial de abate.

Deste modo, este trabalho teve como alvo estudar alguns fatores que podem influenciar na colonização intestinal de frangos, aumentando ou diminuindo a contaminação das carcaças por salmonelas, como: efeito da lactose administrada aos frangos antes do abate, administração de antibióticos, efeito do estresse hídrico e alimentar no período do pré-abate.

## 2. OBJETIVOS

- 2.1. Avaliar o efeito da lactose, no controle da colonização intestinal por *Salmonella* Enteritidis (S.E.) em frangos antes do abate.
- 2.2. Verificar a capacidade de colonização intestinal de S.E. em pintos de um dia e frangos de corte no pré-abate.
- 2.3. Avaliar o uso terapêutico prévio de antibiótico na colonização intestinal por S.E. em frangos de corte.
- 2.4. Avaliar a dinâmica da S.E. e *Salmonella* Typhimurium (S.T.) no trato gastrointestinal e sua capacidade invasiva em aves adultas criadas comercialmente.
- 2.5. Avaliar o efeito do jejum hídrico e alimentar, ao qual as aves são submetidas no pré-abate, sobre a colonização intestinal de S.E. e S.T..

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. CARACTERÍSTICAS DA *Salmonella* spp

O gênero *Salmonella*, pertencente à família Enterobacteriaceae, é composto por bacilos gram negativos, não esporulados, anaeróbios facultativos, móveis, possuindo flagelos peritríquios, salvo duas exceções, as da *S. Pullorum* e *S. Gallinarum* que são imóveis.

Possuem a capacidade de reduzir nitrato a nitrito, produzir gás a partir da fermentação da glicose e sulfeto de hidrogênio a partir do ágar TSI (Triple sugar iron), não hidrolizando a uréia, utilizando citrato como única fonte de carbono na presença de uma fonte inorgânica de nitrogênio. Fermentam o manitol, mas não metabolizam a lactose, exceto a *S. Arizona*, não produz indol a partir do triptofano é fenilalanina negativos, descarboxilando a lisina e a maioria dos sorovares descarboxilam ornitina (BERGEY'S, 1984; TRABULSI, 1991; KONEMAM et alii, 1993).

O gênero *Salmonella* spp é assim denominado em homenagem ao microbiologista americano D. E. Salmon (KONEMAM et alii, 1993).

Sua classificação e nomenclatura são complexas, e vêm sofrendo constantes modificações ao longo dos anos. Inicialmente, as salmonelas eram divididas em sorotipos; posteriormente, foram reunidas no gênero *Salmonella*, e divididos nos sub – gêneros I,II, III, IV por Kauffmann, incluindo a *S. arizona* no sub gênero III. Já Edwards & Ewing classificaram o gênero *Salmonella* em três espécies, *S. choleraesuis*, *S. typhi*, S.E., sendo que, nesta última, encontravam-se os mais de 2.200 sorovares descritos na época. Nesta classificação a *S. Arizona* não estava inclusa. LE MINOR e colaboradores, em uma nova classificação, incluíram todas as salmonelas, inclusive a *Arizona*, em uma única espécie (*Salmonella choleraesuis*), com seis sub espécies: *choleraesuis*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae*, *bongori*. Recentemente, Farmers e associados, juntamente com o Subcomitê Internacional de Taxonomia das Enterobacteriaceae consideraram que todas as espécies e subgrupos de *Salmonella* e

Arizona deveriam ser classificadas em apenas duas espécies: *S. enterica* (isolada de animais de sangue quente) e *S. bongori* (isolada de animais de sangue frio). Portanto, a espécie *S. entérica* incluiria a sub-espécie entérica e o respectivo sorovar, podendo ser escrito na forma abreviada apenas a espécie e o sorovar em letra maiúscula como por exemplo *S. Typhimurium* (S.T.) ou *S. Enteritidis* (S.E.) (BERGEY'S, 1984; LE MINOR & POPOFF, 1987; TRABULSI, 1991; KONEMAM et alii, 1993; ANDREATTI Fº, 1997).

A divisão do gênero *Salmonella* em tipos sorológicos (sorotipagem) é feita segundo o esquema de Kauffmann & White baseando-se na identificação dos antígenos somáticos e flagelares, representados por números e letras de acordo com a sua composição antigênica e seus antígenos somático "O", capsular "Vi" (*S. Typhi*) e flagelar "H". Os antígenos somáticos são representados por números arábicos e caracterizam os sorogrupos, os antígenos flagelares são representados por letras minúsculas do alfabeto e por números arábicos, podendo ocorrer em uma fase (monofásica) ou duas fases (bifásicas), ou mesmo não possuir antígeno flagelar "H", como é o caso da: *S. Pullorum* e *S. Gallinarum* (BERGEY'S, 1984; TRABULSI, 1991; KONEMAM et alii, 1993).

Atualmente, existem mais de 2400 sorovares identificados de *Salmonella*, sendo que alguns são considerados hospedeiro específicos como são os casos da *S. Typhi* e *S. Paratyphi* que causam doenças no homem, *S. Gallinarum* e *S. Pulum* que acometem aves, produzindo o tifo aviário e a pulorose respectivamente, *S. Dublin* em bovinos, *S. Cholerae-suis* em suínos e a S.T. e S.E. em camundongos (BARROW, 1998; BARROW, 1999). Os demais sorovares não causam doença sistêmica no homem, quando saudável, mas devido à capacidade de colonizar o intestino de animais domésticos, em especial aves, eles entram na cadeia alimentar produzindo intoxicação alimentar no homem (BARROW, 1998).

### 3.2. IMPORTÂNCIA DA *Salmonella spp* PARA A SAÚDE PÚBLICA E AVICULTURA

Nos últimos 20 anos é incontestável o aumento da incidência de surtos de salmoneloses, devido à *Salmonella spp* ser o principal agente etiológico de infecção alimentar humana (STAVIC & D'AOUST, 1993; TIETJEN & FUNG, 1995; SILVA, 1999).

O histórico da salmonelose é antigo, sendo que o primeiro isolamento do agente responsável data de 1888 em uma infecção alimentar ocorrida na Alemanha, em que a bactéria foi isolada de fezes humanas. A epidemiologia da salmonelose pode ser dividida em três períodos de acordo com as características das infecções, o primeiro entre 1800 a 1949 caracterizado pela febre tifóide, causada pela *S. Typhi*. As décadas de 50 e 60, quando as infecções por esta bactéria foram mais raras porém começaram a aparecer infecções com características de gastroenterite, e a partir de 1970, que aumentou a incidência de salmonelose humana não-tifóide caracterizada pela ingestão de alimentos contaminados (TIETJEN & FUNG, 1995).

A prioridade no combate à *Salmonella* é consequência do aumento do número de casos; apenas no período de 1983 -1987 a *Salmonella* foi responsável por 68,4% de surtos, 6.249 casos e 7 mortes, seguido de longe pelo *Clostridium botulinum* com 14,8% surtos, 28 casos e 2 mortes (ZEIDLER, 1996).

Atualmente o *Campylobacter jejuni* é o microrganismo responsável pelo maior número de surtos em alguns países. No entanto, as salmonelas, devido sua gravidade e as intensas perdas sociais, continuam tendo uma importância maior, e permanecem como foco das pesquisas e controles de saúde pública (ALTEKRUSE, et alii, 1999; SILVA, 1999).

No Reino Unido por exemplo, de 10.000 casos de salmoneloses no ano de 1981, houve um aumento para 27.693 casos em 1991 (BARROW, 1992). Nos Estados Unidos, no período entre 1988 e 1995, o número de casos de salmoneloses (exceto febre tifóide) variou entre 40.000 a 50.000 casos ano (FDA, / CFSAN Bad Bug Book – *Salmonella spp*, <http://vm.cfsan.fda.gov/~mow/chap1.html>).

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE

Dentre mais de 2400 sorovares descritos, responsáveis pelas infecções conhecidas como paratifóides, os S.E. e S.T. se destacam como de maior repercussão e importância para a saúde pública e para a avicultura; estes sorovares correspondem a ¾ das salmonelas, relacionadas com infecções alimentares (BARROW, 1992; BARROW, 1993; SILVA, 1995; BARROW et alii, 1998; HUMPHREY, 1998; BARROW, 1999).

Até o final dos anos 80, a S.T. era considerada o sorovar de maior incidência, associado às doenças em frangos e no homem. No final dos anos 80, sorovares menos frequentes começaram a surgir, como a S.E. que apareceu isoladamente como o sorovar predominante em isolados de alimentação humana (BARROW, 1992; MCILROY, 1996; NAVARRO, 1996). Apenas entre 1990 e 1995, nos Estados Unidos foram constatados 293 surtos alimentares envolvendo S.E. com 10.253 pessoas doentes e 46 óbitos (<http://vm.cfsan.fda.gov/~mow/saltable.html>).

A contaminação de alimentos com salmonelas está relacionada a diferentes vias de transmissão como: leite, produtos lácteos, ovos, produtos derivados de frangos, peixe, camarão, coco, temperos, molhos de saladas, sobremesas, coberturas de sobremesas, gelatina, cacau, chocolate, entre outros (TIETJEN & FUNG, 1995; FDA,/ CFSAN Bad Bug Book – *Salmonella spp*, <http://vm.cfsan.fda.gov/~mow/chap1.html>), mas alimentos de origem animal e, principalmente, os produtos avícolas apresentam uma maior incidência (HINTON, 1992; BARROW, 1992).

No momento, a S.E., que é o sorovar que prevalece clinicamente em humanos, está associado tanto ao consumo de ovos contaminados, alimentos infectados pelo ovo ou produtos de carne de frango, como ao aumento do mercado de aves além da capacidade de transmissão transovariana do agente (GAST & BEARD, 1990; GORHAM, 1991; GAST, & BEARD, 1992; BAILEY, 1993; GAST, 1993; POPPE, 1996 ; NAVARRO, 1996; COX, 1996).

De acordo com o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), no período entre janeiro de 1998 e janeiro de 1999, frangos se constituíram na principal

via de transmissão de salmonela de produtos cárneos não processados, compreendendo 63,5%, seguido da carne moída de peru com 23,5%. O sorovar isolado com maior frequência de frangos foi Kentucky com 31,8%, Heidelberg com 16,8%, Typhimurium (var. Copenhagen) com 7,2%, Typhimurium 7,0%, sendo que o sorovar Enteritidis ocupou a nona posição com 2,4%. Os sorovares isolados com maior intensidade de carne moída foram Anatum e Hadar com respectivamente 19% e 11,9% (<http://www.fsis.usda.gov/OPHS/haccp/seroty.htm>, 1999).

Nos últimos anos, várias espécies patogênicas responsáveis por toxinfecções alimentares estão surgindo, como a *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157:H7 e a S.E.. Estes agentes estão associados à algumas adaptações, como por exemplo a S.E. ganhou a capacidade de invadir ovários de galinhas e contaminar a membrana da gema no interior da ovo (ZEIDLER,1996).

Os sintomas das pessoas infectadas por S.E. e S.T. variam de acordo com a dose infectante, o alimento envolvido, as condições do hospedeiro, sendo em geral os seguintes: diarreia, vômito, cólicas intestinais e cefaléia sendo que em casos mais graves, pode ocorrer septicemia levando ao óbito. Os sintomas podem aparecer entre 12 - 36 h após a ingestão do alimento contaminado, podendo se estender até 5 - 72 h, (BERGEY'S, 1984; ZIPRIN et alii, 1993; POPPE, 1996; FDA,/ CFSAN Bad Bug Book – *Salmonella spp*,1998).

A dose infectante capaz de produzir a doença varia com a idade, condições de sanidade do hospedeiro e virulência das cepas, não existindo uma dose específica. Alguns trabalhos registram que a dose infectante pode ser de 15-20 células (FDA,/ CFSAN Bad Bug Book – *Salmonella spp*, <http://vm.cfsan.fda.gov/~mow/chap1.html>), outros consideram  $10^6$  ou mais organismos, no entanto existem evidências de que 100-1.000 células podem causar doenças em crianças, idosos e pessoas imunodeprimidas (POPPE, 1996).

No homem, a doença ocorre na mucosa intestinal (epitélio do intestino delgado). As salmonelas atravessam a camada epitelial, aderem às células do hospedeiro,

proliferando na lâmina da própria mucosa, produzindo inflamações que irão depender da intensidade da proliferação bacteriana e da liberação de endotoxinas pela morte celular, causando enterocolite e perda de fluido intestinal. Em crianças, idosos ou pacientes imunodeprimidos, a doença pode evoluir para um quadro mais grave, em que a bactéria entra no sangue e provoca infecção em outros órgãos (FDA,/ CFSAN Bad Bug Book – *Salmonella spp*; SILVA, 1999). Na maioria dos casos, não há problemas sérios, sem necessidade de internação e antibioticoterapia, a taxa de mortalidade é baixa (em geral 0,4%) e ocorre, na maioria das vezes, com recém-nascidos ou idosos (BARROW,1992; POPPE, 1996).

Nos alimentos, a temperatura para o desenvolvimento de salmonela, é entre 5 a 47°C, sendo a temperatura ótima de 37°C; no geral são destruídas a 74°C, mas a temperatura letal depende do tipo do alimento e de suas propriedades; o pH ótimo para seu crescimento está entre 6,5 a 7,5, no entanto suporta entre 4,5 a 9,0 (SILVA, 1999).

A conservação de ovos refrigerados até o consumo, e a eliminação do preparo e consumo de alimentos à base de ovos mal cozidos ou crus, é uma das formas de reduzir a infecção por salmonelas nos humanos (POPPE, 1996).

No Brasil, apesar da dificuldade em se encontrar dados reais sobre intoxicações alimentares, pois estas não exigem notificação compulsória, tem-se notado um aumento na preocupação da população e autoridades de saúde pública. LIRIO et alii, (1998), entre janeiro de 1992 e dezembro de 1996 isolaram 140 cepas originadas de alimentos em que 70%, o sorovar isolado era S.E., 3,7% S. Agona; 2,9% S. Brandenburg, 2,9% S. Hadar e 2,9% S. Anatum. Dos alimentos envolvidos, 77,1% foram carcaças de frango "in natura" e 10% era linguiça crua. Apenas 8,6% destes alimentos foram provenientes de surtos alimentares. TAUNAY, et alii (1996), demonstraram a prevalência do isolamento do sorovar S.T. nos períodos de 1970 a 1976 no estado de São Paulo. IRINO, et alii (1996) em pesquisa realizada pelo Instituto Adolfo Lutz em São Paulo, de 574 amostras analisadas (383 de natureza humana e 191 de fonte não humana) entre o período de 1975 – 1992, relataram que 68% das amostras de S.E., pertenciam ao fagotipo PT-8 , mas no ano de 1993, 65% dos

isolados pertenciam ao fago PT-4. CARMO, et alii (1996), descreveram um surto em que o alimento envolvido foi salada de batata e a salmonela foi proveniente dos ovos utilizados para o preparo. LANGONI, et alii (1995) publicaram o isolamento de salmonelas em ovos de galinha oferecidos para o consumo no comércio de Botucatu e neste mesmo ano, ARAÚJO, et alii (1995) relataram a ocorrência de quatro surtos alimentares por S.E. em um período de 6 meses na cidade de Sorocaba – SP, em que o alimento envolvido continha produto a base de ovos. PICCOLO(1992), publicou um surto de salmonelose e novamente o alimento incriminado foi a maionese.

A salmonelose é uma zoonose de importância econômica mundial, tanto para os animais como para os humanos, causando prejuízo de bilhões de dólares aos cofres do governo. No Brasil, esta cifra é difícil de se precisar devido à falta de registros; já no Reino Unido estima-se um gasto de aproximadamente 25 milhões de dólares por ano com doenças humanas associadas às salmonelas (HASSAN & CURTISS,1994; MCILROY, 1998).

Segundo ZEIDLER (1996), estima-se que o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, gastou 3,4 milhões de dólares em programas para controle da S.E. na indústria avícola.

As aves constituem o principal reservatório de salmonelas. Para a avicultura além da questão da saúde pública, são de grande importância os sorovares S. Gallinarum e S. Pullorum que são adaptadas às aves, e determinam a severidade da doença, como o tifo aviário e a pulorose respectivamente, e morte das aves (BARROW, 1993; SILVA, 1995; POPPE, 1996).

A S.E. e a S.T., responsáveis pelas infecções paratífóides, apresentam grande tropismo pelas aves, sendo adaptadas as mesmas e quase sempre invasoras e responsáveis pela colonização do trato gastrointestinal (BARROW, 1994; SILVA, 1995; MCILROY, 1997; BARROW , 1999;). Produzem infecção de natureza subclínica nas aves adultas, e quando em equilíbrio no trato digestivo não propiciam problemas de produtividade no lote. Podem infectar o trato reprodutivo e são capazes de transmissão

vertical, transferindo assim através das aves adultas na fase de abate a bactéria para o alimento, causando doença no homem e nas aves (SILVA, 1992; NAVARRO, 1996; POPPE, 1996;).

Nos pintos, ao contrário, quando infectados o quadro clínico é: mortalidade acentuada nas duas primeiras semanas, atraso no crescimento, sonolência, redução de consumo de água, penas arrepiadas, letargia e aves agrupadas próximo à fonte de calor sendo que os sobreviventes não apresentam bom desenvolvimento. Na necropsia pós-mortem, observam-se: pus no saco da gema, petéquias no fígado, perihepatites, pericardites e focos necróticos (POPPE, 1996; NAVARRO, 1996).

Os produtos avícolas como ovos e carne de frango, estão entre os principais veículos para a infecção por salmonela no homem (HINTON, et alii, 1992; TIETJEN & FUNG, 1995; POPPE, 1996 ). O considerável aumento do número de casos deve-se ao aumento do consumo de carne de frango, juntamente com a capacidade do agente em atravessar a barreira transovariana, contaminando ovos e pintos assim como ao aumento do número de S.E. isoladas de frangos mais recentemente( BARROW, 1992).

Vários foram os autores que relataram o rápido aumento na incidência da S.E. nos últimos anos, principalmente nos produtos avícolas, refletindo um aumento nas toxinfecções alimentares ( BARROW et alii, 1990; CORRIER, 1990 ; GAST & BEARD, 1990; CORRIE et alii, 1991; GORHAM, 1991; STAVRIC, 1992; BARROW, 1992; GAST et alii 1992; COOPER, 1994; POPPE, 1996).

O aumento do número de casos de salmonelas, bem como as perdas econômicas relacionadas ao controle e tratamento de doenças nas aves está modificando o perfil da indústria avícola, que está redirecionando sua preocupação para com a qualidade dos alimentos e com a saúde humana (BARROW, 1993). O que é mais preocupante é que além do número de casos de salmonelose humana, há um aumento na gravidade da doença, com cepas mais virulentas e aparecimento de salmonelas resistentes a antibióticos (SILVA, 1999; BARROW, 1998).

A salmonela não faz parte da microbiota das aves, mas coloniza o intestino de frangos jovens e se mantém como uma infecção persistente em toda a criação (STAVRIC, 1992; citado por Pivinick & Nurmi, 1982). As aves, uma vez contaminadas, excretam o agente, contaminando o ambiente e favorecendo a contaminação cruzada e a transferência do agente para as carcaças por contaminação fecal durante o processamento (GORHAM, 1991; NAVARRO, 1996; POPPE, 1996). A S.E. surgiu como um novo sorovar, e apesar de suas características invasivas (pois pode invadir órgãos internos, como baço, vesícula biliar, pâncreas, folículos ovarianos e o oviduto), produz infecção de natureza subclínica nas aves adultas (NAVARRO, 1996; POPPE, 1996).

As vias de transmissão das salmonelas para as aves são caracterizadas como horizontal e/ou vertical. A transmissão vertical é um dos principais fatores na epidemiologia das salmoneloses, já que as aves são infectadas através da contaminação da casca do ovo via fezes, ou no seu interior através da infecção transovariana. O mecanismo de infecção transovariana colocou a S.E. como principal patógeno zoonótico (MCILROY, 1996). A transmissão horizontal é realizada através de fatores externos como: presença de roedores, ração contaminada, contaminação cruzada, circulação de pessoas, contato com aves contaminadas e manejo animal inadequado (BYRD, et alii, 1998).

Outros tipos de aves, como perus patos e gansos quando abatidos, são considerados via de transmissão de salmonela para o homem, no entanto, não representam um problema significativo devido ao seu baixo consumo, pois a grande maioria dos casos detectados de salmonela no homem estão relacionados com carcaças de frangos contaminadas (CORRIER, 1990; BARROW, 1992).

### **3.2.1. FATORES RESPONSÁVEIS PELA COLONIZAÇÃO POR *Salmonella spp* NAS AVES**

A infecção, permanência, eliminação e/ou redução das salmonelas nas aves dependem de vários fatores, como: técnicas de manejo durante a criação (COX et alii,

1997), o sorovar (GAST & BEARD, 1992; ANDREATTI F<sup>o</sup>, 1997), dose infectante (DAVIES & WRAY, 1995; HARGIS, 1995; POPPE, 1996), idade da ave (GORHAM, et alii 1991; RAMBOUSEK, 1995; POPPE, 1996), estresse (RAMIREZ, 1997), via de infecção (BARROW & LOVELL, 1991), linhagem das aves (BEAUMONT, 1996; POPPE, 1996), microbiota competidora, sanidade da ave, presença de coccidiose, sobrevivência na passagem pela barreira gastrointestinal (as aves possuem barreiras à instalação das salmonelas, como a acidez do ingluvío e do proventrículo, presença de enzimas digestivas e imunoglobulinas, formadas a partir de metabólitos produzidos pela microbiota normal) (BAILEY, 1988; SILVA, 1995), efeitos de medicação (BARROW, 1998; BARROW et alii, 1998) e uso de aditivos na ração (HINTON, 1992; BAILEY, 1993; BAILEY, 1994; POPPE, 1996).

A ração é a principal fonte de infecção por salmonela em frangos, portanto, a ração livre destes contaminantes é uma importante medida no controle da salmonelose. Nos países europeus, o monitoramento da qualidade da matéria prima animal é severo, obedecendo ao código de práticas para fabricação, estocagem, transporte e monitoramento das rações, no entanto a S.E. não é o sorovar mais isolado em matérias primas de origem animal. Em pesquisa realizada na Inglaterra em 1989, 5% das proteínas animais estavam contaminadas com salmonelas e destas apenas 10%, foram identificadas com S.E.. A eliminação e controle da S.E. é difícil devido a falhas de desinfecção, presença de roedores e insetos que exercem a função de carreadores produzindo a contaminação cruzada (HINTON et alii, 1990; MCILROY, 1996; MCILROY, 1998).

Sabe-se que a manutenção da granja assim como das rações livres de *Salmonella* é imprescindível para a sua redução na indústria avícola (STAVIC & D'AOUST, 1993). A presença de alimentação com proteínas de origem animal, ingredientes das rações contaminados, presença de roedores, aves silvestres, água contaminada, circulação de pessoas, material de cama de frango contaminado, são alguns dos responsáveis pela disseminação da salmonela na avicultura sendo o

controle destes de grande importância (MCILROY, 1996; NAVARRO, 1996; MCILROY, 1998).

Segundo a pesquisa realizada por BERCHIERI et alii (1989), foram isolados 22 sorovares diferentes de salmonelas em uma granja, sendo que as vias de transmissão foram amostras de farinha de carne, ração, fezes de roedores e cama de aves, sugerindo que a farinha de carne é a fonte que introduz a salmonela na granja disseminando-a para as aves.

O estresse ocasionado pela produção intensiva, a alta concentração de aves em determinada área, a retirada da ração antes do abate e o transporte tornam as aves mais susceptíveis à contaminação (BAILEY, 1988; COOPER, 1994).

A presença da infecção subclínica por salmonelas, não identificada nos lotes primários de reprodutores na avicultura industrial é outro fator que merece especial atenção, devendo o controle ser realizado através de monitoramento sorológico, bacteriológico e descarte de lotes contaminados (NAVARRO, 1996; POPPE 1996; DAVIES, 1996). A detecção de pintos infectados com S.E. também facilita o controle deste agente na avicultura (GAST & BEARD, 1990).

Há uma estreita relação entre a infecção por salmonelas e a idade do hospedeiro. Nos primeiros dias de vida, as aves são altamente susceptíveis à colonização por salmonela; este fato deve-se à ausência de uma microbiota natural formada, sendo que à medida que a idade do hospedeiro aumenta, esta susceptibilidade é reduzida (BARROW, 1999). Este fato pode ser observado também em relação aos sinais clínicos da doença nas aves adultas, fato este não detectado nos pintos.

Quando adultas, as aves adquirem uma microbiota intestinal mais complexa, que se infectadas excretam um menor número de bactérias, em um período menor. A S.E. e a S.T. em condições de estresse fisiológico, podem produzir uma doença sistêmica e aumento da excreção fecal (BARROW, 1999).

No experimento, desenvolvido por GORHAM, et alii (1991) é fácil verificar a importância da idade na colonização intestinal, em que pintos de um, e sete dias de idade, livres de patógenos (aves SPF), infectados com S.E.; obteve - se 74% de positividade para S.E. nos tecidos não intestinais e 92% nos tecidos intestinais nos pintos de uma dia, e 15% nos tecidos não intestinais e 38% nos tecidos intestinais nos pintos de sete dias. Outro importante resultado foi demonstrado por POPPE (1996) em que, com a inoculação de 100 ufc de salmonela, induziu infecção em 100% de pintos com dois dias de idade, mas não houve recuperação do agente em aves adultas com 4 e 8 semanas.

GAST & BEARD, 1990, verificaram elevada colonização por salmonelas em vários órgãos do trato gastrintestinal de aves adultas, sendo o ceco o órgão de maior incidência; no entanto, as aves foram criadas a partir de pintos SPF, livres de antibiótico e vacinas. Mesmo assim verificou-se a tendência de redução do agente com o tempo pós inoculação.

A colonização de salmonelas nas aves é auto limitante, verificando que, à medida em que aumenta o tempo após a inoculação a recuperação do agente é gradativamente reduzida (HARGIS et alii, 1995; ANDREATTI Fº, 1997).

HARGIS et alii, 1995, obtiveram os seguintes resultados com aves de 6 semanas de idade: com a inoculação de  $1 \times 10^6$  ufc de S.E., após dois dias da inoculação foram recuperados 30% do agente no ingluvío e 30% no ceco, e após 7 dias da inoculação, foram encontrados 3,4% no ingluvío e 0% no ceco. Quando utilizou o inóculo maior contendo  $1 \times 10^8$  ufc foram encontrados após dois dias da inoculação, 57% de amostras positivas no ingluvío e 67% no ceco e após sete dias da inoculação foram encontrados 37% no ingluvío e 57% no ceco.

### 3.2.2. CONTROLE NA COLONIZAÇÃO DA *Salmonella spp* NAS AVES

O desenvolvimento de métodos para controlar a colonização de salmonelas no trato gastrointestinal de frangos é prioridade na indústria avícola e em saúde pública (ZIPRIN et alii, 1993).

São inúmeros os trabalhos e programas existentes para o controle de salmonelas nas granjas, mantendo-as livres durante todo o seu ciclo, tais como: implementação de boas práticas de manejo, limpeza e desinfecção de galpões, compra de frangos de linhagens resistentes, monitoramento de lotes livres da infecção por salmonelas, controle de roedores, pássaros e insetos. Outras medidas seriam: prevenção da contaminação da ração e descontaminação com o uso de ração peletizada e/ou uso de aditivos, uso de sistema de água fechado, uso de exclusão competitiva imediatamente após a eclosão, uso de antibióticos, instalação de programas de vigilância bacteriológica e sorológica, permitindo um diagnóstico precoce da infecção, podendo assim quebrar o ciclo vertical por meio de descarte do lote ou seu controle (POPPE, 1996; NAVARRO, 1996).

A qualidade dos produtos avícolas segue as tendências do mercado mundial, que almeja produtos mais saudáveis e com menos riscos para o consumidor, livres de patógenos e resíduos químicos (SILVA, 1999).

O uso de aditivos na ração ou na água de bebida, como açúcares e ácidos orgânicos, assim como a administração de uma microbiota protetora responsável por uma exclusão competitiva na flora intestinal, são métodos que estão sendo exaustivamente estudados e discutidos afim de se obter uma forma natural e efetiva de controle da colonização, ou prevenir a recontaminação por salmonelas impedindo o estabelecimento de infecção nas aves (CORRIER et alii, 1990(a); CORRIER et alii, 1990(b); McHAN et alii, 1991; McHAN & SHOTTS, 1992; STAVIC&D'AOUST, 1993; COOPER, 1994; RAMBOUSEK, 1995; SILVA, 1995; MCILROY, 1996; ANDREATTI F°, 1997; PALMU & CAMELIN, 1997; BARNHART, 1999).

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE

A administração da microbiota intestinal de uma ave adulta em pintos de um dia de idade aumenta a resistência dos mesmos às salmonelas, prevenindo e reduzindo sua colonização (BAILEY, 1994; POPPE, 1996). Normalmente, animais jovens recebem uma microbiota principal de seus pais, no entanto na avicultura comercial isto não ocorre e o desenvolvimento de uma flora intestinal protetora é demorado tornando as aves susceptíveis a infecções por patógenos (SCHNEITZ, et alii 1992). BYRD, et alii (1998), verificaram que o tratamento em pintos no momento da eclosão com uma cultura de bactérias de origem cecal previne a transferência horizontal da *S. Typhimurium* pelo contato entre as aves.

A maioria dos trabalhos que tem como objetivo reduzir a colonização por salmonelas nas aves, utilizando açúcares, ácidos orgânicos e uma microbiota protetora, são realizados em pintos que não possuem uma microbiota formada, podendo se reinfetar até o momento do abate (CORRIER et alii, 1990(a); McHAN et alii, 1991).

CORRIER, et alii (1990)(b), trabalhando experimentalmente com a colonização das aves até o pré – abate, tratando-as com lactose e cultura de bactérias anaeróbias desde um dia de idade, demonstraram que o resultado foi satisfatório quanto à redução da colonização intestinal por salmonelas.

Na literatura é comum o uso de carboidratos como a lactose, manose, arabinose, galactose, fructooligosacarídeo no controle da colonização das aves por salmonelas, sendo administrados em diferentes concentrações (HINTON et alii, 1990; CORRIER et alii, 1991; DELOACH, 1995; OYARZABAL, 1996). O uso da lactose é o mais difundido. Os resultados, assim como o princípio de ação são contraditórios no que dizem respeito a sua efetividade contra a colonização por salmonelas. Alguns autores encontraram resultados favoráveis pelo uso da lactose no combate à colonização intestinal de salmonelas (CORRIER et alii, 1990; McHAN et alii, 1991) enquanto outros pesquisadores não encontraram bons resultados, quando este

carboidrato é administrado isoladamente (CORRIER et alii, 1991; WALDROUP et alii, 1992; RAMBOUSEK, 1995).

Segundo, HINTON et alii (1990), o uso de dextrose, maltose e sacarose como fonte de açúcares não apresentaram resultados favoráveis na redução da colonização por salmonelas, pois os frangos apresentaram facilidade em metabolizar estes carboidratos impossibilitando sua fermentação no ceco e respectivos efeitos benéficos advindos destes tratamentos.

Por outro lado, estudos que utilizaram o tratamento conjunto de lactose e ma cultura de bactérias anaeróbias pertencentes à microbiota cecal, obtiveram-se sempre resultados satisfatórios, aumentando a ação na redução e combate da colonização por salmonelas (CORRIER 1990; HINTON et alii, 1990; CORRIER et alii, 1991; ; ZIPRIN, et alii, 1993; CORRIER et alii, 1993; CORRIER et alii, 1993; NISBET et alii 1994; ANDREATTI Fº, 1997).

Sabe-se que as aves não possuem a enzima lactase, portanto não são capazes de hidrolisar a lactose, que não será absorvida no intestino (HINTON et alii, 1990).

O mecanismo de ação da lactose frente à colonização por salmonelas não está totalmente elucidado. Existem diferentes possibilidades: uma preconiza que a lactose poderia atuar como substrato para bactérias não patogênicas da flora natural do ceco, estimulando seu crescimento e inibindo a adesão das bactérias patogênicas ao epitélio intestinal (RAMBOUSEK et alii, 1995), outra defende uma ação bacteriostática da lactose devido a sua fermentação pelas bactérias da flora intestinal normal e consequente formação de ácidos graxos voláteis, como ácido acético, ácido propiônico e ácido butírico com redução do pH intestinal o que controlaria a proliferação da *Salmonella spp* (HINTON et alii, 1990; CORRIERa, 1990; CORRIERb, 1990; CORRIER et alii, 1991; CORRIER et alii, 1993). Segundo McHAN, et alii, 1991, ocorreriam interações fisiológicas entre a superfície das bactérias da flora do trato intestinal e os carboidratos podendo bloquear os sítios receptores da parede bacteriana e do epitélio intestinal, reduzindo assim a capacidade de colonização por salmonela.

A inclusão da lactose na dieta de frangos, produz um significativo aumento do consumo de água, com produção de gás, propiciando um efeito de distensão e extensão da parede do ceco e diarreia pronunciada (WALDROUP et alii, 1992; TELLEZ, 1993; RAMBOUSEK, 1995). Esta poderia ser a causa da eliminação ou redução da salmonela, pois a mesma seria excretada em conjunto com as fezes.

Outra possibilidade é que a adição de ácidos orgânicos na ração tais como propiônico, fórmico, butírico, acético e láctico não dissociados difundiriam no interior das células bacterianas produzindo a diminuição do pH no interior destas e destruindo as células de salmonelas o que influiria na sua colonização à parede intestinal das aves (HUME et alii, 1993).

McHAN & SHOTTS, 1992, verificaram que a dieta com ácidos graxos de cadeia curta (ácidos fórmico e propiônico) na concentração de 1%, propiciou efeito na adesão da S.T. em pintos, reduzindo a colonização. HUME et alii(1993), utilizaram ácido propiônico na dieta de pintos e concluíram que apesar de se observar redução da colonização de S.T. esta foi ocasionada por uma bactéria competidora que estava presente na microbiota intestinal.

BERCHIERI, Jr & BARROW, 1996, verificaram a eficiência de ácidos orgânicos presentes no produto comercial Bio Add™ (mistura de ácidos fórmico e propiônico) sob a colonização de aves adultas inoculadas com *S. Gallinarum*. O tratamento foi eficiente, reduzindo de 76% para 33% a colonização entre os grupos controle e tratado. IBA & BERCHIERI, Jr, 1995, obtiveram resultados satisfatórios na redução de diferentes sorovares de salmonela (S.E., S.T. e S. Agona), em aves tratadas com Bio Add™; contudo a ação sobre *S. Infantis* somente foi eficaz quando foi reduzida a dose do agente infectante.

### **3.3. A susceptibilidade de frangos no pré – abate à colonização por salmonelas**

A melhor maneira de se produzir frangos livres de salmonelas é evitando a colonização dos pintos e a exposição a estes agentes durante a criação até a idade de abate (BAILEY, 1994). Para a saúde pública, interessam frangos e seus produtos livres de salmonela; sendo portanto necessário se controlar a criação animal, reduzindo a contaminação da carcaça.

Como se pode observar, a maioria dos trabalhos existentes sobre o controle da colonização intestinal por salmonelas em aves, utilizam pintos de um dia de idade ou aves criadas com finalidade experimental. (BARROW, 1991; GAST & BEARD, 1992; DAVIES & WRAY, 1995; RAMBOUSEK, 1995; POPPE, 1996; BYRD et alli, 1998). Durante a criação, as aves podem se reinfestar, devido a uma série de fatores já discutidos, sendo que o controle realizado em pintos não oferece a garantia de ausência ou número reduzido de salmonelas nas aves adultas, criadas com finalidade comercial. Para a saúde pública, interessa aves criadas com esta finalidade e com ausência de salmonela e/ou número reduzido deste agente antes de entrar no processo de abate.

BERCHIERI et alii (1987), sugeriram, que as aves vivas introduzem salmonela na planta de processamento. Esta conclusão deve-se ao fato da presença deste agente ocorrer em toda a cadeia avícola, desde a ave viva; vários pontos da planta de processamento, carcaça, incluindo subprodutos (penas, víceras), evidenciando ainda que as cepas isoladas durante o ciclo de produção apresentavam a mesma resistência aos antibióticos utilizados no campo, para avicultura.

A alta incidência da salmonela no homem, no meio ambiente e nos setores agrícolas envolvendo produtos cárneos, representa o maior desafio para o melhoramento higiênico sanitário do manejo animal, processamento da carne e um mercado com alimentos livres de contaminação (STAVIC & D'AOUST, 1993).

A possibilidade de se controlar a contaminação por salmonela antes do processamento, podendo assim introduzir aves livres ou com número reduzido de salmonelas no abate, foi conseguido por institutos de pesquisas em trabalhos com aves SPF, e em grandes empresas de linhagens genéticas; no entanto na prática o custo desta conduta é elevado para as granjas criadoras (BARROW, 1999).

Na área de processamento, tem sido concentrado uma série de esforços para o controle de salmonelas, no entanto este controle é difícil. O melhor grau de eliminação de salmonela na indústria deve - se à redução da contaminação cruzada com a entrada de aves livres deste agente (BAILEY, 1993 ). Frangos expostos às altas doses de salmonela, estabelecem a colonização intestinal, com conseqüente aumento do grau de excreção durante o abate. Quando as aves chegam ao abatedouro, pode ocorrer proliferação do microrganismo desde o início da linha de processamento até o produto final (STAVIC & D'AOUST,1993).

A incidência das salmonelas nas carcaças de frangos está aumentando de acordo com os estágios de processamento e isto se deve à habilidade da salmonela em fixar-se nos tecidos dos frangos. O ceco e o ingluvío são considerados fontes das salmonelas nos processamentos das aves, isto porque na idade de abate é comum constatar-se a presença de salmonelas nestes órgãos (HARGIS, et alii, 1995). Nos trabalhos realizados por ANDREATTI, Fº (1997) e GAST & BEARD (1992) o ceco foi o órgão com maior intensidade de colonização do trato gastrintestinal das aves. O fato da contaminação por salmonelas exceder a 35% no processamento de produtos derivados de frango, é razão pela qual órgãos governamentais, institutos de pesquisa juntamente com responsáveis pela saúde pública desenvolverem medidas de controle da colonização intestinal das aves, uma vez que a grande ameaça para a saúde pública ocorre quando a ave contaminada entra no abatedouro, disseminando assim salmonelas durante o processamento (CORRIER, 1990(a); CORRIER, 1990 (b); CORRIER et alii, 1993; NAVARRO, 1996).

De acordo com pesquisa realizada em São Paulo, de um total de 140 cepas de salmonelas isoladas no período entre janeiro de 92 a dezembro de 96, 70,6% eram provenientes de carcaças de frango "in natura" (LIRIO et alii, 1998).

LILLARD, (1990), verificou, em pesquisa realizada pelo serviço de inspeção dos EUA, que 5% das aves que chegam ao abatedouro estavam contaminadas com salmonelas e 36% das carcaças que saíam para o consumo também estavam contaminadas.

O jejum hídrico e alimentar é uma prática comum na indústria avícola, e antecede o transporte da ave até o abatedouro, tem por objetivo reduzir a contaminação das carcaças pelo conteúdo do trato gastrointestinal.

BARNHART, et alii (1999) estudaram o estresse sofrido pelo jejum hídrico e alimentar e obtiveram os seguintes resultados: aves submetidas ao jejum, inoculadas com  $10^8$  ufc de salmonela tiveram no ingluvío um índice de 88%, 100% e 80% de positividade para a recuperação da salmonela contra 12%, 15% e 15% nas aves que não sofreram jejum. Já nos cecos, apesar da diferença entre os grupos estressados e não estressados serem menor as aves com jejum tiveram 44%, 75% e 75% de positividade para a recuperação de salmonelas contra 44%, 35%, 35% do grupo de aves que não sofreram jejum.

OYARZABAL, (1996); em seu experimento, verificou a colonização de frangos criados experimentalmente e inoculados com S.T. NaI<sup>R</sup>; na sexta semana de idade, as aves foram tratadas com uma mistura de bactérias e frutoligosacarídeo em grupos separados e submetidos a seis horas de jejum hídrico. Os resultados demonstraram que o jejum hídrico não intensificou a colonização da salmonela no ceco.

CORRIER, et alii 1995; utilizando poedeiras com 60 semanas, analisaram o estresse por jejum hídrico e a ação da lactose no controle da colonização intestinal e sistêmica por salmonelas, apesar da intensa colonização nos órgãos examinados a

lactose mostrou-se eficiente no tratamento da colonização intestinal por salmonela nas aves.

O jejum alimentar produz uma diminuição do ácido láctico presente no ingluvío e em consequência, há um aumento do pH, facilitando a colonização por salmonela, tornando-o uma das principais vias de eliminação de salmonela durante a evisceração no abatedouro (CORRIER, et alii, 1999).

No experimento realizado por RAMIREZ (1996), verificou-se a alta incidência de salmonelas no ingluvío e ceco e pela ruptura durante o processo de evisceração, havia a consequente contaminação da carcaça de frango. O experimento foi realizado com frangos de 6 semanas de idade em 4 experimentos distintos com dose infectante de  $1 \times 10^8$  ufc de S.E., via oral. Após 5 dias foi analisada a colonização do ingluvío e do ceco. Em paralelo, metade das aves foram separadas e submetidas a jejum alimentar de 18h. A recuperação de salmonela no ingluvío e ceco foi significativa em todas as aves, sendo que nas submetidas a jejum ela foi maior.

BARNHART, et alii (1999), não encontraram bons resultados em relação a redução da colonização por salmonelas, pela utilização de lactose juntamente com o jejum nutricional antes do abate; no entanto foi fácil verificar a alta incidência deste patógeno colonizando o ceco e ingluvío.

O estresse sofrido no período antes do abate, pode provocar uma doença sistêmica (BARROW, 1999), que resultaria na translocação da bactéria do intestino para outros órgãos, o que poderia todavia na dependência do órgão, por exemplo, fígado, baço contaminar o ambiente do abatedouro e diminuir sua eliminação durante o processamento industrial.

A contaminação das penas e a saída das fezes durante o processamento, são consideradas outras importantes vias de contaminação dos equipamentos usados na manipulação dos sub-produtos da carne das aves (CORRIER, 1990; HARGIS 1995). Finalizando, em não conseguindo dificultar, reduzir ou controlar a contaminação de

aves por salmonelas até o abate, no processamento estas são transferidas ao alimento contaminando-o (COOPER, 1994). Os equipamentos utilizados na manipulação dos sub-produtos acabam por manter as salmonelas na planta de abate fornecendo a população alimento de má qualidade higiênica com sério reflexo na saúde pública.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados em duas etapas distintas. A primeira, constou da inoculação e contagem de bactérias viáveis nas aves, sendo as mesmas alojadas na Faculdade de Engenharia Agrícola (FEAGRI - UNICAMP), e com as análises sendo realizadas no Laboratório de Higiene e Legislação da Faculdade de Engenharia de Alimentos, do Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA/ FEA - UNICAMP). A segunda etapa constou do estudo da cinética do trânsito das salmonelas no trato gastrointestinal das aves, sendo realizada na empresa TECH - LAB Análises.

### 4.1. Aves experimentais utilizadas

Foram utilizados frangos fêmeas de corte, de criação comercial, e de mesma procedência. Estes, em média, foram criados até 35 dias de idade pela empresa integradora, quando foram cedidos para o experimento. Foram utilizados pintos machos de postura, com um dia de idade, em apenas um dos experimentos.

As aves com 35 dias foram alojadas individualmente em gaiolas de 40 cm de largura por 50 cm de altura, instaladas em três pequenos galpões de alvenaria com altura de 1,64 metros e uma área de 4,2m<sup>2</sup>.

No recebimento, as aves eram pesadas, e aleatoriamente identificadas com placas de alumínio numeradas e fixadas no metatarso. A negatividade para salmonela foi conferida através de cultivo do suabe de cloaca feito no recebimento das aves. Estes suabes eram inoculados em caldo tetrionato<sup>1</sup>, e incubados a 43°C por 24h. Após sementeira em em ágar verde brilhante<sup>2</sup> (BGA), as colônias suspeitas eram posteriormente inoculadas em ágar tríplice açúcar ferro (TSI)<sup>3</sup>, ágar lisina ferro (LIA)<sup>4</sup> e

---

<sup>1</sup>Difco

<sup>2</sup>Difco

<sup>3</sup>Difco

<sup>4</sup>Difco

caldo uréia<sup>5</sup>, comprovando-se a ausência de salmonelas com base nos resultados bioquímicos preliminares observados.

Os pintos com um dia de idade foram alojados em uma área isolada do laboratório de Higiene e Legislação (DTA/ FEA/ UNICAMP), aquecidos com luz elétrica e divididos em dois grupos separados em caixas de papelão, sendo um grupo inoculado com salmonela e o outro não inoculado.

As aves para o experimento da cinética do trânsito da salmonela no trato gastrointestinal eram recebidas 24h antes do início do experimento e alojadas individualmente em gaiolas, instaladas em uma sala isolada na Tech - Lab Análises.

As aves foram tratadas *ad libitum* com ração sem adição de antibióticos, fornecida pela empresa doadora das aves.

## **4.2. Culturas de salmonelas**

Foram utilizados os sorovares, S.E. e S.T., isolados de aves, pertencentes a coleção de cultura do Laboratório de Higiene e Legislação (DTA/ FEA - UNICAMP).

### **4.2.1. Desenvolvimento de cepas mutantes resistentes ao ácido nalidíxico e a novobiocina**

Para facilitar a recuperação das bactérias inoculadas, foram utilizadas cepas resistentes a ácido nalidíxico(Nal)<sup>6</sup> e novobiocina(Nob)<sup>7</sup> em concentrações pré determinadas.

As mutantes de S.E. resistentes a ácido nalidíxico (100µg/ml) e/ou ácido nalidíxico (100µg/ml) e novobiocina (100µg/ml), e S.T. resistentes ao ácido nalidíxico (100µg/ml) foram desenvolvidas segundo WEINACK et. alii, 1982 de acordo com o protocolo utilizado por AFONSO, 1994.

---

<sup>5</sup>BBL

<sup>6</sup>Wintomillon

<sup>7</sup> Sigma

Este processo seguiu os seguintes procedimentos básicos:

a) Repique da cepa não mutante em ágar nutriente.

b) Repique em caldo de soja triptona (TSB)<sup>8</sup>, para enriquecimento.

c) Repiques diários em caldos (TSB) com Nal e ou Nal e Nob nas concentrações de 25, 50, 75 e 100µg/ml sucessivamente.

d) Na primeira evidência de crescimento bacteriano no caldo com base na presença de turbidez, com a concentração de 100µg/ml de antibiótico, centrifugou-se a cultura a 5.000 rpm por 10 minutos.

e) Dispensou-se o sobrenadante e ao sedimento adicionou-se novo caldo TSB com 100µg/mL de Nal e ou Nal e Nob. Este procedimento foi repetido sucessivas vezes, até o momento em que as salmonelas aparecessem facilmente, indicando que se tornaram resistentes aos antibióticos.

A cepa foi confirmada como resistente aos antibióticos através de repiques em caldo de soja triptona (TSB) adicionados e não de antibióticos, seguido de plaqueamento do caldo TSB sem o antibiótico, em ágar Hektoen Enteric<sup>9</sup> sem antibiótico, e do TSB com antibiótico em Ágar Hektoen Enteric adicionados e não de antibiótico, mostrando nas placas a mesma contagem de unidades formadoras de colônias por ml (ufc/ml) de salmonela.

As culturas assim obtidas foram mantidas em vários tubos estéreis em ágar nutriente adicionado do respectivo antibiótico e mantidas em geladeira entre 2 a 8°C

Durante todos os processos os meios de cultivo foram incubados a 37°C por 24 horas em estufa tipo BOD<sup>10</sup>.

---

<sup>8</sup>Difco

<sup>9</sup>Oxoid

<sup>10</sup>BOD modelo 347 CD - FANEM

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE

## **4.2.2. Inoculação das aves**

Cada uma das aves, em estudo foi inoculada com 1 ml de suspensão bacteriana com auxílio de pipeta graduada, depositada diretamente no ingluvío das aves.

### **4.2.2.1. Inóculo e enumeração**

A suspensão bacteriana foi preparada com cepas mutantes cultivadas em ágar nutriente seguido de repique em caldo de soja tripton (TSB), ambos adicionados do antibiótico específico para cada cepa mutante e incubados a 37°C por 24h.

Em cada inóculo, utilizou-se uma determinada concentração bacteriana, a qual foi determinada através de diluições decimais em água peptonada ou água peptonada tamponada 0,1% (BPW), seguido de contagem por plaqueamento em superfície de ágar verde brilhante (BGA) com antibiótico, e incubação a 37°C por 24h.

## **4.3. Experimentos:**

Para a observação do efeito da lactose na colonização do intestino das aves por salmonelas foram utilizados vários experimentos com variáveis tais como: tipo de cepas, concentração de microrganismos nos inóculos, cepa resistente a Nal e/ou Nob, enriquecimento de cecos em água tamponada peptonada (BPW) 0,1%, diferentes meios seletivos, tratamento das aves com antibiótico e desafio em pintos com um dia de idade.

**Tabela 01 - Experimentos realizados para a determinação da colonização intestinal de aves inoculadas experimentalmente com cepas mutantes de S.E. respectivamente resistente ao ácido nalidíxico (Nal<sup>R</sup>) e ácido nalidíxico e novobiocina (Nal/ Nob<sup>R</sup>).**

<b>Experimentos</b>	<b>Inóculo (S.E. – ufc/ml)</b>	<b>Mutante utilizada</b>	<b>Ágar seletivo*</b>	<b>Outras variações</b>
1º	4,7x10 <sup>5</sup> ufc/ml	S.E. - Nal <sup>R</sup>	MC	Frangos de 35 dias
2º	2,1x10 <sup>5</sup> ufc/ml	S.E. - Nal <sup>R</sup>	MC	Frangos de 35 dias
3º	1,0x10 <sup>3</sup> ufc/ml	S.E. – Nal/Nob <sup>R</sup>	MC	Frangos de 35 dias
4º	1,3x10 <sup>5</sup> ufc/ml	S.E. – Nal/Nob <sup>R</sup>	HE	Frangos de 35 dias
5º	1,1x10 <sup>5</sup> ufc/ml	S.E. – Nal/Nob <sup>R</sup>	HE	Frangos de 35 dias
6º	4,1x10 <sup>8</sup> ufc/ml	S.E. – Nal <sup>R</sup>	HE	Frangos de 35 dias
7º	3,3x10 <sup>7</sup> ufc/ml	S.E. - Na <sup>R</sup>	HE	Frangos de 35 dias e enriquecimento do ceco em BPW
8º	5,5x10 <sup>5</sup> ufc/ml	S.E. - Nal <sup>R</sup>	HE	Pintos com um dia
9º	2,2x10 <sup>8</sup> ufc/ml	S.E. - Nal <sup>R</sup>	HE	Frangos de 35 dias com microbiota destruída por antibióticos

\* MC= Ágar Mac Conkey; HE = Ágar Hektoen Enteric

#### **4.3.1. Redução da colonização intestinal e excreção fecal de frangos experimentalmente inoculados com S.E. e tratados com soro de leite desidratado na concentração de 5% de lactose.**

Para a realização deste experimento, os frangos com 35 dias de idade foram divididos em três grupos :

- a) Controle negativo, não inoculado com salmonela.
- b) Controle positivo inoculado com salmonela.
- c) Inoculado com salmonela e tratado com lactose via ração. A lactose foi obtida do soro de leite desidratado.

Apesar dos grupos estarem alojados em galpões separados, o grupo controle negativo foi mantido isolado dos demais, para prevenção de contaminação cruzada. Durante o tratamento das aves, a higienização dos galpões e colheita das amostras, os procedimentos obedeciam a seguinte ordem: primeiro tratava-se o controle negativo, depois o grupo inoculado e finalmente o inoculado e tratado, respectivamente.

Em intervalos de 24, 72 e 96 horas, após a administração do inóculo, foram coletadas amostras de suabe de cloaca e fezes para a realização das análises.

Após o período de 96 horas, as aves foram pesadas, sacrificadas e necropsiadas para a coleta dos cecos.

##### **A) Suabe da cloaca**

Os suabes foram confeccionados com algodão na ponta de um palito de madeira e esterilizados a 121°C por 15 minutos.

Os suabes de cloaca foram feitos individualmente em cada ave e, em seguida, cultivados em caldo TSB adicionado de antibiótico. Na presença de crescimento bacteriano, fez-se a semeadura em ágar seletivo acrescido do antibiótico para

isolamento e identificação das cepas. O antibiótico em questão variou de acordo com a mutante utilizado.

## **B) Exame das fezes**

As aves defecavam sobre pranchas de alumínio, colocadas sob as gaiolas no período matutino do dia anterior a cada coleta. As fezes eram coletadas na manhã seguinte, com pás de madeira estéril e colocadas em copos de plástico com tampa com rosca, próprios para coleta de fezes, sendo estas encaminhadas imediatamente ao laboratório para o processamento individual.

A análise seguia o seguinte procedimento: pesava-se 10g de fezes, seguido da adição em 90ml de BPW a 0,1%, seguindo-se de diluições decimais até  $10^{-6}$ , e plaqueamento em ágar seletivo adicionado do antibiótico da cepa mutante em questão.

## **C) Análise do ceco**

Após o sacrifício, por deslocamento cervical, as aves foram necropsiadas e os cecos extraídos com o auxílio de tesoura e pinça estéril. Com um palito de madeira estéril o excesso do material fecal era retirado possibilitando passagem do suabe sobre a membrana interna dos cecos, previamente abertos. Os suabes eram semeados por esgotamento na superfície do ágar seletivo adicionado de antibiótico seguido de incubação a 37° C por 24h.

A intensidade do crescimento bacteriano nas placas de Petri foi avaliada seguindo os critérios: crescimento de 1 a 10 ufc, critério "1"; de 11 a 50 ufc, critério "2"; de 51 a 100 ufc, critério "3"; e acima de 100 ufc, critério "4" (ANDREATTI F<sup>o</sup>, 1989 e WEINACK et alii, 1981).

Em um dos experimentos, após o plaqueamento direto dos cecos, fez-se o enriquecimento destes. Os cecos foram homogeneizados em um triturador mecânico<sup>11</sup> com BPW por dois minutos, e incubados a 37°C por 24h. Um ml do caldo

<sup>11</sup>Triturador mecânico Stomacker - Lab. Blender 400

enriquecido foi transferido para 10ml de caldo tetracionato e incubado a 43°C por 24h, seguido de semeadura em ágar Hektoen Enteric Nal<sup>R</sup>.

#### **D) Confirmação da salmonela recuperada**

As colônias características de salmonela recuperadas no ágar seletivo eram inoculadas nos meios TSI<sup>12</sup> e LIA<sup>13</sup> incubadas a 37°C por 24h e caldo uréia<sup>14</sup>, a 37°C por 6h, confirmando presuntivamente, através de suas características bioquímicas, as colônias suspeitas de salmonelas. Este procedimento foi adotado em todas as etapas do experimento para a confirmação da colônia característica recuperada.

#### **4.3.1.1. Colonização intestinal de frangos experimentalmente inoculados com $4,7 \times 10^5$ ufc de S.E. e tratados com lactose**

Foram utilizadas nove aves com trinta e cinco dias de idade; estas foram pesadas, identificadas e separadas em três grupos: controle negativo, positivo e grupo tratado com lactose.

Para o preparo do inóculo, as salmonelas foram semeadas em água peptonada 0,1%, e pela contagem de células viáveis padronizou-se a concentração para  $4,7 \times 10^5$  ufc/ml.

No grupo tratado, adicionou-se o concentrado protéico de soro à ração, na quantidade correspondente a uma concentração de 5% de lactose. Este valor foi possível devido a testes prévios que constataram que o concentrado protéico do soro apresentava 59,92% de lactose.

As aves foram amostradas, por suabe cloacal e as fezes foram submetidas a contagem de células viáveis representada pelo número de ufc/grama de fezes conforme a metodologia descrita. A pesagem final, necropsia e colheita dos cecos não

---

<sup>12</sup>Oxoid

<sup>13</sup>Oxoid

<sup>14</sup>BBL

foram realizadas por se tratar de um pré-teste e estas etapas não estivessem ainda definidas.

#### **4.3.1.2. Colonização intestinal de frangos experimentalmente inoculados com $2,1 \times 10^5$ ufc de S.E..**

Utilizando um inóculo de  $2,1 \times 10^5$  ufc/ml preparado em água peptonada a 0,1%, fez-se a inoculação em 14 aves das 21 utilizadas no experimento. As aves com 35 dias de idade foram separadas em três grupos a saber: controle positivo (inoculado), grupo tratado e inoculado e controle negativo.

O grupo tratado recebeu a ração adicionada de 5% de lactose conforme utilizado no experimento anterior.

As amostras foram coletadas conforme descrito e encaminhadas para o laboratório. Após o enriquecimento do suabe cloacal em TSB, diluição das fezes em água peptonada 0,1%, suabe direto dos cecos, as amostras foram inoculadas em ágar seletivo Mac Conkey.

#### **4.3.1.3. Colonização intestinal de frangos experimentalmente inoculados com $1,0 \times 10^3$ ufc de S.E..**

Vinte e uma aves de 35 dias de idade foram, pesadas, confirmadas não portadoras de salmonelas através do suabe cloacal em caldo Tetracionato e alojadas em três grupos, como nos experimentos anteriores. Foi utilizada uma cepa mutante resistente a  $100 \mu\text{g}$  de ácido nalidíxico e  $100 \mu\text{g}$  de novobiocina por ml em uma concentração de  $1,0 \times 10^3$  ufc/ml preparada em água peptonada 0,1%, e administrada nos grupos controle positivo e tratado com lactose a 5%.

As amostras foram coletadas e processadas conforme descrito. O tempo de leitura foi de 24 e 48 horas após a incubação e o meio sólido seletivo utilizado foi o ágar Mac Conkey.

As aves não foram sacrificadas, portanto não houve análise de cecos.

#### **4.3.1.4. Colonização intestinal de frangos experimentalmente inoculados com $1,3 \times 10^5$ ufc de S.E..**

Utilizaram-se as aves do experimento anterior, que foram novamente pesadas. O cultivo do suabe cloacal em caldo tetracionato para constatar aves portadoras de salmonelas não foi realizado assim como a identificação das aves já que o mesmo já havia sido realizado no experimento anterior (4.3.1.3). Administrou-se novo inóculo de S.E. Nal/Nob<sup>R</sup> na concentração de  $1,3 \times 10^5$  ufc/ml utilizando como diluente a água peptonada 0,1%.

As amostras foram coletadas e encaminhadas ao laboratório conforme já descrito. Na análise o ágar seletivo Hektoen Enteric foi utilizado em substituição ao ágar Mac Conkey, uma vez que este meio é mais indicado para isolamento de *Salmonella* sp, sendo as leituras realizadas em 24 e 48 horas após a incubação.

#### **4.3.1.5. Colonização intestinal de frangos experimentalmente inoculados com $1,1 \times 10^5$ ufc de S.E..**

Vinte e uma aves com 35 dias de idade foram recebidas, pesadas, identificadas e cultivadas por suabe cloacal em caldo tetracionato. Quatorze foram inoculadas com uma suspensão de  $1,1 \times 10^5$  ufc/ml da cepa mutante S.E. Nal/Nob<sup>R</sup> em água tamponada peptonada, sendo sete destas foram tratadas com lactose à 5% na ração.

O inóculo foi preparado, e imediatamente administrado às aves. As amostras foram coletadas e enviadas para o laboratório para análise, conforme os experimentos anteriores. O meio sólido seletivo utilizado foi o ágar Hektoen Enteric com leitura 24 horas após a incubação.

#### **4.3.1.6. Colonização intestinal de frangos experimentalmente inoculados com $4,1 \times 10^8$ ufc de S.E..**

As aves foram, pesadas, identificadas e submetidas ao cultivo do material da cloaca coletado com suabe e semeado em caldo Tetracionato. Utilizaram-se aves com

35 dias de idade e neste caso o número de aves por lote foi reduzido para seis, sendo estas divididas em três grupos.

Um inóculo de  $4,1 \times 10^8$  ufc/ml de S.E. NaI<sup>R</sup> preparado em água peptonada tamponada foi administrado às aves do grupo controle positivo e tratado com ração e lactose a 5%. As amostras foram coletadas e enviadas ao laboratório para exame, utilizando-se ágar Hektoen Enteric como meio sólido seletivo e leitura 24 horas após a incubação.

#### **4.3.1.7. Colonização intestinal de frangos experimentalmente inoculados com $3,3 \times 10^7$ ufc de S.E..**

Utilizaram-se também seis aves com 35 dias de idade, os mesmos procedimentos foram mantidos, exceto que após o plaqueamento direto dos cecos, estes foram incubados a 37°C por 24 h em sacos estéreis em triturador do tipo "stomacker" com 225 ml de BPW, após serem homogeneizados por um minuto. Após o pré-enriquecimento estes foram semeados em caldo Tetrionato e incubados a 43°C por 24 h. O caldo pré-enriquecido foi semeado para confirmação bioquímica em ágar Hektoen Enteric e as colônias com características de salmonelas foram semeadas em TSI, LIA e Uréia.

#### **4.3.2. Infecção experimental de pintos inoculados oralmente com $5,5 \times 10^5$ ufc de S.E..**

O inóculo, a concentração desejada, e sua confirmação seguiram os modelos anteriores. Foi inoculado 0,1 ml de uma solução contendo  $5,5 \times 10^6$  ufc/ml de S.E. NaI<sup>R</sup> em quatro pintos. Outros três pintos não foram inoculados, ficando como controle negativo.

Após quatro dias, os pintos foram sacrificados com deslocamento cervical sendo o seu ceco extraído e analisado por plaqueamento direto segundo a metodologia já descrita.

#### **4.3.3. Colonização intestinal de frangos experimentalmente inoculados com $2,2 \times 10^8$ ufc de S.E. após tratamento com antibiótico.**

As aves foram submetidas ao tratamento com o antibiótico flumequina, de nome comercial IMEQUIL<sup>R15</sup>. A solução do medicamento foi administrada junto a água de bebida na concentração indicada pelo fabricante (0,5ml/litro de água). As aves sofreram tratamento durante três dias, e após um intervalo de três dias receberam a inoculação de um ml de suspensão bacteriana de S.E. Nal<sup>R</sup> com uma concentração de aproximadamente  $2,2 \times 10^8$  ufc/ml. Os demais procedimentos foram realizados conforme descrito anteriormente.

---

<sup>15</sup>Flumequina - Rhodia Merieux

#### 4.3.4. Cinética do trânsito da S.E. e S.T. após inoculação experimental via oral em aves com 35 dias de idade.

As aves com 35 dias de idade, a forma de inoculação e de identificação foram mantidas. As mudanças na metodologia deveram-se à alteração do enfoque da pesquisa.

As aves eram recebidas e alojadas individualmente em gaiolas. Estas eram separadas em dois grupos, sendo um submetido ao estresse e o outro não.

O estresse foi simulado pela abstinência de água e ração, 24h antes da administração do inóculo.

A suspensão bacteriana conservou-se em todos os experimentos na concentração de  $10^8$  ufc/ml inoculados na ave por via oral. Após a administração, as aves foram sacrificadas e necropsiadas em tempos de 30 min., 1h, 2hs, 4hs, 8hs, 24hs, 48hs e 72hs.

Coletaram-se amostras por suabe da mucosa gastrointestinal do inglúvio, proventrículo, duodeno, ceco e reto. Os suabes foram semeados em ágar Hektoen Enteric Nal<sup>R</sup> incubado a 37°C por 24h, conforme metodologia já descrita (ANDREATTI F<sup>O</sup>, 1989 e WEINACK et alii, 1981).

A esta altura de nossa metodologia é importante estabelecermos quais foram os critérios utilizados para identificar o que designou-se de infecção sistêmica. Em outras palavras genericamente, se entende por infecção sistêmica a translocação do agente infeccioso de um tecido ou órgão para através da corrente sanguínea, o mesmo alcançar outros órgãos.

Assim sendo no presente trabalho na impossibilidade de examinar vários órgãos optou-se por fazer a detecção da *Salmonella spp* no sangue e no fígado. E toda a vez que esta bactéria era encontrada neste órgãos definimos como estabelecida a infecção sistêmica. Caso contrário, quando a salmonela não era detectada designava-se como

não tendo ocorrido a infecção sistêmica por salmonela tomando por base os métodos por nós utilizados.

O sangue coletado com seringa e agulha estéril em um volume de 2,0ml foi adicionado em 10ml de caldo TSB, incubado a 37°C por 24h.

A amostragem do fígado foi realizada por incisão do órgão com suabe e coleta da parte interna do órgão, sendo o suabe inoculado em 10ml de caldo TSB e incubado a 37°C por 24h.

Amostras de sangue e fígado, após o enriquecimento em TSB, foram plaqueadas em Ágar Hektoen Enteric, verificando-se a presença ou ausência de crescimento de colônias assemelhando-se as de salmonela, procedendo a confirmação através da inoculação em ágar TSI e LIA incubados a 37°C por 24h e em caldo uréia, incubado a 37°C por 6h.

**Tabela 02. - Experimentos realizados para o estudo do trânsito gastrointestinal da S.E. Na<sup>R</sup> e S.T. Na<sup>R</sup> em aves com 35 dias de idade experimentalmente inoculadas e submetidas ou não ao estresse.**

<b>Experimentos</b>	<b>Inóculo (ufc/ml)</b>	<b>Mutante Utilizada**</b>	<b>Ágar Seletivo*</b>	<b>Outras variáveis</b>
1º	4,9x10 <sup>8</sup>	S.E. - Na <sup>R</sup>	HE	Trânsito gastrointestinal da S.E. em 8 horas após a inoculação
2º	3,1x10 <sup>8</sup>	S.E. - Na <sup>R</sup>	HE	Trânsito gastrointestinal da S.E. 8 horas após a inoculação
3º	4,5x10 <sup>8</sup>	S.E. - Na <sup>R</sup>	HE	Trânsito gastrointestinal da S.E. até 72 h após a inoculação em aves
4º	5,8x10 <sup>8</sup>	S.T. - Na <sup>R</sup>	HE	Trânsito gastrointestinal da S.T. até 72h após a inoculação em aves.

\* HE = Ágar Hektoen Enteric

\*\* S.E.= S. Enteritidis, S.T.= S. Typhimurium

#### **4.3.4.1. A colonização e o trânsito gastrintestinal de S.E. Na<sup>R</sup> em aves com 35 dias de idade e a interferência do estresse sobre a colonização**

Utilizando-se nove aves e inóculo na concentração de  $4,9 \times 10^8$  ufc/ml, fez-se a inoculação conforme a metodologia descrita. As aves foram sacrificadas, duas de cada vez, nos tempos de 30 min, 1h, 2hs e 4hs e após 8hs da inoculação sendo que neste último utilizou-se apenas uma ave.

Primeiro coletava-se o sangue das aves ainda vivas por punção cardíaca, sendo este inoculado em caldo TSB com NaI; em seguida, por deslocamento cervical, as aves eram sacrificadas, necropsiadas e coletavam-se amostras da mucosa gastrintestinal, inglúvio, proventrículo, duodeno, ceco e reto respectivamente, e semeadas em ágar Hektoen Enteric com NaI. A amostragem do sangue era realizada conforme já descrito, com cultivo em caldo TSB com NaI. O estresse foi simulado através do jejum hídrico e alimentar por 12 horas antes do abate.

#### **4.3.4.2. A colonização e o trânsito gastrintestinal de S.E. NaI<sup>R</sup> em aves com 35 dias de idade e a interferência do estresse sobre a colonização.**

O experimento acima foi repetido com dez aves de 35 dias de idade, e um inóculo de  $3,1 \times 10^8$  ufc/ml; as aves foram sacrificadas nos mesmos intervalos descritos no experimento anterior. Oito horas após a inoculação analisaram-se duas aves. O estresse foi simulado através do jejum hídrico e alimentar por 12 horas antes do abate. Os meios de cultivo foram os mesmos utilizados no experimento anterior, assim como o tempo e a temperatura de incubação.

#### **4.3.4.3. A colonização e o trânsito gastrintestinal de S.E. NaI<sup>R</sup> em aves com 35 dias de idade e a interferência do estresse sobre a colonização.**

Utilizando um total de 24 aves com a mesma procedência e idade dos experimentos anteriores e uma concentração do inóculo de  $4,5 \times 10^8$  ufc/ml fez-se um

novo experimento utilizando um grupo de aves que não sofreram o estresse e outro que foram submetidos a ele.

As aves foram recebidas e divididas em dois grupos; no momento da chegada o grupo não estressado foi tratado com ração e água, enquanto que o grupo estressado foi alojado nas gaiolas e não recebeu água e ração até a administração do inóculo.

Duas aves de cada grupo, eram sacrificadas e analisadas, nos tempos de 1h, 2hs, 4hs, 8hs, 24hs e 72hs após a inoculação. A metodologia de análise seguiu as já citadas nos experimentos anteriores.

#### **4.3.4.4. A colonização e o trânsito gastrointestinal de S.T. Nal<sup>R</sup> em aves com 35 dias de idade e a interferência do estresse sobre a colonização.**

A cepa mutante de S.T. em um inóculo de concentração  $5,8 \times 10^8$  ufc/ml, foi administrado em 24 aves divididas em dois grupos, um submetido ao estresse devido à abstinência de água e ração e o outro nas aves não estressadas.

Nos tempos de 1h, 2hs, 4hs, 8hs, 24hs e 72hs, após administração da suspensão bacteriana, as aves foram sacrificadas, na ordem de duas de cada grupo e analisadas através da mesma metodologia já descrita anteriormente.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

*Salmonella enterica* e seus sorovares estão entre as principais causas de infecção humana de origem alimentar em todo o mundo. Nos últimos 20 anos, o aumento da incidência da salmonelose humana é evidente. A partir dos anos 80, a participação de S.E. em surtos, aumentou drasticamente em todo o mundo, predominando sobre a S.T. que era o sorovar mais comum (CORRIER et alii 1990; STAVIC&.D'AOUST, 1993; TIETJEN & FUNG, 1995; NAVARRO, 1996; ZEIDLER, 1996; MACILROY, 1997; SILVA, 1999; BARROW, 1999).

Os sorovares S.E. e S.T. são os principais responsáveis pelas infecções paratífóides das aves. A patogenicidade destas bactérias é mediada pela sua capacidade de colonização intestinal e de causar infecção sistêmica. As aves, quando infectadas, tornam-se portadoras podendo passar o agente, não somente à progênie como, também, aos produtos avícolas oriundos destes lotes (BARROW, 1994; SILVA, 1995; MCILROY, 1997). No Reino Unido, estes dois sorovares correspondiam a  $\frac{3}{4}$  das salmonelas relacionadas com infecções alimentares relatadas (BARROW, 1994).

Produtos avícolas, como ovo e carne de frango, têm sido incriminados como os principais veiculadores de salmonelas no homem (HINTON, et alii, 1992; TIETJEN & FUNG, 1995; POPPE, 1996).

A presença de salmonelas em carcaças de frango é elevada na maioria dos levantamentos realizados em todo o mundo (CORRIER, 1990 (a); CORRIER, 1990 (b); CORRIER et alii, 1993; NAVARRO, 1996; SILVA, 1999). Os EUA realizaram um levantamento nacional e concluíram que, aproximadamente, 20% das carcaças de frangos estavam contaminadas por salmonelas. Estes dados serviram como base para o estabelecimento das regras do Serviço de Inspeção Sanitária no estabelecimento dos novos parâmetros de controle sanitário junto aos abatedouros (Silva, 1999). A maioria das salmonelas encontradas nas carcaças de frangos tem origem na ave viva que

entra no abatedouro, tanto daquelas presentes como contaminantes externos (p.ex penas) e, principalmente, no trato digestivo (ALMEIDA, et alii., 1993). Desta maneira, a redução da contaminação de carcaças de aves por salmonelas não só depende dos processos industriais de abate mas, principalmente, da produção de aves livres ou com o menor índice possível de contaminação.

Os experimentos foram realizados com S.E. e S.T. inoculadas em frangos, na maioria das vezes, com 35 dias de idade; portanto uma semana antes da idade média utilizada para o abate de frangos no Brasil (MARTINS, 1996; AVES & OVOS, 1998, INFORME APINCO, 1999).

#### **5.1 - Colonização intestinal de frangos de 35 dias de idade alimentados com ração adicionada de 5% de lactose e oralmente inoculados com 1,0 ml de S.E..**

Os resultados dos experimentos de recuperação de S.E. do trato intestinal, em diferentes períodos pós inoculação, de frangos de 35 dias de idade alimentados com ração contendo 5% de lactose e oralmente inoculados com 1,0 ml de suspensão de S.E. contendo de  $10^3$  a  $10^8$  ufc/ml estão expressos da Tabela 3.

**Tabela 03 – Recuperação de S.E., em diferentes períodos pós inoculação, de frangos de 35 dias de idade alimentados com ração contendo 5% de lactose e oralmente inoculados com 1,0 ml de suspensão de S.E. contendo de  $10^3$  a  $10^8$  ufc/ml. Resultados dos Experimentos 1º ao 7º e 9º.**

Amostragem	Frangos inoculados e			Controle Positivo:			Controle Negativo:		
	Tratados com lactose			Inoculado, sem lactose			Não inoculado, sem lactose		
	24 h	72 h	96h	24 h	72 h	96h	24 h	72 h	96h
Suabe cloacal	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fezes	<100*	<100*	<100*	<100*	<100*	<100*	<100*	<100*	<100*
Cecos	NR	NR	-	NR	NR	-	NR	NR	-

(-) negativo ou (+) para a presença de S.E.;

(\*) <100 ufc/g;

NR – Não realizado

A cepa de salmonela e a concentração utilizada não permitiu sua recuperação nos períodos de 24, 72 e 96 horas após inoculação. Mesmo o enriquecimento do cultivo de suabe de cloaca em caldo TSB não revelou a presença do agente. Ressalta-se que, em todos os experimentos, foram utilizados frangos saudáveis de criação industrial isentos de salmonelas, sem sinais clínicos de qualquer enfermidade.

Não existe padrão de dose desafio para experimentos com salmonelas em aves. Cada autor determina a dose inoculante, que melhor atende a seus propósitos experimentais. Sabe-se que a dose infectante é um dos fatores que influenciam a infecção por salmonelas nas aves e no homem. Quanto maior a concentração do inóculo, maior a capacidade da instalação do agente nas aves (POPPE, 1996).

Na literatura, encontram-se diferentes concentrações nos inóculos de salmonelas em aves. Estes valores variam de:  $10^3$  ufc (HUMPREY et alii 1991),  $10^4$  ufc (GAST 1993; POPPE 1996),  $10^5$  ufc (MACHAN, et alii 1991),  $10^6$  ufc (BARNES et alii 1972; GAST, 1993; HARGIS 1995; POPPE 1996),  $10^7$  ufc (GAST & BEARD, 1992)  $10^8$  ufc (RAMIREZ, 1996; BARNHART, 1999); e, até  $10^9$  ufc (RAMBOUSEK, 1995).

Neste trabalho, as concentrações variaram de  $10^3$  a  $10^8$  ufc/ml por ave. Concentrações consideradas acima do que é, geralmente, encontrado em um ambiente natural para a infecção de aves. Mesmo assim, não foi possível a recuperação de salmonela do trato digestivo das aves inoculadas, através da análise de fezes, suabe cloacal ou conteúdo cecal.

Nos experimentos 1 e 2, a cepa de S.E. estava marcada com ácido nalidíxico (Nal<sup>R</sup>), droga esta que foi incorporada aos meios de cultura. Mesmo assim, em muitas placas de MacConkey, houve crescimento de colônias típicas de *Escherichia coli*. Pensou-se, a princípio, que estas cepas de *E. coli*, naturalmente resistentes a Nal<sup>R</sup>, pudessem estar interferindo na recuperação de S.E. Desta maneira, para os experimentos seguintes, uma nova cepa de S.E. foi desenvolvida, resistente também à novobiocina, S.E. Nal/Nob<sup>R</sup>. A repetição dos experimentos, variando a dosagem do inóculo entre  $10^3$  até  $10^5$  ufc/ml, o ágar seletivo (MC e HE) e também a incubação com

tempo maior (leitura de 24 e 48 horas), para recuperação de S.E. revelaram que a não recuperação de S.E. nos tempos pós-inoculação estudados era um fenômeno natural. Ou seja, o estabelecimento experimental de uma infecção intestinal ativa em frangos saudáveis de 35 dias de idade é uma ocorrência difícil, de ocorrer, mesmo usando altas dosagens do inóculo.

É, pelo menos, preocupante o encontro natural de cepas de *E. coli* (dados não mostrados) resistentes ao ácido nalidíxico (experimentos 1° e 2°) - uma quinolona de primeira geração com resistência de base cromossomal. Quinolonas de terceira geração têm sido largamente utilizadas em terapêutica veterinária. Cepas bacterianas encontradas em carcaças de aves e resistentes a antibióticos, podem passar ao homem. As quinolonas são, hoje, vias de regra drogas referências na terapêutica humana contra infecções bacterianas.

BARROW et alii (1998), trabalhando com pintos de um dia infectados com S.E., e previamente tratados com uma quinolona de terceira geração (enrofloxacina), verificaram que a microbiota natural de *E. coli* das aves de, anteriormente sensível à quinolona, tornou-se resistente, persistindo após a retirada da medicação.

No experimento nº 7, com a inoculação de  $10^7$  ufc/ml por ave de S.E. NaI<sup>R</sup>, além das análises convencionais, os cecos foram retirados das aves e cultivados em caldo TSB para enriquecimento. Com este procedimento, foi possível verificar a presença da S.E. em uma das aves do grupo inoculado e tratado com lactose. Este dado indica um pequeno residual de S.E. nas aves inoculadas. Embora, em apenas um caso é estranho que esta persistência tenha ocorrido no grupo tratado, ainda que não se tenha uma explicação para este fenômeno.

Mesmo considerando que a S.E. seja o sorovar mais patogênico para aves, com características invasivas (NAVARRO, 1996; COX, 1996), a cepa utilizada não demonstrou tal característica em frangos com 35 dias de idade.

A resistência à infecção aumenta com a idade da ave (GAST & BEARD, 1990, HUMPREY et alii, 1991; BAILEY, 1993; BAILEY, 1994; POPPE, 1996; RAMBOUSEK, 1995). Em experimento usando a cepa de S.E. Nal<sup>R</sup> em pintos de um dia, esta mostrou elevado grau de patogenicidade, confirmando assim o poder invasivo do agente utilizado, como mostra a Tabela 6.

A persistência de salmonelas no intestino de aves tende a ser transitória. Com o passar do tempo, estas tendem a desaparecer e são recuperadas com menor intensidade (HARGIS et alii 1995, ANDREATTI F<sup>o</sup>, 1997).

A maioria dos experimentos é realizado com pintos de um dia de idade. Estes experimentos foram realizados, na maioria das vezes, com frangos de 35 dias de idade. Não se sabe que tipo ou nível de proteção intestinal é possível encontrar em aves nesta idade e não há dados disponíveis na literatura.

Entre outros aditivos utilizados na ração para o controle da infecção intestinal de aves por salmonelas, incluem-se: alguns carboidratos como a lactose, ácidos orgânicos, probióticos, antibióticos e produtos de exclusão competitiva (CORRIER et alii, 1990; ZIPRIN et alii 1990; STAVIC & D'AOUST, 1993; COOPER, 1994; SILVA, 1995; MCILROY, 1997; PALMU & CAMELIN, 1997).

O uso de lactose na alimentação de aves tem sido relatado como forma auxiliar na redução de salmonelas intestinais (CORRIER et alii, 1991; WALDROUP et alii, 1992; RAMBOUSEK, 1995). O mecanismo está relacionado com o desenvolvimento e estímulo da microbiota láctica intestinal que age como probiótico, uma vez que as aves são deficientes em lactase (HINTON et alii, 1990).

Nestes experimentos, a escolha do uso da lactose como aditivo no controle de salmonelas em frangos, estava relacionado ao fator custo e disponibilidade de aquisição em nosso meio.

A lactose tem sido utilizada nas concentrações de 2,5 até 10%, em trabalhos de controle de colonização intestinal por salmonelas. A concentração de 5% foi a

escolhida em função de resultados anteriores mais consistentes (NISBET et alii, 1994). O uso de lactose a 2,5%, adicionada à ração, não mostrou efeito na redução da colonização cecal e de ingluvívio, em frangos em idade de abate, infectados com  $10^8$  ufc de S.E. (BARNHART 1999).

A lactose tem sido utilizada isoladamente, adicionada a culturas anaeróbias ou adicionada a outros açúcares (manose, frutose, arabinose, fructooligosaccharide (FOS - 50) e a ácidos orgânicos (CORRIER et alii, 1990; ZIPRIN et alii, 1990; HINTON Jr.; et alii, 1990; CORRIER et alii, 1991; MACHAN et alii, 1991; ZIPRIN et alii 1991; WALDROUP, et alii 1991; CORRIER et alii, 1992; MACHAN & SHOTTS, 1992; CORRIER et alii, 1993 (a); CORRIER et alii 1993(b); HUME et alii, 1993, NISBET et alii 1993; TELLEZ et alii, 1993; ZIPRIN et alii 1993; CORRIER et alii, 1994; HOLLISTER et alii 1994; NISBET et alii 1994; IBA & BERCHIERI, 1995; OYARZABAL & CONNER, 1996; ANDREATTI F<sup>o</sup> 1997)

Os grupos de aves que receberam ração contendo lactose, apresentaram fezes ligeiramente mais amarelada e líquida que os grupos não tratados.

Sabe-se que as aves são deficientes na enzima lactase. Desta maneira, a lactose administrada é utilizada pela microbiota intestinal, principalmente a cecal, capaz de fermentá-la. Seus bioprodutos, responsáveis pela diminuição do pH do intestino e aumento da concentração de ácidos orgânicos, possui uma ação bacteriostática, produzindo resistência das aves à colonização por salmonelas (HINTON et alii, 1990; CORRIER, 1990(a); CORRIER, 1990(b); CORRIER et alii 1991; CORRIER et alii 1993, TELLEZ et alii, 1993).

TELLEZ e colaboradores (1993) verificaram ainda que o uso da lactose na dieta das aves pode alterar a mucosa cecal morfológicamente, alterando a susceptibilidade do hospedeiro contra a invasão da S.E.. Os ácidos formados com a fermentação, tem ação sob a motilidade intestinal e consistência das fezes, propiciando assim diarreia nas aves e conseqüente excreção das salmonelas inoculadas.

**5.2- Ganho de peso corporal durante o período de teste, de frangos de 35 dias de idade, alimentados com ração adicionada de 5% de lactose e oralmente inoculados com 1,0 ml de suspensão de S.E. contendo de  $10^3$  a  $10^8$  ufc/ml. Resultados dos Experimentos 2º, 3º, 5º, 6º 7º e 9º.**

Os resultados da média de ganho de peso corporal durante o período experimental, estão expressos na Tabela 04. Frangos de corte com 35 dias de idade foram alimentados com ração contendo 5% de lactose e oralmente inoculados com 1,0 ml de suspensão de S.E..

Este não era um dos objetivos do trabalho. Os dados foram anotados na tentativa de se estabelecer alguma relação do peso com a infecção por S.E..

Racionalmente, o grupo controle não inoculado e sem receber lactose (c) na ração deveria apresentar maior peso médio que os outros dois grupos inoculados. Entre os inoculados, o tratado com lactose (a) deveria apresentar maior peso que o controle positivo; inoculado e não tratado com lactose (b). Na Tabela 05, que apresenta uma síntese do ganho de peso dos diversos grupos em todos os experimentos realizados com frangos de 35 dias, a sequência esperada era  $c > a > b$ . Apenas as aves que foram tratadas com antibiótico apresentaram esta sequência. Entretanto, a sequência mais comum que ocorreu por duas vezes foi,  $a > c > b$ . Ou seja, aves inoculadas com S.E. e alimentadas com lactose apresentaram maior ganho de peso no período do que as aves dos outros grupos.

Não há correlação da produtividade natural, observada em frangos de corte, e a presença de salmonelas do grupo paratifóide (CORRIER et alii, 1990). Os dados encontrados nestes experimentos podem apenas expressar casuismo ou, talvez a S.E. e lactose possam ter funcionado como estímulo ao funcionamento das funções intestinais de digestão e absorção.

**Tabela 04 – Resultados do tratamento de frangos de 35 dias de idade com ração adicionada de 5% de lactose e oralmente inoculados com 1,0 ml de suspensão de S.E. contendo de  $10^3$  a  $10^8$  ufc sobre o peso corporal. Resultados dos Experimentos 2º, 3º, 5º, 6º 7º e 9º.**

Tratamentos	Experi- mento	S.E. (ufc)	Peso Médio (g)		Ganho de peso (g)
			Inicial	Final	
<b>Frangos Inoculados e Tratados com Lactose</b>	2º	$2,1 \times 10^5$	1.255,0	1.388,0	133,0
	3º	$1,0 \times 10^3$	811,1	962,22	151,12
	5º	$1,1 \times 10^5$	1.404,4	1.675,5	271,15
	6º	$4,1 \times 10^8$	1.320,0	1.540,0	220,0
	7º	$3,3 \times 10^7$	1.540,0	1.795,0	255,0
	9º	$2,2 \times 10^8$	1.233,3	1.920,0	686,7
<b>Controle Positivo: Inoculados, Sem Lactose</b>	2º	$2,1 \times 10^5$	1.201,0	1.377,0	176,0
	3º	$1,0 \times 10^3$	792,2	903,3	111,13
	5º	$1,1 \times 10^5$	1.425,5	1.587,7	162,2
	6º	$4,1 \times 10^8$	1.460,0	1.725,0	265,0
	7º	$3,3 \times 10^7$	1.725,0	1.980,0	255,0
	9º	$2,2 \times 10^8$	1.340,0	1.873,3	533,3
<b>Controle Negativo: Não inoculados, Sem Lactose</b>	2º	$2,1 \times 10^5$	1.177,7	1.335,5	157,8
	3º	$1,0 \times 10^3$	864,4	991,1	126,7
	5º	$1,1 \times 10^5$	1.422,2	1.594,4	172,2
	6º	$4,1 \times 10^8$	1.450,0	1.775,0	325,0
	7º	$3,3 \times 10^7$	1.775,0	2.025,0	250,0
	9º	$2,2 \times 10^8$	1.260,0	2.000,0	740,0

Obs: Nos experimentos 1º e 4º, não foi avaliado ganho de peso corporal.

**Tabela 05 – Análise comparativa do ganho de peso corporal, durante o período experimental, de frangos de 35 dias de idade alimentados com ração adicionada de 5% de lactose e oralmente inoculados com 1,0 ml de suspensão de S.E. contendo de  $10^3$  a  $10^8$  ufc.**

<b>Ganho de peso corporal (g) dos diversos grupos</b>				
<b>Experimentos</b>	<b>Inoculado, com lactose (a)</b>	<b>Inoculado, Sem lactose (b)</b>	<b>Não inoculado, Sem lactose (c )</b>	<b>Análise</b>
2°	133,0	176,0	157,8	b>c>a
3°	151,12	111,13	126,7	a>c>b
5°	271,15	162,2	172,2	a>c>b
6°	220,0	265,0	325,0	c>b>a
7°	255,0	255,0	250,0	a=b>c
9°	686,7	533,3	740,0	c>a>b

### **5.3 - Inoculação de pintos de um dia com 0,1 ml de suspensão de S.E. Nal<sup>R</sup> contendo $5,5 \times 10^6$ ufc sobre a colonização intestinal.**

Com os dados de ausência de recuperação de S.E. do trato digestivo de frangos com 35 dias de idade, pensou-se na possibilidade da cepa mutante Nal<sup>R</sup> ter perdido total ou parcialmente sua patogenicidade durante o desenvolvimento da resistência. Desta maneira, programou-se o 8° experimento, inoculando-se pintos de um dia de idade.

Pintos de um dia são altamente susceptíveis à colonização intestinal por salmonelas, em parte, pela ausência de uma microbiota intestinal protetora ao nascer.

Esta microbiota se instala, paulatinamente, com a idade assim como a resistência à colonização intestinal (DAY, 1996; BARROW, 1999).

Os resultados do cultivo de cecos, após a inoculação oral de pintos de um dia com 0,1 ml de suspensão de S.E. Nal<sup>R</sup>, estão expressos na Tabela 6.

Os dados mostraram que, além da persistência por 96 horas, a cepa mutante de S.E. Nal<sup>R</sup> foi capaz de colonizar intensamente os cecos de pintos com um dia de idade.

Desta maneira, se a cepa manteve suas propriedades de patogenicidade e virulência, as diferenças de colonização encontradas em frangos com 35 dias de idade deveriam ser atribuídas, principalmente, à situação do hospedeiro.

Assim, pintos de um dia têm sido utilizados pelos pesquisadores para avaliar a capacidade de colonização intestinal por salmonelas (BARROW, 1991; GAST & BEARD, 1992; DAVIES & WRAY, 1995; RAMBOUSEK, 1995; POPPE, 1996; BYRD et alii, 1998;).

Sabe-se que a administração da microbiota intestinal de aves adultas, tanto na forma natural como em cultivo anaeróbico, tem efeito na proteção da colonização intestinal de aves jovens por salmonelas (CORRIER et alii, 1990(a); CORRIER et alii, 1990(b); CORRIER et alii, 1993(b); DAY, 1996; ANDREATTI F<sup>O</sup>, 1997).

Uma das formas de desenvolvimento de resistência às salmonelas intestinais em aves, está no estabelecimento de uma microbiota intestinal protetora. A formação desta microbiota se inicia naturalmente, a partir do primeiro dia de vida (CORRIER et alii, 1993(a); EWING & COLE, 1994; DAY, 1996).

A literatura traz diversos trabalhos com o uso de microbiota intestinal de aves adultas ou seu cultivo anaeróbico no controle da infecção intestinal de aves por salmonelas (CORRIER et alii, 1990(a); CORRIER et alii, 1990(b); CORRIER et alii, 1993(b); DAY, 1996; ANDREATTI F<sup>O</sup>, 1997).

**Tabela 06 – Resultados do cultivo de cecos após 96 horas da inoculação oral de pintos de um dia com 0,1 ml de suspensão de S.E. NaI<sup>R</sup> contendo 5,5x10<sup>6</sup> ufc.**

Pintos	Cultivo dos cecos	
	Inoculados	Controle não inoculados
1	++++	-
2	++++	-
3	++++	-
4	++++	-

(-) negativo ou (+) para a presença de S.E.;

(++++) = acima de 100 ufc de S.E. por placa de cultivo direto

**5.4 - Colonização intestinal de frangos de 35 dias de idade alimentados com ração adicionada de 5% de lactose e oralmente inoculados com 1,0 ml de S.E. NaI<sup>R</sup> contendo  $2,2 \times 10^8$  ufc após serem previamente tratados com o antibiótico flumequina via água de bebida.**

Os resultados do experimento de colonização intestinal de frangos de 35 dias de idade alimentados com ração adicionada de 5% de lactose e oralmente inoculados com 1,0 ml de S.E., após serem previamente tratados com o antibiótico via água de bebida, foram essencialmente os mesmos expressos na Tabela 03.

O antibiótico usado no tratamento das aves, pertence ao grupo das quinolonas (nome comercial: flumequina), com seu uso amplamente difundido na avicultura para o controle de diversas infecções bacterianas inclusive a excreção de *Salmonella sp* (BARROW, 1999).

Sabe-se que existe um curto período de tempo, após o tratamento com antibiótico, em que as aves se tornam susceptíveis à infecção por salmonelas. Em grande parte isto ocorre porque a flora normal, por si própria inibitória para a salmonela, também é afetada pelo uso do antibiótico (BARROW, 1999).

DAY (1996) também alertou para o fato de que o uso de antibióticos em níveis terapêuticos pode propiciar a recolonização, uma vez que podem eliminar, além das salmonelas, também a maioria dos organismos protetores da microbiota natural. Isto produz um alto risco de recolonização pós-tratamento, deixando as aves susceptíveis à recolonização devido a falta de bactérias protetoras.

Assim sendo, mesmo a possível destruição ou desequilíbrio da microbiota intestinal provocada pela terapia antimicrobiana antes da inoculação (DAY, 1996; BARROW, 1999), não foi suficiente para que a cepa S.E. se instalasse e colonizasse o intestino, mais uma vez confirmando a dificuldade de se colonizar frangos adultos com S.E..

### **5.5 – Efeito do estresse por jejum hídrico e alimentar na recuperação da S.E. NaI<sup>R</sup> do trato gastrintestinal e sistêmica de frangos de 35 dias oralmente inoculados com 1,0 ml do agente contendo $2,2 \times 10^8$ ufc.**

Com a comprovação de que a cepa de S.E. NaI<sup>R</sup> mantinha suas propriedades patogênicas para aves, mas não era recuperada do trato digestivo de frangos com 35 dias de idade, 24 horas após a inoculação, programou-se um experimento onde a recuperação da S.E. seria realizada em intervalos menores que 24 horas. Um dos grupos de frangos foi submetido ao estresse por jejum hídrico e alimentar antes da inoculação, com a finalidade de aumentar a chance de recuperação do agente (HUMPHREY, et alii 1993; RAMIRIZ, et alii 1997; BARNHART, et alii 1999; CORRIER, et alii 1999).

A Tabela 07 traz os resultados da recuperação de S.E. NaI<sup>R</sup> do trato intestinal de frangos de 35 dias, antes e após terem sofrido estresse por jejum hídrico e alimentar. A mesma tabela mostra dados referentes a recuperação de S.E. a partir do sangue e fígado o que sugere infecção sistêmica e respectiva recuperação a qual denominamos de recuperação sistêmica.

Os resultados da colonização do trato gastrintestinal foram medidos pela intensidade de crescimento de S.E. após plaqueamento direto em placas de Petri contendo ágar HE (ANDREATTI F<sup>o</sup>, 1997).

O inglúvio, proventrículo e duodeno de aves não estressadas, continham S.E. em grande quantidade, desde 30 min. até 2hs. O estresse aumentou o tempo de permanência de S.E. no trato intestinal em até 4 horas após a inoculação.

A S.E. só foi detectada nos cecos a partir da segunda hora pós inoculação. Cecos e retos foram os segmentos intestinais com maior frequência e permanência de salmonelas como é comumente citado em literatura (GORHAM et alii, 1991; ANDREATTI F<sup>o</sup>, 1997).

A tendência de translocação da S.E. inoculada nas aves, pelo trato gastrintestinal foi verificada por GORHAM e colaboradores em 1991, mas em proporções diferentes. Eles trabalharam com pintos (SPF) inoculados com S.E. no 7º dia de idade, e isolaram o agente até 35 dias pós inoculação. No entanto verificaram também que o agente, nos primeiros dias pós inoculação, foi isolado com maior intensidade no ingluvívio (segmento superior do trato gastrintestinal) e com o passar do tempo nas regiões dos cecos e cólon.

A permanência do agente na ave também foi avaliada, sendo que, com o passar do tempo pós-inoculação, o número de isolamentos (ufc) sofreu uma redução drástica, tendendo a zero.

A permanência da salmonela por um período maior do que 24 horas, encontrada por alguns autores, provavelmente é consequência do uso de aves criadas para fins experimentais (SPF) e inoculação com pouca idade (p. ex. 1, 3, 7 dias), quando as aves possuem uma microbiota pouco estabelecida em relação as aves com 35 dias de idade.

Nota-se no experimento que a infecção por S.E. em frangos de 35 dias de idade é auto-limitante. Ela tende a desaparecer rapidamente com o passar do tempo após inoculação (HARGIS et alii, 1995).

O efeito invasivo (infecção sistêmica) foi avaliado pela presença e ausência do agente no sangue e fígado após uma análise qualitativa por enriquecimento do suabe dos órgãos em caldo TSB. O resultado é representado individualmente para cada ave.

Em todos os períodos de exame, S.E. foi detectada somente no sangue de uma ave na oitava hora após inoculação e também do fígado da ave submetida ao estresse, nos períodos de 30 minutos, uma e duas horas após inoculação, não sendo detectada nos períodos posteriores.

Há uma análise muito importante a ser feita com os resultados obtidos. O jejum de algumas horas (geralmente seis), é prática comum no processo de abate, antes da

captura dos frangos. Esta, por sua vez, juntamente com o transporte, provocam mais estresse às aves .

Os experimentos sugerem que as salmonelas presentes no trato digestivo de frangos antes do abate podem aumentar de quantidade, como também pode haver sua translocação sistêmica para órgãos internos, contaminando, inclusive, vísceras comestíveis como o fígado (DELOACH, 1995).

Aparentemente as aves estressadas, possuem a mesma tendência de excreção que o grupo não estressado. No entanto, a velocidade com que o agente percorre o trato gastrintestinal é menor.

**Tabela 07 - Resultados da recuperação da S.E. do trato intestinal e sistêmica de frangos de 35 dias oralmente inoculados com 1,0 ml de 10<sup>8</sup> ufc de S.E., em aves sem estresse (Sem) e, após terem sofrido estresse (Stress) por jejum hídrico e alimentar.**

Órgãos*	Recuperação de S. Enteritidis – Tempo após inoculação											
	30 minutos		1 hora		2 horas		4 horas		8 horas			
	Sem	Stress	Sem	Stress	Sem	Stress	Sem	Stress	Sem	Stress		
Inglúvio	4**	4	4	2,5	2	2	0	2,5	0	0	0	
Proventrículo	2,5	0	0,5	0	0	1,5	0	0,5	0	0	0	
Duodeno	3,5	2,5	0	2,5	2	2	0	0,5	0	0	0	
Cecos	0	0	0	0	2	0	4	4	2	2	2	
Reto	1,5	0	0,5	0,5	2	1,5	2,5	4	1,5	2	2	
Fígado	-/+	-/+	-/+	-/-	-/+	-/+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/+	
Sangue	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/+	

(\*) Média de duas aves, exceto fígado e sangue;

NR = Não realizado;

Recuperação: Presença (+) ou ausência (-) de salmonelas;

(\*\*) Critério utilizado para contagem de salmonelas:  
1 a 10 UFC - até "1"

11 a 50 UFC - de 1,1 a 2

51 a 100 UFC - de 2,1 a 3

> 100 UFC - 3,1 a 4

**5.6 - Efeito da aplicação do estresse por jejum hídrico e alimentar na recuperação da S.E. Nal<sup>R</sup> do trato intestinal e sistêmica de frangos de 35 dias de idade, oralmente inoculados com 1,0 ml de S.E. contendo  $2,2 \times 10^8$  ufc do agente.**

Em função dos resultados anteriores, mostrados na Tabela 7, programou-se novo experimento, incluindo os tempos de 24 e 72 horas. Da mesma maneira, um dos grupos de frangos foi submetido ao estresse por jejum hídrico e de ração antes da inoculação, com a finalidade de aumentar a chance de recuperação do agente.

A Tabela 08 traz os resultados da recuperação da S.E. do trato intestinal, fígado e sangue (recuperação sistêmica) de frangos de 35 dias oralmente inoculados com S.E. Nal<sup>R</sup>, em aves sem estresse e após terem sofrido estresse.

Os resultados foram os mesmos mostrados anteriormente na Tabela 07. Ou seja, o estresse aumentou a intensidade de colonização e o tempo de permanência de S.E. no trato intestinal.

No período de 24 horas após a inoculação, ficou clara a característica auto limitante da S.E.. Assim como já havia sido verificado em trabalhos anteriores, já que apenas houve recuperação do patógeno nos cecos e, em maior quantidade no grupo estressado (fator 4) que no não estressado (fator 2,0). Os demais segmentos do trato gastrintestinal, sangue e o fígado não apresentaram presença da S.E. (GORHAM et alii, 1991; ANDREATTI F<sup>o</sup>, 1997).

Os resultados referentes as análises de 72 horas após a inoculação demonstraram a ausência quase total da S.E., tanto no trato digestivo como sistêmico, das aves examinadas.

**Tabela 08 - Resultados da recuperação da S. Enteritidis do trato intestinal e sistêmica de frangos de 35 dias oralmente inoculados com 1,0 ml de S. Enteritidis NaI<sup>R</sup> contendo 10<sup>8</sup> ufc de S.E., em aves sem estresse (Sem) e, após terem sofrido estresse (Stress) por jejum hídrico e alimentar.**

Órgãos*	Recuperação de S. Enteritidis – Tempo após inoculação													
	1 hora		2 horas		4 horas		8 horas		24 horas		72 horas			
	Sem	Stress	Sem	Stress	Sem	Stress	Sem	Stress	Sem	Stress	Sem	Stress		
Inglúvio	4**	4	4	4	1,5	4	0,5	0,5	0	0	0	0		
Proventrículo	4	2,5	2,5	3,5	0	1	0,5	0	0	0	0,5	0		
Duodeno	4	0,5	2,5	0,5	0,5	0	0	0	0	0	0	0		
Cecos	0,5	1,5	0,5	0,5	1	3	0	2,5	2	4	0	0		
Reto	0,5	1	3	3	0,5	2	0	1,5	0	0	0	0		
Fígado	-/-	-/-	+/-	-/+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-		
Sangue	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-		

(\*) Média de duas aves, exceto fígado e sangue;

Recuperação: Presença (+) ou ausência (-) de salmonelas;

(\*\*) Critério utilizado para contagem de salmonelas:

1 a 10 UFC - até 1

11 a 50 UFC - 1,1 a 2

51 a 100 UFC - 2,1 a 3

> 100 UFC - 3,1 a 4

**5.7 - Efeito da aplicação do estresse por jejum hídrico e alimentar na recuperação da S.T. Nal<sup>R</sup> do trato intestinal e sistêmica de frangos de 35 dias de idade, oralmente inoculados com 1,0 ml de S.T. contendo 2,2x10<sup>8</sup> ufc do agente.**

A idéia de usar uma cepa de S.T. Nal<sup>R</sup> era para se ter resultados comparativos com a cepa de S.E., considerada mais patogênica para aves.

A Tabela 9 traz os resultados da aplicação do estresse por jejum hídrico e de ração na recuperação da S.T. Nal<sup>R</sup> do trato intestinal e sistêmica de frangos de 35 dias de idade, oralmente inoculados com S.T.

Como ocorreu com a S.E., o trato digestivo de frangos de 35 dias de idade foi colonizado pela cepa de S.T.. O estresse propiciou uma colonização ligeiramente mais intensa e prolongada que em aves não estressadas.

No geral, ficou demonstrado que a cepa de S.E., utilizada nos experimentos, apresentava uma patogenicidade maior que esta cepa de S.T. testada. ANDREATTI F<sup>0</sup> (1997) , também determinou a maior patogenicidade da S.E. frente a S.T. em pintos de um dia.

A S.T. provocou pouca infecção sistêmica medida pela recuperação da mesma do sangue e fígado das aves inoculadas. Houve isolamento de S.T. no cultivo do fígado em caldo TSB em apenas uma ave duas horas após inoculação. Do sangue, houve recuperação de uma ave em cada um dos tempos, em uma e duas horas pós inoculação.

Também observou-se no experimento, que a infecção por S.T. em frangos de 35 dias de idade é auto-limitante. Ela tende a desaparecer rapidamente com o tempo após inoculação.

Sem dúvida alguma, em todos os experimentos, independente do sorovar utilizado, verificou-se uma forte tendência em detectar salmonelas nos momentos seguintes a inoculação nos segmentos superiores do trato gastrintestinal.

Após a inoculação a salmonela era constantemente encontrada em concentrações mais altas no Inglúvio. Esta tendência se manteve com o passar do tempo, encontrando-se o agente nos segmentos inferiores do trato gastrintestinal (cecos). Fazendo uma analogia, é como se tivéssemos marcado as salmonelas com um contraste, em que se pode verificar todo o trânsito da salmonela pelo trato gastrintestinal, do Inglúvio aos cecos. Verificou-se, assim, uma forte tendência da ave em excretar o agente inoculado em poucas horas, como se este fosse reconhecido como agente estranho a microbiota normal e as defesas das aves o eliminassem.

**Tabela 09 - Resultados da recuperação da S. T. do trato intestinal e sistêmica de frangos de 35 dias oralmente inoculados com 1,0 ml de S.T. Nal<sup>R</sup> contendo 10<sup>8</sup> ufc do agente, em aves sem estresse (Sem) e, após terem sofrido estresse (Stress) por jejum hídrico e alimentar**

Órgãos*	Recuperação de S. Typhimurium – Tempo após inoculação													
	1 hora		2 horas		4 horas		8 horas		24 horas		72 horas			
	Sem	Stress	Sem	Stress	Sem	Stress	Sem	Stress	Sem	Stress	Sem	Stress		
Inglúvio	4**	4	4	4	3	3	4	4	0	0	0	0		
Proventrículo	2	1	0,5	2	1	1,5	0	1	0,5	0,5	0	0		
Duodeno	2	2,5	0	1	0,5	0	0	0	0	0	0	0		
Cecocolo	0,5	1	0,5	2	0,5	1	2	2	0	2	0	0		
Retocolo	1,5	3	0	2	0,5	0	0	2	0	0	0	0		
Fígado	-/-	-/-	-/+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-		
Sangue	-/-	-/+	-/+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-		

(\*) Média de duas aves, exceto fígado e sangue;

(\*\*) Critério utilizado para contagem de salmonelas:

Recuperação: Presença (+) ou ausência (-) de salmonelas;

1 a 10 UFC - até 1

11 a 50 UFC - 1,1 a 2

51 a 100 UFC - 2,1 a 3

> 100 UFC - 3,1 a 4

## 6. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos, e nas condições em que foram realizados os experimentos, as seguintes principais conclusões podem ser apresentadas:

1. Frangos aparentemente normais, próximos a idade de abate (com 35 dias de idade) e criados comercialmente, foram incapazes de estabelecer infecção intestinal por S.E. e S.T., após inoculação oral com concentrações variando de  $10^3$  a  $10^8$  ufc.
2. A ingestão da lactose apenas interferiu na consistência das fezes, não sendo possível avaliar sua ação na redução das salmonelas, já que o agente não se instalou em aves adultas.
3. Frangos com 35 dias de idade, com sua microbiota natural (protetora), desestabilizada pelo uso de antibiótico, não apresentaram infecção intestinal por S.E. após a inoculação oral de  $10^7$  ufc/ave.
4. Não existe relação entre a inoculação da S.E. e o ganho de peso corporal avaliado no período do experimento.
5. Pintos com um dia de idade foram altamente susceptíveis a infecção e colonização por S.E., confirmando a influência da idade e microbiota protetora, na instalação de infecção por este sorovar.
6. O ingluvío e cecos foram os órgãos com maior intensidade de colonização, embora não tenha sido possível estabelecer a infecção por mais de 24 horas.
7. A infecção em aves adultas e sadias demonstrou baixa capacidade de invasão sistêmica. No entanto nas primeiras horas que o agente entra em contato com a ave foi possível isolar salmonelas do sangue e fígado.

8. Nos experimentos, as aves aparentemente demonstraram a mesma capacidade de persistência e colonização pelos sorovares S.E. e S.T., excretando-os nas primeiras 24 horas após a inoculação.
9. O estresse hídrico e alimentar propiciaram um ligeiro aumento na colonização intestinal e redução da velocidade de excreção do agente pelo trato gastrintestinal da ave.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AFONSO, M. A. **Sobrevivência de *Salmonella enteritidis* em ovos artificialmente contaminados e submetidos a diferentes tipos de cocção e em alimentos preparados a base de ovo e consumido sem tratamento térmico.** Campinas, 1994. 91p. Dissertação (mestrado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
2. ALMEIDA, P. F.; SILVA, E. N.; CASTRO, R. C. Contaminação e disseminação bacterianas de carcaças de frangos em abatedouros. **Higiene Alimentar**, v. 7, p. 12 – 17, Ago., 1993.
3. ALTEKRUSE, S. F.; STERN, N. J.; FIELDS, P. I.; SWERDLOW, D. L. *Campylobacter jejuni* – an emerging foodborne pathogen. **Emerging Infectious Diseases**; v. 5, n. 1, p. 1-11, Jan-mar, 1999.  
<http://www.cdc.gov/ncidod/eid/vol5nol/altekruse.htm>. 22. set. 1999.
4. ANDREATTI FILHO, R. L. **Destino de amostras patogênica e apatogênica de *Escherichia coli* em aves experimentalmente inoculadas e estudos de lesões.** São Paulo, 1989. Dissertação (mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.
5. ANDREATTI FILHO, R. L. **Estudo do uso de carboidratos, ácidos orgânicos e microbiota cecal anaeróbia no controle da infecção experimental de aves por *Salmonella enteritidis* e *Salmonella typhimurium*.** São Paulo, 1997. 245p. Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.
6. ARAÚJO, E.; PACHECO, M. A. S. R.; BONI, R. F.; FONSECA, Y. S. K.; GELLI, S. A.; FERNANDES, S. A.; TAVECHIO, A. T. Surtos alimentares por *Salmonella*

*enteritidis*, associados ao consumo de alimentos à base de ovos, em Sorocaba, SP. **Higiene alimentar**, v. 9, n. 40, p. 24 – 26, 1995.

7. ASSOCIAÇÃO PAULISTA DE AVICULTURA - MERCADO. O caminho do crescimento para a avicultura mineira. **Revista Aves & Ovos**, n. 12, p. 18 – 22, out., 1998.
8. BAILEY, J. S. Integrated colonization control of *Salmonella* in poultry. **Poultry Science**, v. 67, p. 928-932, 1988.
9. BAILEY, J. S. Control of *Salmonella* and *Campylobacter* in poultry production. A summary of work at Russel Research Center. **Poultry Science**, v.72, p.1169-1173, 1993.
10. BAILEY, J. S. Salmonella en avicultura y productos avícolas. **Avicultura Professional**, v. 11, n. 4, p. 166 – 172, 1994.
11. BARNHART, E. T.; CALDWELL, D. J.; BYRD, J. A.; DELOACH, J. R.; CORRIER, D.E.; STANKER, L.H.; HARGIS, B.M. Evaluation of lactose administration in drinking water during feed withdrawal for *Salmonella* reduction in the broiler crop. **Poultry Science**, v. 76, suppl. 1, p.29, 1997. Annual Meeting Abstract.
12. BARNHART, E. T.; BYRD, J. A.; CALDWELL, D. J.; CORRIER, D. E.; CROUCH, J. A.; HARGIS, B. M. 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, n. 2, p. 211 – 214, 1999.
13. BARROW, P. A. Immunisation of laying hens against *S. enteritidis* with live attenuated vaccines. **Veterinary Record**, v.126, p.241-242, 1990.
14. BARROW, P. A.; LOVELL, M. Experimental infection of egg – laying hens with *Salmonella enteritidis* phage type 4. **Avian Pathology**, v. 20, p. 335 – 348, 1991.

15. BARROW, P. A. Salmonellosis in poultry. **Report and Communications Salmonella and Salmonellosis**. Sept. 15 -17, France, 1992.
16. BARROW, P. A. *Salmonella* control-past, present and future. **Avian Pathology**, v.22, p.651-659, 1993.
17. BARROW, P. A.; LOVELL, M. A.; SZMOLLENY, G.; MURPHY, C. K. Effect of enrofloxacin administration on excretion of *Salmonella enteritidis* by experimentally infected chickens and on quinolone resistance of their *Escherichia coli* flora. **Avian Pathology**, v. 27, n.6, p. 586 – 590, 1998.
18. BARROW, P. A. Monitorias e controle das salmonelas em reprodutoras na Europa. **In: CONFERÊNCIA APINCO 1998 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLA**, Campinas, p. 1 – 7, 1998.
19. BARROW, P. A. *Salmonella* em avicultura: problemas e novas idéias sobre possibilidades de controle. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 1, p. 9-16, 1999.
20. BERCHIERI JR., A; PAULILLO, A. C.; FERNANDES, S. A.; PESSOA, G. V. A.; ROSSI JUNIOR, O. D.; IRINO; K.; ÁVILA, F. A; CALZADA, C. T. *Salmonella* em um abatedouro avícola. **Ars. Veterinária**, v3, p.81 – 87, 1987.
21. BERCHIERI JR., A; ADACHI, S. Y.; CALZADA, C. T.; CHIFUMI TAKENCHI; PAULILLO, A. C.; SCHOKEN – ITURRINO, R. P.; TAVECHIO, A T. Farinha de carne como fonte de *Salmonella* em granja avícola. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 9, p. 9 – 12, 1989.
22. BERCHIERI JR., A; BARROW, P. A.; Reduction in incidence of experimental fowl typhoid by incorporation of a comercial formic acid preparation (Bio – add™) into poultry feed. **Poultry Science**, v. 75, p. 339 – 341, 1996.

23. BERGEY'S. manual of systematic bacteriology. 10<sup>a</sup> ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1984, v. 1, p. 1 – 964.
24. BEAUMONT, C.; GUILOT, J. F.; BERTHELOT, F.; DUGHET – SUCHAUX, M.; GIRARD, O; LANTIER, F.; ELSEN, J. M.; PROTAIS, J.; COLIN, P.; BARROW, P.; BUMSTEAD, N.; PARDON, P. Preventing on farm infections through genetic selection. Supplement: **Misset International**, p.4 - 9, May, 1996.
25. BYRD, J. A; CORRIER, D. E.; DELOACH, J. R.; NISBET, D. J; STANKER, L. H. Horizontal transmission of *Salmonella* Typhimurium in broiler chicks. **Applied Poultry Research**, v. 7, n. 1, p.75-80, 1998.
26. COOPER, G. L. *Salmonellosis* - infections in man and the chicken pathogenesis and the development of live vaccines - a review. **Veterinary Bulletin**, v. 64, p. 123 – 143, 1994.
27. CORRIER, D. E.; HINTON, Jr. A.; ZIPRIN, R. L.; BEIER, R. C.; DELOACH, J. R. 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 (a).
28. CORRIER, D. E.; HINTON, Jr. A.; ZIPRIN, R. L; DELOACH, J. R. Effect of dietary lactose on *Salmonella* colonization of market – age broiler chickens. **Avian Diseases**, v. 34, p. 668-676, 1990 (b).
29. CORRIER D. E.; HARGIS, B. M; HINTON Jr., A.; LINDSEY, D.; CALDWELL, D.; MANNING, J; DeLOACH, J. R. Effect of anaerobic cecal microflora and dietary lactose on colonization resistance of layer chicks to invasive *Salmonella enteritidis*. **Avian Diseases**, v. 35, p. 337-343, 1991.
30. CORRIER D. E.; NISBET, D. J; HOLLISTER, A. G; SCANLAN, C. M.; HARGIS, B. M.; DeLOACH, J.R. Development of defined cultures of indigenous cecal

bacteria to control salmonellosis in broiler chicks. **Poultry Science**, v 72, p. 1164-1168, 1993(a).

31. CORRIER D.E.; HARGIS, B. M.; HINTON, Jr. A.; DeLOACH, J.R. Protective effect of used poultry litter and lactose in the feed ration on *Salmonella enteritidis* colonization of Leghorn chicks and hens. **Avian Diseases**, v. 37, p. 47-52, 1993(b).
32. CORRIER D. E.; NISBET, D. J; HARGIS, B. M; KOGUT, M. H.; DeLOACH, J.R. Protective effect of providing lactose to Leghorn hens during molting on *Salmonella* Enteritidis infection. **Poultry Science**, v. 74, suppl. 1, p. 51, 1995.
33. CORRIER, D. E.; BYRD , J. A; HUME, M. E.; NISBET, D. J; STANKER, L. H. Effect of simultaneous or delayed competitive exclusion treatment on the spread of *Salmonella* in chicks. **Applied Poultry Science**, v. 7, n. 2, p. 132-137, 1998.
34. CORRIER, D. E.; BYRD , J. A; HARGIS, B.M; HUME, M.E.; BAILEY, R.H.; STANKER, L. H. Survival of *Salmonella* in the crop contents of market-age broilers during feed withdrawal. **Avian Diseases**, v.43, p.453 – 460, 1999.
35. COX, J. M. What makes *Salmonella enteritidis* stick in chicks?. **Supplement: World poultry special (production processing marketing)**. Misset International, p.4-9, May, 1996.
36. COX, J. M.; BAILEY, J. S.; BERRANG, M. E. Diminishing incidence and level of *Salmonellae* in commercial broiler hatcheries. **Journal Applied Research**, v. 6, p. 90 – 93, 1997.
37. DAY, C. A. Antibióticos e exclusão competitiva. **Revista Aves & Ovos**, p. 14-18, junho, 1996.

38. DAVIES, H. R.; WRAY, H.; Observations on disinfection regimens used on *Salmonella enteritidis* infected poultry units. **Poultry Science**, v. 74, p. 638 – 647, 1995.
39. DAVIES, H. R.; Control strategies – for poultry breeder flocks. **Supplement: World poultry special (production processing marketing)**. Misset International, p.26 - 29, May, 1996.
40. EWING, W. N.; COLE D. J. A. Micro-flora of the gastro-intestinal tract. **The living gut**, 1994. Chapter 4, p. 45-65.
41. FURUSE, M.; YANG, S. I.; NIWA, N.; OKUMURA, J. Effect of short chain fatty acids on the performance and intestinal weight in germ - free and conventional chicks. **British Poultry Science**, v. 32, p.159-165, 1991.
42. GAST, R.; BEARD, C. W. Isolation of *Salmonella enteritidis* from internal organs of experimentally infected hens. **Avian Diseases**, v. 34, p. 991-993, 1990.
43. GAST, R.; BEARD, C. W. Evaluation of a chick mortality model for predicting the consequences of *Salmonella enteritidis* infections in laying hens. **Poultry Science**, v. 71, p. 281:287, 1992.
44. GAST, K. R. Detection of *Salmonella enteritidis* in experimentally infected laying hens by culturing pools of egg contents. **Poultry Science**, v. 72, p. 267-274, 1993.
45. GAST, R. K; HOLT, P. Persistence of *Salmonella* Enteritidis from one day of age until maturity in experimentally Infected egg – type chickens. **Poultry Science**, v. 76, suppl. 1, p. 20, 1997.
46. GORHAM, S. L.; KADAVIL, K.; LAMBERT, H.; VAUGHAN, E.; PERT, B.; ABEL, J. Persistence of *Salmonella enteritidis* in young chickens. **Avian Pathology**, v. 20; p. 433-437, 1991.

47. HARGIS, B. M.; CALDWELL, D. J.; BREWER, R. L.; CORRIER, D. E.; DELOACH, J. R. Evaluation of the chicken crop as a source of *Salmonella* contamination for broiler carcasses. **Poultry Science**, v. 74, p. 1548-1552, 1995.
48. HASSAN, J. O.; CURTIS R. Virulent *Salmonella typhimurium*: induced lymphocyte depletion and imunodepression in chickens. **Infection and immunity**, p. 2027-2036, may, 1994.
49. HINTON Jr, A.; CORRIER, D. E.; SPATES, G. E.; NORMAN, J. O.; ZIPRIN, R. L.; BEIER, R. C; DeLOACH, J. R. Biological control of *Salmonella typhimurium* in young chickens. **Avian Diseases**, v. 34, p. 626-633, 1990.
50. HINTON, M. Infecções causadas por *Salmonella* em aves e seus respectivos controles. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, junho, 1992, Santos. p. 122- 119, **Anais**.
51. HOLLISTER, A. G; CORRIER, D. E; NISBET, D. J; BEIER, R. C; DELOACH, J. R. Comparison of effects of chicken cecal microorganisms maintained in continuous culture and provision of dietary lactose on cecal colonization by *Salmonella typhimurium* in turkey poults and broiler chicks. **Poultry Science**, v. 73, p. 640-647, 1994.
52. HUMBERT, F.; LALANDE, F.; L' HOSPITALIER, R.; SALVAT, G.; BENNEJEAN, G. Effect of four antibiotic additives on the *Salmonella* contamination of chicks protected by an adult caecal flora. **Avian Pathology**, v. 20, p. 577-584, 1991.
53. HUME, M. E.; CORRIER, D. E.; IVIE, W.; DeLOACH, J. R. Metabolism of [<sup>14</sup>C] propionic acid in broiler chicks. **Poultry Science**, v. 72, p. 786-793, 1993a.
54. HUME, M. E.; CORRIER, D. E.; AMBRUS, S.; HINTON, Jr. A.; DeLOACH, J. R. Effectiveness of dietary propionic acid in controlling *Salmonella typhimurium* colonization in broiler chicks. **Avian Diseases**, v. 37, p. 1051-1056, 1993b.

55. HUMPHREY, T. J.; BASKERVILLE, A.; WHITEHEAD, A.; ROWE, B.; HENLEY, A. Influence of feeding patterns on the artificial infection of laying hens with *Salmonella enteritidis* phage type 4. **Veterinary Record** v. 132, p. 407 – 409, 1993
56. HUMPHREY, T. J. Important and relevant attributes of the *Salmonella* organism. INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON FOOD BORNE SALMONELLA IN POULTRY, **Proceedings**, Baltimore 1998, p. 43- 55.
57. IBA, A. M.; BERCHIERI, Jr., A. Studies on the use of a formic acid – propionic acid mixture (BIO – add™) to control experimental *Salmonella* infection in broiler chickens. **Avian Pathology**, v. 24, p. 303-311, 1995.
58. IRINO, K.; FERNANDES, S. A.; TAVECHIO, A T.; NEVES, B. C.; DIAS, A M. G. Progression of *Salmonella* Enteritidis phage type 4 strains in São Paulo State, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v. 38, p. 193 – 196, maio/ junho, 1996.
59. INFORME APINCO. **O atual rendimento dos frangos criados no Brasil**. Campinas, Agosto, 1999.
60. KONEMAM, E. W.; ALLEN, S. D.; DOWELL Jr, V. R.; SOMMERS, H. M. **Diagnóstico microbiológico texto e atlas colorido**. 2. ed., São Paulo, Panamericana, 1993. p. 1 – 730.
61. LANGONI, H.; PRADO, R. A. T.; PINTO, J. P. A. N.; BALDINI, S.; PIMENTEL, V. L. Isolamento de *Salmonelas* em ovos de galinha oferecidos para o consumo no comercio de Botucatu. **Higiene Alimentar**, v. 9, n. 37, 1995.
62. LE MINOR L.; POPOFF M. Designation of *Salmonella enterica* sp. nov., nom. rev., as the type and only species of the genus *Salmonella*: request for an opinion. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 37, n. 4, p. 465 – 468, 1987.

63. LILLARD, H. S. The impact of comercial processing procedures on the bacterial contamination and cross contamination of broiler carcasses. **Journal Food Production.**, v. 53, p. 202-204, 1990.
64. LÍRIO, V. S.; SILVA, E. A.; STEFONI, S.; CAMARGO, D.; RECCO, E. A.; MALUF, Y. T.; MIYAZAWA T.; NEVES, D.; OLIVEIRA, V. M. R.. Frequência de 17 sorotipos de *Salmonella* isolados em alimentos. **Higiene alimentar**, v. 12 , n. 55, maio/junho, 1998.
65. MARTINS, S. S. Quem ganha com o processo técnico na avicultura?. **Revista Aves & Ovos**, n. 12, p. 04 – 11, out., 1996.
66. McHAN, F.; SHOTTS, E. B.; BROWN, J. Effect of feeding selected carbohydrates on the "in vivo" attachment of *Salmonella typhimurium* in chick ceca. **Avian Diseases**, v. 35, p. 328-331, 1991.
67. 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.
68. MCILROY, S. G. How do birds become infected by *Salmonella* serotype. **Supplement: World poultry special (production processing marketing)**. Misset International, p. 15 - 17, may, 1996.
69. MCILROY, S. G. Control of *Salmonella* contamination of poultry feeds.: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON FOOD BORNE SALMONELLA IN POULTRY, **Proceedings**, Baltimore, 1998, p. 83- 87.
70. NAVARRO, P. M. *Salmonella* Enteritidis em reprodutoras pesadas. **Revista Aves & Ovos**. V. 12, n. 12, p. 34-38, out. 1996.
71. FDA / CFSAN BAB, BUG, BOOK – *Salmonella spp.* Referência bibliográfica de documentos eletrônicos. <http://vm.cfsan.fda.gov/~mow/chap1.html>. 22 Set. 1999.

72. NISBET, D. J.; CORRIER, D. E.; DeLOACH, J. R. Effect of mixed cecal microflora maintained in continuous culture and dietary lactose on *S. typhimurium* colonization in broiler chicks. **Avian diseases**, v. 37, p. 528-535, 1993a.
73. NISBET, D. J.; CORRIER, D. E.; SCANLAN, C. M.; HOLLISTER, A. G.; BEIER, R. C.; DELOACH, J. R. 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, 1993b.
74. NISBET, D. J.; CORRIER, D. E.; SCANLAN, C. M.; HOLLISTER, A. G.; HOLLISTER, A. G.; BEIER, R. C.; DELOACH, J. R. Effect of dietary lactose and cell concentration on the ability of a continuous – flow – derived bacterial culture to control *Salmonella* cecal colonization in broiler chickens. **Poultry Science**, v. 73, p. 56-62, 1994.
75. OYARZABAL, O. A.; CONNER, D. E. Application of direct – fed microbial bacteria and fructooligosaccharides for *Salmonella* control in broilers during feed withdrawal. **Poultry Science**, v.75, p. 186 –190, 1996.
76. 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, n. 11, p. 1501 – 1505, 1997.
77. PICCOLO, R. C.; PIMENTEL, E. L.; F'AVERO, L. M.; RIZZO, M. A. Surto de salmonelose ocorrido em cantina de escola no município de São Paulo em 1991. **Higiene alimentar**, v. 6, n. 23, set., 1992.
78. POPPE, C. Salmonellosis in poultry and people. **Supplement: World poultry special (production processing marketing)**. Misset International, p. 13 - 14, May, 1996.

79. PROTAIS, J.; COLIN, P.; BEAUMONT, C.; GUILLOT, J. F.; LANTIER, F.; PARDON, P.; BENNEJEAN, G. Line differences in resistance to *Salmonella enteritidis* PT4 infection. **British Poultry Science**, v. 37, p. 329-339, 1996.
80. RAMBOUSEK, M. J.; IBA, A. M.; STACISSINI, A. V. M.; BERCHIERI, Jr., A. The effect of carbohydrate administration on experimental infection with *Salmonella* serotypes in chickens. **Revista Microbiologia.**, v.26, p.32-36, 1995.
81. RAMIREZ, G. A.; SARLIN, L. L.; CALDWELL, D. J.; YEZAK, C. R.; HUME, M. E.; CORRIER, D. E.; DE LOACH, J. R.; HARGIS, B. M. 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.
82. SCHNEITZ, C.; NUOTIO, L.; MEAD, G.; NURMI, E. Competitive exclusion in the young bird: challenge, models, administration and reciprocal protection. **International Journal of Food Microbiology**, v. 15, n. 3/4, 1992.
83. SILVA, E. N. *Salmonella enteritidis* em aves e saúde pública. **Higiene alimentar**, v. 9, n. 37, maio/junho, 1995.
84. SILVA, E. N. Salmonelose aviária e suas implicações no contexto da Saúde Pública. IN: CONGRESSO PERNAMBUCANO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 4, 1999, RECIFE, PE. **ANAIS**. p. 25 – 34.
85. STAVRIC, S. Defined cultures and prospects. **International Journal of Food Microbiology**. v. 15, p. 245 – 263, 1992.
86. STAVRIC, S.; D'AOUST, J.Y. Undefined and defined bacterial preparations for the competitive exclusion of *Salmonella* in poultry: a review. **Journal of Food Protection**, v. 56, p. 173 – 180, 1993.
87. TAUNAY, A. E; FERNANDES, S. A; TAVECHIO, A. T.; NEVES, B. C; DIAS, A. M. G; IRINO K. The role of public health laboratory in the problem of salmonellosis in

São Paulo, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 38, n. 2, p. 119-127, mar. /Abr., 1996.

88. TELLEZ, G. I.; DEAN, C. E.; CORRIER, D. E.; DeALOACH, J. R.; JAEGER, L.; HARGIS, B. M. Effect of dietary lactose on cecal morphology, pH, organic acids, and *Salmonella enteritidis* organ invasion in Leghorn chicks. **Poultry Science**, v. 72, p. 636-642, 1993.
89. TIETJEN, M.; FUNG, D. Y. C. *Salmonellae* and food safety. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 21, n.1, p. 53-83, 1995.
90. TRABULSI, L. R.; TOLEDO, M. R. F. **Microbiologia**. São Paulo: Atheneu, 2<sup>a</sup> ed., 1991. p. 386.
91. VAN DER WALL, P. *Salmonella* control of feed stuffs by pelleting or acid treatment. **Zootecnica**, p.28-31, nov, 1980.
92. WALDROUP, A. L.; YAMAGUCHI, W; SKINNER, J. T.; WALDROUP, P. W. Effects of dietary lactose on incidence and levels of *Salmonellae* on carcasses of broiler chickens grown to market age. **Poultry Science**, v. 71, p. 288-295, 1992.
93. WEINACK, O. M.; SNOEYENBOS, G. H.; SMYSER, C. F.; SOERJADI, A. S. Reciprocal competitive exclusion of *Salmonella* and *Escherichia coli* by native intestinal microflora of the chicken and turkey. **Avian Disease.**, v. 26, p. 585 – 595, 1982.
94. WIERP, M.; ENGSTIOM, B. Control of *Salmonella* in food producing animals in Sweden. **Report and Comunications Salmonella and Salmonellosis**. Sept. 15-17, 1992 - France.

95. ZEIDLER, G. Who's afraid of the Salmonella wolf?. **Supplement: World poultry special (production processing marketing)**. Misset International, p.4-9, May, 1996.
96. ZIPRIN, R. L.; CORRIER, D. E.; HINTON, Jr. A.; BEIER, R. C.; SPATES, G. E.; ; DELOACH, J. R.; ELISSALDE, M. H. Intraclonal *Salmonella typhimurium* infection of broiler chickens: reduction of colonization with anaerobic organisms and dietary lactose. **Avian Diseases**, v. 34, p. 749-753, 1990.
97. 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.

## 8. APÊNDICE

As fórmulas dos meios de cultivo e reagentes, utilizados nos experimentos estão descritas a seguir.

Os meios de cultivo foram utilizados na forma desidratada e preparados conforme instruções do fabricante.

### Água Tamponada Peptonada (BPW)

- Peptona bacteriológica ..... 10,0g
- Cloreto de sódio ..... 5,0g
- Fosfato de sódio bibásico dodecahidratado ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$ )..... 9,0g
- Fosfato monopotássico( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )..... 1,5 g

Os sais da formulação foram suspensos em 1 litro de água destilada. Aquecido até a total dissolução, e padronizado em pH 7,0; em seguida foram distribuídos em frascos e autoclavados a 121°C por 15 minutos.

### Solução de Ácido Nalidíxico

Em uma solução de NAOH a 0,002N obtida da mistura de 0,2ml de NaOH1N e 99,8ml de água destilada, acrescentaram-se 500mg de ácido nalidíxico, misturando até obter uma solução homogênea.

### Solução de Novobiocina

Utilizando o grau de pureza do produto, pesou-se 2,08g de sal de novobiocina dissolvido em 100ml de água destilada para o preparo da solução de novobiocina na

concentração de 20 mg/ml. Após a dissolução, a solução foi esterilizada em filtro Millipore e armazenada sob refrigeração.

### **Caldo Tetrionato(TT)**

- Proteose peptona .....5,0g
- Sais biliares .....1,0g
- Tiosulfato de sódio ..... 30,0g
- Carbonato de cálcio ..... 10,0g
- Água destilada.....1.000,0ml

O meio foi pesado e suspenso em água destilada. A seguir foi aquecido até ponto de fervura. O caldo foi distribuído (10ml por tubo) de forma asséptica em tubo estéril. Durante a distribuição manteve-se agitação contínua para evitar precipitação. No momento do uso foi adicionado 0,2ml de solução de iodo para cada 10ml do meio base.

### **Solução de Iodo**

- Cristais de iodo .....6,0 g
- Iodeto de potássio .....5,0 g
- Água destilada .....1000,0 ml

Após a trituração dos cristais de iodo, adicionou-se iodeto de potássio e homogeneizou com água destilada. Esta solução foi adicionada ao caldo tetrionato apenas no momento do uso.

### **Caldo de Soja Triptona (TSB)**

- Triptona (digestivo pancreático de caseína) ..... 17g
- Soitona (digestivo de farinha de soja) ..... 3g
- Dextrose..... 2,5g
- Cloreto sódico..... 5 g
- Fosfato dipotássico..... 2,5g
- Água destilada ..... 1000,0 ml

O meio foi pesado, diluído em água e aquecido até total dissolução. Após foi autoclavado a 121°C pôr 15 minutos distribuídos em tubos de ensaio estéreis.

### **Água Peptonada 0,1%**

- Peptona bacteriológica ..... 0,1g
- Água destilada ..... 100ml

A peptona foi pesada, suspensa em água destilada, e aquecida até total dissolução, em seguida foi autoclavada a 121°C por 15 minutos e distribuída em frascos e ou tubos de ensaio estéreis na quantidade desejada.

### **Caldo Uréia**

- Extrato de levedura ..... 0,1g
- Fosfato de potássio monobásico..... 9,1g
- Fosfato de potássio bibasico..... 9,5g
- Uréia..... 20g
- Vermelho de fenol..... 0,01g
- Água destilada ..... 1000,0ml

O meio foi pesado, diluído em água sob agitação até total dissolução e esterilizado utilizando a técnica de filtração. Após foi distribuído (3ml) em tubos de ensaio estéreis (pH 6,8 ± 0,1).

### **Ágar Mac Conkey (MC)**

- Peptona .....	17g
- Proteose peptona .....	3g
- Lactose .....	10g
- Sais biliares .....	1,5g
- Cloreto de sódio .....	5g
- Ágar .....	13,5g
- Vermelho neutro .....	0,03g
- Cristal violeta .....	0,001g
- Água destilada .....	1000,0ml

O meio foi pesado, diluído em água e aquecido até total dissolução. Após foi autoclavado a 121°C por 15 minutos (pH 7,1 ± 0,2). O meio foi resfriado até a temperatura de aproximadamente 60°C e adicionado da solução de antibiótico (Nal e ou Nob)

### **Ágar Hektoen Enteric (HE)**

- Proteose peptona .....	12g
- Extrato de Levedura.....	3g
- Sais biliares nº 3.....	9g
- Lactose.....	12g
- Sacarose.....	12g
- Salicina.....	2g
- Cloreto sódico.....	5g

- Tiosulfato de sódio.....5g
- Citrato de ferro amoniacal.....1,5g
- Ágar.....14g
- Azul de bromo timol.....0,065g
- Fucsina ácida.....0,1g
- Água destilada .....1000,0ml

O meio foi pesado, diluído em água e aquecido até ebulição e total dissolução. Não pode ser autoclavado (pH 7,5 ± 0,2). Após resfriado até temperatura de aproximadamente 60°C, adicionou-se a solução de antibiótico (Nal e ou Nob).

### **Ágar Verde Brilhante (BGA)**

- Proteose peptona ..... 10g
- Extrato de levedura ..... 3g
- Lactose ..... 10g
- Sacarose ..... 10g
- Cloreto de sódio ..... 5g
- Ágar .....20g
- Verde brilhante ..... 0,0125g
- Vermelho de fenol .....0,08g
- Água destilada ..... 1000,0 ml

O meio foi pesado, diluído em água e aquecido até total dissolução. Após foi autoclavado a 121°C pôr 15 minutos (pH 6,9 ± 0,2).

### **Tríplice Ágar Ferro(TSI)**

- Extrato de carne ..... 3g
- Extrato de levedura ..... 3g

- Peptona .....	15g
- Proteose peptona .....	5g
- Dextrose .....	1g
- Lactose.....	10g
- Sacarose.....	10g
- Sulfato ferroso.....	0,2g
- Cloreto de sódio.....	5g
- Tiosulfato de sódio.....	0,3g
- Vermelho de fenol.....	0,0024g
- Ágar.....	12g
- Água destilada.....	1000,0ml

O meio foi pesado, diluído em água e aquecido até total dissolução. Após foi autoclavado a 121°C por 15 minutos (pH: 7,3 ± 0,2), distribuídos em tubos de ensaio (4,5ml) e inclinados para solidificação de modo que se obtenha uma base de pelo menos 2 cm de altura.

### **Lisina Ferro Ágar(LIA)**

- Peptona .....	5g
- Extrato de levedura.....	3g
- Dextrose.....	1g
- L- lisina hidrocloreídrica.....	10g
- Citrato férrico amoniacal.....	0,5g
- Tiosulfato de sódio.....	0,04g
- Púrpura de bromo cresol.....	0,02g
- Agar.....	15g
- Água destilada.....	1000,0ml

O meio foi pesado, diluído em água e aquecido até total dissolução. Após foi autoclavado a 121°C por 15 minutos (pH 6,7 ± 0,2), distribuídos em tubos de ensaio (4,5ml) e inclinados para solidificação de modo que se obtenha uma base de pelo menos 2 cm de altura.

### Ágar Nutriente

- Extrato de carne .....3g
- Peptona .....5g
- Ágar ..... 15g
- Água destilada .....1000,0ml

O meio foi pesado, diluído em água e aquecido até total dissolução em seguida foi autoclavado a 121°C por 15 minutos (pH 6,8 ± 0,2). Após resfriado até a temperatura de aproximadamente 60°C, adicionou-se a solução de antibiótico (Nal e ou Nob).

### Abreviações

<b>Salmonella Enteritidis</b> .....	<b>S.E.</b>
<b>Salmonella Typhimurium</b> .....	<b>S.T.</b>
<b>Ácido nalidíxico</b> .....	<b>Nal</b>
<b>Novobiocina</b> .....	<b>Nob</b>
<b>Resistente a ácido nalidíxico</b> .....	<b>Nal<sup>R</sup></b>
<b>Resistente a novobiocina</b> .....	<b>Nob<sup>R</sup></b>
<b>Ágar Mac Conkey</b> .....	<b>MC</b>
<b>Ágar Hektoen Enteric</b> .....	<b>HE</b>
<b>Ágar Verde Brilhante</b> .....	<b>BGA</b>
<b>Água Tamponada Peptonada</b> .....	<b>BPW</b>
<b>Água Peptonada</b> .....	<b>AP</b>

**Tríplice Sugar iron.....TSI**  
**Lisina Agar Iron.....LIA**  
**Caldo de Soja Triptona.....TSB**  
**Unidade formadora de colônias.....ufc**  
**Gramas) .....g**  
**Mililitro(s) .....ml**