

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

JOÃO CARLOS GANDARA MARTINS

ÁCIDOS ORGÂNICOS E PROBIÓTICO NA REDUÇÃO DA COLONIZAÇÃO DE
***Salmonella enterica* Heidelberg EM FRANGOS DE CORTE**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

LONDRINA
2015

JOÃO CARLOS GANDARA MARTINS

**ÁCIDOS ORGÂNICOS E PROBIÓTICO NA REDUÇÃO DA COLONIZAÇÃO DE
Salmonella enterica Heidelberg EM FRANGOS DE CORTE**

Dissertação de mestrado, apresentado ao Curso de Mestrado Profissionalizante em Tecnologia de Alimentos, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, Câmpus Londrina, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre da Trindade Alfaro
Coorientadora: Prof. Dra. Elisabete Hiromi Hashimoto

LONDRINA
2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca UTFPR - Câmpus Londrina

M386a Martins, João Carlos Gandara

Ácidos orgânicos e probiótico na redução da colonização de *Salmonella enterica* Heidelberg em frangos de corte / João Carlos Gandara Martins. -

Londrina: [s.n.], 2015.

76 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre da Trindade Alfaro.

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Elisabete Hiromi Hashimoto.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos. Londrina, 2015.

Bibliografia: f. 71-76

1. Salmonela. 2. Frango de corte. 3. Ácidos orgânicos. 4. Probióticos.
I. Alfaro, Alexandre da Trindade, orient. II. Hashimoto, Elisabete Hiromi,
coorient. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. IV. Programa de
Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos. V. Título.

CDD: 664

FOLHA DE APROVAÇÃO

ÁCIDOS ORGÂNICOS E PROBIÓTICO NA REDUÇÃO DA COLONIZAÇÃO DE *Salmonella enterica* Heidelberg EM FRANGOS DE CORTE

por

JOÃO CARLOS GANDARA MARTINS

Esta dissertação foi apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de MESTRE EM TECNOLOGIA DE ALIMENTOS – Área de Concentração: Tecnologia de Alimentos, pelo Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos – PPGTAL – da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR – Câmpus Londrina às 08:30 h do dia 26 de agosto de 2015. O trabalho foi aprovado pela Banca Examinadora, composta por:

Prof. Dr. Alexandre da Trindade Alfaro
Universidade Tecnológica Federal do
Paraná
Orientador

Prof. Dr. Gustavo Graciano Fonseca
Universidade Federal da Grande Dourados
Membro Examinador Titular

Prof^a. Dr^a. Patrícia Rossi
Universidade Tecnológica Federal do
Paraná
Membro Examinador Titular

Visto da coordenação:

Prof. Fábio A. Coró, Dr.
(Coordenador do PPGTAL)

A folha de aprovação assinada encontra-se arquivada na secretaria do Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos

Dedico este trabalho à minha família,
Vanessa Cristina Maciel Gandara Martins
e Laura Maciel Gandara Martins, pelos
momentos de ausência.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me iluminar e dar forças para percorrer os caminhos da vida.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Alexandre da Trindade Alfaro e à minha coorientadora Prof. Dra. Elisabete Hiromi Hashimoto pelos ensinamentos, orientações, agilidade e paciência na execução e confecção deste trabalho.

À Prof. Dra. Andréa Cátia Leal Badaró e Prof. Doutoranda Naimara Vieira do Prado pelas orientações em várias etapas deste trabalho.

Aos meus colegas Adriana, Camila, Crislane, Daiane, Fabiana, Jamil e Janaína.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos da UTFPR Câmpus Francisco Beltrão e Londrina.

Aos alunos de Iniciação Científica, pelo apoio no laboratório de microbiologia da UTFPR - FB.

Ao Fabrizzio Mattei, por disponibilizar os produtos utilizados no experimento.

Aos acadêmicos do Curso de Zootecnia da UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, Andrei, Jonas, Daiane, e Mestrado em Zootecnia, Willian, pelo apoio durante a execução do projeto.

À Prof. Dra. Patrícia Rossi e à Prof. Dra. Sabrina Endo Takahashi da UTFPR Câmpus Dois Vizinhos, pela disponibilidade do aviário experimental, e contribuição no projeto.

À equipe do laboratório Mercolab, pelas contribuições nessa pesquisa, em especial Joice Aparecida Leão.

Ao professor Dr. Guillermo Tellez pelas orientações e considerações.

Gostaria de deixar registrado também, o meu reconhecimento à minha família, Vanessa Cristina Maciel Gandara Martins e Laura Maciel Gandara Martins, pois vocês foram a motivação para o desenvolvimento deste trabalho. Aos meus pais Carlos Gandara Martins Filho e Nilda Maria Joppert Gandara Martins pelo apoio em toda a minha educação e trajetória acadêmica.

Aos meus avós maternos, Juliano Bittencourt Joppert e Nilda Bittencourt Joppert pelo incentivo aos estudos.

À minha família em Francisco Beltrão, que me incentivou na trajetória, Angelina Maciel, Mozart dos Santos Maciel.

A Unidade da BRF de Francisco Beltrão, na qual desenvolvo minhas atividades profissionais: Gerências – Fábio Coelho Dias e Ronaldo João Scariott; Fomento Agropecuário: Clair José de Oliveira e aos colegas que deram suporte ao meu trabalho nos momentos em que precisei me dedicar ao mestrado. Fábrica de Rações Comerciais - João Carlos Penso Filho e Luciano; Incubatório: Vonei Oliveira e Romário Rotili; Garantia da Qualidade – Sandro Parteca e Michele Lusini.

À prof. MSc. Myrna Estela Mendes Maciel, pela orientação no conteúdo desta dissertação.

Aos membros da banca avaliadora da dissertação Prof. Dra. Patrícia Rossi, e Prof. Dr. Gustavo Graciano Fonseca.

MUITO OBRIGADO!

A família é o meu ponto de equilíbrio na vida. É onde tenho grande paz, muito amor, carinho, compreensão. São pessoas que, com palavras macias ou duras, sempre procuram me ajudar, querem o meu crescimento. (SENNÁ, Ayrton).

RESUMO

MARTINS, João Carlos Gandara. **Ácidos orgânicos e probiótico na redução da colonização de *Salmonella enterica* Heidelberg em frangos de corte.** 76p. Dissertação (Mestrado Profissional em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Londrina, 2015.

Na indústria de alimentos, *Salmonella* sp. e outros microrganismos patogênicos representam uma das maiores ameaças como causas potenciais de doenças de origem alimentar. A *Salmonella enterica* sorovar Heidelberg (SH) tem grande importância para a saúde pública, sendo atualmente o sorotipo de maior ocorrência nas análises oficiais de controle realizadas no sul do Brasil. Nessa região estão concentrados os maiores plantéis avícolas, contribuindo com mais de 60 % da produção brasileira de carne de frango. Para auxiliar na prevenção e minimizar as infecções por bactérias patogênicas, além do atendimento das normas de biossegurança no campo e bons programas de higiene e sanitização na indústria, há a possibilidade de controle diretamente sobre o plantel avícola. O uso de ácidos orgânicos adicionados na dieta das aves possui uma ação antibacteriana. Por outro lado, o uso de probióticos demonstrou prevenir doenças entéricas. Esta dissertação dividiu-se em dois capítulos e objetivou avaliar a redução quantitativa e qualitativa de SH em frangos de corte. No primeiro capítulo o objetivo foi de coletar informações sobre o coeficiente de prevalência da cepa de SH em frangos de corte. Este coeficiente foi de 100 %, sendo um método adequado para a determinação da frequência de salmoneloses em frangos de corte. No segundo capítulo foram avaliados cinco tratamentos (um controle positivo e quatro testes), com o objetivo de reduzir a colonização da SH em frangos de corte, utilizando-se ácidos orgânicos e probiótico durante a fase de produção. Na contagem de SH referente à colonização do ceco aos 28 dias de idade foram encontradas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos. O tratamento 2 apresentou a contagem de 41 números mais prováveis de células bacterianas por grama (NMP/g), com menor contagem quando comparado ao controle positivo (5.106 NMP/g) e ao tratamento 1 (1.354 NMP/g). A avaliação do índice de aves infectadas observou-se diferença entre os tratamentos. O tratamento 2 e o tratamento 4 reduziram 58,34 % e 25 %, respectivamente a quantidade de aves contaminadas com SH. Não houve efeito dos tratamentos no desempenho zootécnico. A administração de ácidos orgânicos e probiótico utilizada no tratamento 2 mostrou-se uma ferramenta eficaz no controle de SH em frangos de corte aos 28 dias de idade.

Palavras-chave: Saúde pública. Coeficiente de prevalência. *Salmonella*. Probiótico. Ácidos orgânicos.

ABSTRACT

MARTINS, João Carlos Gandara. **Organic acids and probiotic in reducing the colonization of *Salmonella enterica* Heidelberg in broiler chickens.** 76p. Dissertation (Professional Masters Degree in Food Technology) - Federal University of Technology – Paraná. Londrina, 2015.

In the food industry, *Salmonella* sp. and other pathogens represent a major threat as potential causes of foodborne diseases. The *Salmonella enterica* serovar Heidelberg (SH) has a great importance to public health, being currently the most frequent serotype in the official control analyzes carried out in Brazil's Southern. In this region are concentrated the largest poultry flocks, contributing over 60 % of Brazilian production of chicken meat. To help prevent and minimize infections by pathogenic bacteria, in addition to attend the standards of biosecurity in the field and good hygiene and sanitizing programs in the industry, there is the possibility to control directly on the poultry breeding. Use of organic acids added in the diet of the fowls has an antibacterial action. In the other hand, the use of probiotics has been shown to prevent enteric diseases. This dissertation was divided into two chapters and aimed to evaluate the quantitative and qualitative reduction of SH in broiler chickens. In the first chapter the aim was to collect information on the prevalence rate of SH strain in broiler chickens. This coefficient was 100 %, being a suitable method for determining the frequency of salmonellosis in broiler chickens. In the second chapter five treatments were evaluated (a positive control and four tests), in order to reduce the colonization of SH in broilers, using organic acids and probiotic during production phase. In SH count related to the colonization of the cecum at 28 days of age differences were observed ($p < 0,05$) among treatments. The Treatment 2 showed a count of 41 most probable number of bacterial cells per gram (MPN/g) with lower counts when compared to the positive control (5.106 MPN/g) and treatment 1 (1.354 MPN/g). The evaluation index of infected birds, there was a difference between treatments. In treatment 2, and treatment 4 reduced 58,34 % and 25 % respectively the number of fowls infected with SH. There was no effect of treatments on the performance. Administration of organic acids and probiotic used in the treatment 2 proved to be an effective tool in the SH control in broilers at 28 days of age.

Keywords: Public health. Prevalence coefficient rate. *Salmonella*. Probiotic. Organic acids.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Volume de exportações de carne de frango (%) por estado em 2014	19
Figura 2 - Níveis de pH ao longo do TGI das aves.....	20

Capítulo 1

Figura A1 - Coeficiente de Prevalência de 100 %, demonstrando as aves desafiadas e sentinelas.....	48
--	----

Capítulo 2

Figura B1 - Coleta de ceco e acondicionamento em embalagem asséptica.....	61
Figura B2 - Diluição seriada; placa MSRV; placa XLD/VB; bioquímica.....	62

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2

Tabela 1 - Tratamentos empregados para a redução da contaminação por <i>Salmonella enterica</i> Heidelberg em frangos de corte com diferentes administrações	60
Tabela 2 - Contagem de colônias no ceco de aves desafiadas com SH e submetidas a diferentes tratamentos com ácidos orgânicos e probiótico.....	64
Tabela 3 - Percentual de aves contaminadas com SH aos 28 dias de idade nos diferentes tratamentos.....	67
Tabela 4 - Peso médio corporal (g) e desvio padrão de frangos de corte nos dias 0, 7, 14, 21 e 28 dias	68
Tabela 5 – Média e desvio padrão de ganho de peso diário e conversão alimentar nos diferentes tratamentos.....	69

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E UNIDADES DE MEDIDAS

±	Mais ou menos
x	Vezes
%	Porcentagem
°C	Graus <i>Celsius</i>
ABEF	Associação Brasileira dos Exportadores de Carne de Frango
ABPA	Associação Brasileira de Proteína Animal
APPCC	Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle
ATCC	<i>American Typer Culture Colection</i>
BPF	Boas Práticas de Fabricação
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
CDC	<i>Center for Desease Control</i>
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CFMV	Conselho Federal de Medicina Veterinária
DNA	Ácido desoxirribonucléico
Eq.	Equação
EUA	Estados Unidos da América
G	Gramas
H	Horas
Hab.	Habitantes
ISO	<i>International Organisation for Standardization</i>
LIA	<i>Lysine Iron Agar</i>
m	Metros
mL	Mililitros
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
MSRV	<i>Rappaport Vassiliadis Semisolid Modification</i>
NMP	Número Mais Provável
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pH	Potencial Hidrogeniônico
PHAC	<i>Public Healthy Agency of Canada</i>
PPHO	Procedimentos Padrão de Higiene Operacional
®	<i>Registered</i>
RPC	República Popular da China
SIM	<i>Sulfide Indole Motility Medium</i>
SINDIAVIPAR	Sindicato das Indústrias Avícolas do Estado do Paraná
TGI	Trato Gastrointestinal
™	<i>Trade Mark</i>
TSI	<i>Triple Sugar Iron</i>
UE	União Europeia
VB	Verde Brilhante
XLD	<i>Xylose Lysine Desoxycholate</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVO GERAL.....	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
3 REFERENCIAL TEÓRICO	17
3.1 MERCADO BRASILEIRO DE CARNE DE FRANGO.....	17
3.2 O FRANGO DE CORTE NO SUL DO BRASIL.....	18
3.3 MICROBIOTA DO TRATO GASTROINTESTINAL DAS AVES.....	19
3.4 CARACTERÍSTICAS GERAIS DO GÊNERO <i>Salmonella</i>	21
3.4.1 <i>Salmonella enterica</i> Heidelberg.....	22
3.5 MICRORGANISMOS NA PLANTA DE ABATE DE FRANGOS DE CORTE.....	22
3.6 ÁCIDOS ORGÂNICOS.....	23
3.7 PROBIÓTICOS.....	25
3.8 MÉTODOS DE DETECÇÃO DE <i>Salmonella</i> sp.	27
REFERÊNCIAS	29
CAPÍTULO 1 - PREVALÊNCIA DE <i>Salmonella enterica</i> Heidelberg EM FRANGOS DE CORTE	39
RESUMO	40
ABSTRACT	41
4 INTRODUÇÃO	42
5 MATERIAL E MÉTODOS	43
5.1 MATERIAL.....	43
5.2 LOCAL.....	43
5.3 AMBIENTE.....	43
5.4 MANEJOS EXPERIMENTAIS.....	43
5.5 PREPARO DO INÓCULO DE <i>Salmonella enterica</i> Heidelberg E DESAFIO DAS AVES.....	44
5.6 MONITORAMENTO DA CAMA ATRAVÉS DE SWAB DE PROPÉ.....	45
5.7 COLETA DE MATERIAL E ANÁLISE MICROBIOLÓGICA.....	45
5.8 ESTUDO DE PREVALÊNCIA.....	46
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
7 CONCLUSÃO	49
REFERÊNCIAS	50
CAPÍTULO 2 - AVALIAÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS E PROBIÓTICO PARA REDUÇÃO DE <i>Salmonella enterica</i> Heidelberg EM FRANGOS DE CORTE	53
RESUMO	54
ABSTRACT	55
8 INTRODUÇÃO	56
9 MATERIAL E MÉTODOS	57
9.1 MATERIAL.....	57
9.2 LOCAL.....	57
9.3 AMBIENTE.....	58
9.4 MANEJOS EXPERIMENTAIS.....	58
9.5 PREPARO DO INÓCULO DE <i>Salmonella enterica</i> Heidelberg E DESAFIO DAS AVES.....	59

9.6 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	59
9.7 MONITORAMENTO DA CAMA ATRAVÉS DE SWAB DE PROPÉ.....	60
9.8 COLETA DE MATERIAL.....	60
9.9 PROCEDIMENTO DE CONTAGEM DE <i>Salmonella enterica</i> Heidelberg PELA TÉCNICA DE NÚMERO MAIS PROVÁVEL POR GRAMA (NMP/g).....	61
9.10 ÍNDICE DE AVES CONTAMINADAS COM <i>Salmonella enterica</i> Heidelberg.....	62
9.11 DESEMPENHO ZOOTÉCNICO.....	63
9.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	63
10 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	63
10.1 CONTAGEM BACTERIANA NO CECO.....	64
10.2 ÍNDICE DE AVES CONTAMINADAS COM <i>Salmonella enterica</i> Heidelberg.....	66
10.3 DESEMPENHO ZOOTÉCNICO DAS AVES.....	68
11 CONCLUSÃO.....	70
REFERÊNCIAS.....	71

1 INTRODUÇÃO

A busca por alimentos seguros é fator decisivo para a compra de um produto cárneo por parte dos consumidores, que esperam que haja ausência de patógenos e que o produto esteja em níveis seguros do ponto de vista microbiológico para o seu consumo, de acordo com a legislação vigente.

Na indústria de alimentos, *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. e *Escherichia coli* representam as maiores ameaças como causas potenciais de doenças de origem alimentar no ser humano (KEMP et al., 2001).

A *Salmonella* destaca-se com grande importância na saúde pública, pela sua ampla e variada ocorrência no homem e em animais como aves, répteis e mamíferos. Nesse contexto, as aves ocupam o ponto importante na epidemiologia das salmoneloses entéricas, sendo reservatórios de grande relevância sanitária e de difícil controle (BORSOI et al., 2010).

No Brasil, de 2000 a 2014, houve mais de 9.700 surtos de doenças transmitidas por alimentos, e *Salmonella* spp. estava presente em 38,2 % dos surtos em que foi possível identificar o agente etiológico (BRASIL, 2014). A ingestão de alimentos e água contendo células viáveis da bactéria é a via mais comum de infecção do hospedeiro (OMWANDHO; KUBOTA, 2010).

Salmonella enterica subespécie *enterica* (S.) são transmissíveis dos animais para os seres humanos (VAILLANT et al., 2005), e muitos sorovares, incluindo o Heidelberg, são responsáveis por doenças ligadas à alimentação que causam gastroenterite localizada, com o aumento das taxas de resistência a vários agentes antimicrobianos (ZHAO et al., 2008).

Atualmente, na avicultura nacional, *Salmonella enterica* Heidelberg tem sido encontrada em frangos de corte e na linha de produção de abate. De acordo com Salles et al. (2002), a produção de alimentos isentos de bactérias patogênicas é uma tarefa difícil de ser realizada na prática, mesmo com a aplicação das Boas Práticas de Fabricação (BPF) e dos Procedimentos Padrão de Higiene Operacional (PPHO) nas indústrias de alimentos, que são processos fundamentais para a garantia da qualidade e para programas como o Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC).

Como monitoramento de estabelecimentos produtores de frangos de corte, realiza-se o disposto no Ofício Circular nº 01 de 15 de Janeiro de 2009, do Ministério

da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), utilizando-se *pool* de dois *swabs* de arrasto por galpão, ou *pool* de cem amostras de fezes frescas. Quando o resultado for conhecido como positivo, deve ser informado no boletim sanitário que acompanha o lote para o abate (BRASIL, 2009).

Para que se minimize a presença de *Salmonella* sp. na linha de abate de frangos de corte, através de lotes positivos ou suspeitos, são necessários esforços em nível de campo, ou seja, lançar mão de ferramentas como ácidos orgânicos e probióticos que auxiliem na redução da contaminação do trato gastrointestinal da ave.

O aumento da pressão pelos consumidores e agências reguladoras para redução, ou até mesmo a eliminação do uso de antibióticos na alimentação de animais de produção, têm criado a necessidade de encontrar alternativas para a manutenção da saúde dos animais de produção (WOLFENDEN, et al., 2007).

Para auxiliar na prevenção e minimizar as infecções por bactérias patogênicas, ácidos orgânicos podem ser adicionados na dieta das aves, pois estes alteram o potencial Hidrogeniônico (pH), passando a ter uma ação antibacteriana, particularmente contra bactérias gram-negativas (OSTERMANN et al., 2005).

A utilização de algumas bactérias ácido-láticas como probióticos têm sido propostas para o uso em frangos de corte. Estas bactérias probióticas demonstraram prevenir doenças entéricas, bem como, melhorias na saúde dos frangos de corte (TELLEZ et al., 2006).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi reduzir a colonização de *Salmonella enterica* Heidelberg em frangos de corte, por meio da administração de ácidos orgânicos e probiótico comerciais.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- Obter informações sobre o coeficiente de prevalência da cepa de *Salmonella enterica* Heidelberg inoculada em pintos de corte no 2º dia de vida;
- Avaliar quantitativamente a presença de *S. enterica* Heidelberg no ceco de frangos de corte, após uso de ácidos orgânicos e probiótico;
- Avaliar qualitativamente (presença ou ausência) *S. entérica* Heidelberg em frangos de corte após o uso de ácidos orgânicos e probiótico;
- Avaliar qualitativamente (presença ou ausência) *S. enterica* Heidelberg na cama de frango após o uso de ácidos orgânicos e probiótico;
- Apontar o melhor tratamento para redução da colonização de *S. enterica* Heidelberg em frangos de corte, utilizando-se ácidos orgânicos e probiótico;
- Avaliar o desempenho zootécnico após o uso de ácidos orgânicos e probiótico.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 MERCADO BRASILEIRO DE CARNE DE FRANGO

O sucesso da produção avícola brasileira é resultante da combinação entre alta tecnologia de ambiência, genética e alimentação à base de milho e soja, em um sistema integrado entre produtores e frigorífico (ABPA, 2015).

Devido à alta qualidade de seus produtos e à grande variedade de cortes e industrializados, o Brasil vem despontando no mercado avícola mundial, mostrando-se dinâmico, competitivo e disposto a adequar os processos produtivos às exigências deste segmento. Neste âmbito, os frangos de corte representam um importante segmento dentro da avicultura brasileira (SANTOS FILHO et al., 2011).

Fatores como a percepção da segurança quanto à origem, qualidade, sanidade e preço contribuíram para aumentar a produtividade no setor e conquistar tanto o mercado interno quanto o externo (BRASIL, 2014).

De acordo com a Associação Brasileira de Proteína Animal - ABPA (2015), em 2014, o Brasil produziu 12.691 milhões de toneladas de carne de frango. Neste mesmo ano, o consumo *per capita*, foi de 42,78 kg/hab. Esse volume produzido

colocou o país novamente, como terceiro colocado na produção mundial de carne de frango, ficando atrás dos Estados Unidos da América (EUA), e da República Popular da China (RPC), os quais abateram respectivamente 17.254 e 13.000 milhões de toneladas de carne de frango (ABPA, 2015).

Para que o país tivesse um acréscimo de 61,8 % na produção de carne de frango, passando de 7.843 milhões de toneladas em 2003 para 12.691 milhões de toneladas em 2014 (ABEF 2003; ABPA, 2015), foram necessárias melhorias constantes na produção das aves no que se refere à qualidade.

No que tange à exportação, o Brasil manteve a posição de maior exportador mundial de carne de frango em 2014, com um volume exportado de 4.099 milhões de toneladas, estando à frente dos EUA e União Europeia (UE), com volumes de 3.297, e 1.100 milhões de toneladas, respectivamente. Os principais destinos do produto brasileiro são Oriente Médio, Ásia, África e UE (ABPA, 2015).

3.2 O FRANGO DE CORTE NO SUL DO BRASIL

A instalação da avicultura na Região Sul do Brasil foi estratégica, pois a cadeia de frango nesta região tornou-se viável com a existência de alguns fatores, como a cultura de soja e milho essenciais para a produção de ração, e estrutura agrária formada por pequenos produtores, o que facilitou a integração vertical por empresas líderes no mercado (SILVA, 2005).

Os estados do sul do Brasil contribuem com 63,46 % da produção brasileira de carne de frango. O estado do Paraná contribui com 32,26 % da produção, estando à frente de Santa Catarina com 16,96 %, e o estado do Rio Grande do Sul com 14,24 % (ABPA, 2015). Destes estados, em 2014, o Paraná foi responsável pela exportação de 1.287 milhões de toneladas de carne, Santa Catarina 979 milhões de toneladas, e o Rio Grande do Sul 733 milhões de toneladas, representando um total de 2.999 milhões de toneladas de carne exportadas (SINDIAVIPAR, 2015).

O volume exportado por estes três estados pode ser verificado na Figura 1, bem como a representatividade das exportações frente aos demais estados.

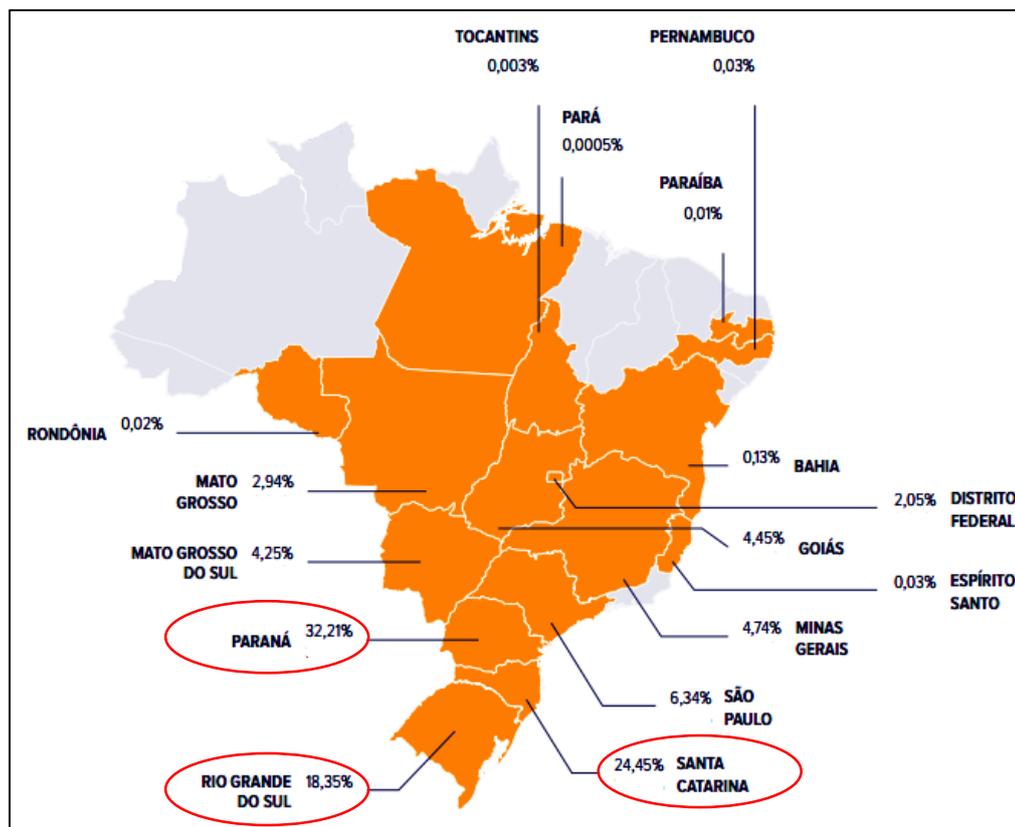


Figura 1: Volume de exportações de carne de frango (%) por estado em 2014
 Fonte: ABPA (2015)

3.3 MICROBIOTA DO TRATO GATROINTESTINAL DAS AVES

A microbiota intestinal das aves é composta de inúmeras espécies de bactérias, formando um sistema complexo e dinâmico responsável por influenciar fatores microbiológicos, imunológicos, fisiológicos e bioquímicos no hospedeiro (TANNOK, 1998). Ela tem importantes funções no trato gastrointestinal (TGI), tais como a criação de um ambiente ácido e com baixos teores de oxigênio, dificultando a sobrevivência de outras bactérias, e de impedir a aderência de bactérias patogênicas formando uma estrutura filamentosa ao longo do intestino (MACARI, 2001).

A adesão é essencial para a patogenicidade da bactéria, sendo este evento mediado por adesinas. Estas estruturas reconhecem receptores presentes nas células do hospedeiro, pelos quais possuem tropismo. Ainda, as adesinas possuem capacidade de ativar linfócitos B e neutrófilos, que resulta em uma variedade de respostas biológicas incluindo proliferação celular e secreção de citocinas (EDWARDS; PUENTE, 1998).

No papo existe a predominância de *Lactobacillus* sp., que produzindo ácido láctico e acético impedem o crescimento de outras bactérias (AMIT-ROMATH et al., 2004). A Figura 2, demonstra os diferentes níveis de pH ao longo do TGI das aves.

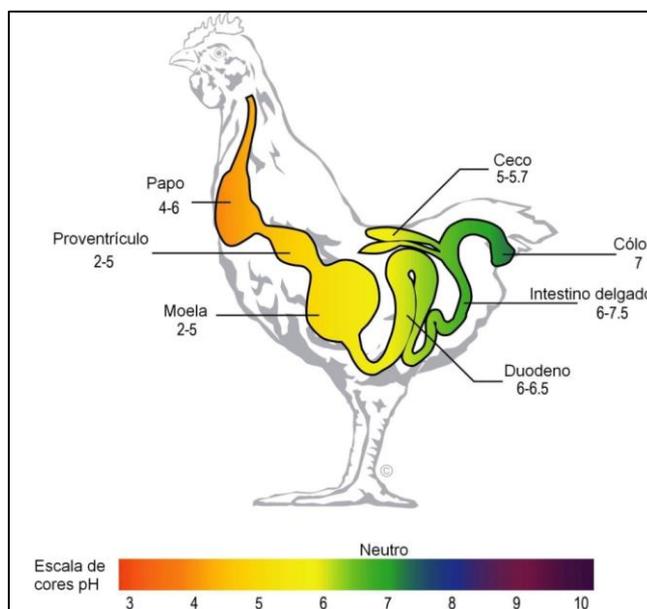


Figura 2: Níveis de pH ao longo do TGI das aves.
Fonte: Adaptado de BRI (2015).

Durante o processo produtivo, as aves passam por diversas etapas da criação até chegarem à fase final, mas os cuidados não podem ser finalizados quando chegam ao peso de abate. A preocupação deve estender-se para as próximas etapas como: jejum pré-abate; apanha; carregamento e transporte; recepção e tempo de espera; descarregamento e pendura. Segundo Mendes (2001), o jejum pré-abate pode determinar um aumento na quantidade de bactérias patogênicas no papo das aves.

O jejum pré-abate é uma etapa do processo de produção em que a ave fica sob restrição de alimentação e água, para que ocorra o esvaziamento do TGI (NORTHCUTT et al., 2003). Com um aumento na duração do jejum e maior permanência das aves no aviário, pode ocorrer uma incidência ainda maior de *Salmonella* sp. no papo das aves. Além do papo das aves, com a retirada da alimentação, para realizar o jejum pré-abate, há um aumento nas populações de *Salmonella* sp. no ceco de frangos de corte (HUMPHREY et al., 1993; RAMIREZ et al., 1997).

O transporte de animais vivos tem implicações importantes tanto econômicas quanto relacionadas ao bem estar das aves (GRANDIN, 1993).

3.4 CARACTERÍSTICAS GERAIS DO GÊNERO *Salmonella*

O Gênero *Salmonella* pertence à Família Enterobacteriaceae e compreende bacilos gram-negativos não produtores de esporos. São anaeróbios facultativos, produzem gás a partir de glicose (exceto *S. enterica* Typhimurium) e são capazes de utilizar o citrato como única fonte de carbono (FORTUNA e FRANCO, 2005).

Esse gênero é composto por duas espécies, *Salmonella enterica*, comumente isolada do homem e de animais de sangue quente e *Salmonella bongori*, usualmente isolada de animais de sangue frio (GUIBOURDENCHE et al., 2010; ANDREATTI FILHO; OKAMOTO, 2013).

Salmonella enterica possui seis subespécies expressas por nomes e algarismos romanos, as quais apresentam diferenças bioquímicas e genômicas entre si: *S. enterica* subespécie *enterica* (I), *S. enterica* subespécie *salamae* (II); *S. enterica* subespécie *arizonae* (IIIa), *S. enterica* subespécie *diarizonae* (IIIb), *S. enterica* subespécie *houtanae* (IV), e *S. enterica* subespécie *indica* (VI), enquanto que *S. bongori* apresenta apenas a subespécie *bongori* (V) (GUIBOURDENCHE et al., 2010).

Segundo Brenner (2000), dentro da espécie *S. enterica* subgrupo I, estão os sorogrupos mais comuns, A, B, C1, C2, D e E, sendo que as cepas deste grupo causam aproximadamente 99 % de infecções em humanos e animais de sangue quente.

Para a distinção dos sorovares, são utilizados antissoros que reagem com antígenos presentes na célula bacteriana. Existem três tipos de antígenos diferentes que podem identificar os sorovares de *Salmonella* sp.: antígeno somático (O), antígeno flagelar (H) e o antígeno capsular de virulência (Vi) (FRANCO; LANDGRAF, 1996).

O paratifo aviário ou infecções paratifoïdes são termos usados para definir a infecção por determinados sorovares não adaptados às aves, aos quais, até por não possuírem preferência por um hospedeiro em especial, podem causar toxinfecções alimentares em humanos. Com exceção de *S. pullorum*, *S. gallinarum* e de *Salmonella enterica* subespécie *arizonae*, qualquer outra salmonela poderá estar envolvida na etiologia do paratifo aviário (BERCHIERI JÚNIOR; FREITAS NETO, 2009).

3.4.1 *Salmonella enterica* Heidelberg

No Brasil, desde 1962, a *Salmonella enterica* Heidelberg tem sido detectada em aves e produtos derivados (HOFER; SILVA FILHO; REIS, 1997). Alguns sorovares mais comumente encontrados em aves são: *S. enterica* Enteritidis, *S. enterica* Typhimurium, *S. enterica* Derby, *S. enterica* Heidelberg, *S. enterica* Senftenberg, *S. enterica* Agona e *S. enterica* Mbandaka. A *S. enterica* Enteritidis e *S. enterica* Typhimurium estão entre as mais prevalentes em galinhas e tem grande importância para a saúde pública (BACK, 2010).

A *S. enterica* Heidelberg alterna com a *S. enterica* Enteritidis a prevalência de segundo ou terceiro sorovar isolados em humanos no Canadá, sendo um importante agente sob vista da saúde pública (DEMEZUK et al., 2003). Neste país, foram detectados 21 diferentes sorotipos entre os 82 casos endêmicos ocorridos, para o qual o sorotipo foi conhecido. De um total de 82 casos, 53 (64 % dos sorotipos) eram compostos por três principais sorotipos, *S. enterica* Enteritidis, *S. enterica* Heidelberg e *S. enterica* Typhimurium (PHAC, 2009).

Nos EUA a *Salmonella enterica* Heidelberg é o quarto sorovar mais isolado em casos de salmonelose em humanos (CHITTICK et al., 2006).

S. enterica Heidelberg isoladas de amostras coletadas em abatedouros de frangos de corte possuem a capacidade de serem hidrofóbicas e de formarem biofilme em superfície, o que pode induzir a uma permanência desses microrganismos no ambiente de processamento na indústria e, conseqüentemente, uma maior chance de transmissão aos alimentos, com riscos ao consumidor (RODRIGUES et.al., 2009).

Segundo Souza (2015) *S. enterica* Heidelberg é atualmente o sorotipo de maior prevalência nas análises oficiais de controle realizadas no sul do Brasil, região onde estão concentrados os maiores plantéis avícolas no país. A prevalência deste sorotipo foi de 20 a 33 % do total de amostras positivas de *Salmonella* spp. entre 2012 a 2014.

3.5 MICRORGANISMOS NA PLANTA DE ABATE DE FRANGOS DE CORTE

Os microrganismos mais comumente encontrados em carcaças de frangos são: *Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria*

monocytogenes, *Yersinia enterocolitica*, *Aeromonas hydrophila* e *Clostridium perfringens*. Esses microrganismos causam redução na vida útil, pois deterioram a carcaça e podem ser nocivos à saúde pública, já que podem causar intoxicações alimentares (LEITÃO, 2001).

O processo higiênico-sanitário de abate de frangos foi avaliado por Dickel (2004) em três matadouros na região Sul do Brasil. O autor relatou que carcaças pré e pós *chiller* apresentaram, respectivamente, 31,7 % e 20 % de positividade, sendo identificados os sorovares Heidelberg (63,9 %), Enteritidis (31,9 %), Worthington (2,1 %) e Tennessee (2,1 %).

Na indústria alimentícia, as toxinfecções alimentares são muito preocupantes e a salmonelose é considerada uma das mais frequentes. Em aves, essas infecções são responsáveis por uma variedade de doenças agudas e crônicas (CARDOSO; TESSARI, 2008).

A maior frequência de *Salmonella* spp. na linha de abate de frangos de corte foi relatada após o chuveiro de lavagem das carcaças, localizado entre a evisceração e o pré-resfriamento, e menor contaminação na saída do pré-resfriamento, demonstrando a importância do monitoramento de diferentes pontos críticos de controle eventualmente identificados (VON RUCKERT et al., 2009).

De acordo com Colla et al. (2012), a bactéria do Gênero *Salmonella* foi isolada em frangos de corte após a saída da depenadeira, e na água do *chiller*, indicando que embora não tenha sido realizado o isolamento em outros pontos da linha de abate, a bactéria estava presente e poderia ocorrer contaminação cruzada com carcaças prontas para o consumo, podendo assim, gerar reflexos na saúde pública. Dentre as salmonelas que causam infecções em humanos, a *S. enterica* Heidelberg parece ser mais invasiva e causar doenças com maior gravidade que outros sorovares paratíficos (PHAC, 2007).

3.6 ÁCIDOS ORGÂNICOS

Os ácidos orgânicos são constituintes naturais de plantas e animais. Alguns podem ser formados através da fermentação microbiana no intestino e outros nas rotas metabólicas intermediárias (LEHNINGER et al. 1993).

Como grupo químico, os ácidos orgânicos são considerados como sendo qualquer substância de estrutura geral (R-COOH), gerando grupos de compostos

relacionados, conhecidos como derivados dos ácidos carboxílicos, como os aminoácidos, ácidos graxos, coenzimas e metabolitos intermediários (SOLOMONS; FRYHLE, 2002). Ácidos com 4 carbonos ou menos (acético, butírico, fórmico e propiônico) são líquidos em temperatura ambiente e miscíveis em água (CHERRINGTON et al., 1991).

O principal mecanismo de ação dos ácidos refere-se à teoria dos ácidos fracos, exercendo atividade antimicrobiana devido a redução do pH no interior da célula microbiana (CHERRINGTON et al., 1991).

A teoria dos ácidos fracos foi discutida por Stratford et al. (2009), que em seus estudos demonstram que nem todos os ácidos necessitam reduzir o pH no citoplasma para exercer sua atividade antimicrobiana. Ao utilizar o ácido sórbico, observa-se que concentrações inibitórias deste ácido não reduzem o pH citoplasmático e acredita-se que a membrana citoplasmática seja o primeiro sítio de ação deste ácido. A lesão da membrana, a perda da sua integridade e o aumento a permeabilidade a prótons, levam a morte do microrganismo.

Os ácidos orgânicos possuem um efeito antibacteriano específico semelhante ao dos antimicrobianos, sendo particularmente efetivos contra *Salmonella* sp., *Escherichia coli* e *Campylobacter* sp. (DIBNER; BUTTIN, 2002; RICKE, 2003).

A utilização de um tratamento com uma combinação de mistura ácidos orgânicos com óleos essenciais, reduziram populações de células de *Salmonella enterica* Enteritidis em amostras cloacais de aves infectadas quando comparado com um grupo controle, podendo ser importante como um programa de controle de salmoneloses (BORSOI et al., 2011).

A eficácia de uma mistura de ácidos orgânicos (5,7 % de ácido láctico e 0,7 % de ácido acético) contra *Salmonella* e *Campylobacter* foi avaliada *in vitro*, e mostrou que estes ácidos são eficientes em eliminar estas bactérias. Porém quando testados na dieta de frangos, os autores observaram que o produto foi mais eficiente em eliminar *Campylobacter* sp. do que *Salmonella* sp. (HERES et al., 2004).

Testes realizados para resistência a antimicrobianos revelaram que todas as cepas de *Salmonella enterica* Heidelberg apresentaram multirresistência. Este sorotipo apresentou maiores percentuais de resistência à ceftriaxona e de ceftiofur, usados para o tratamento de salmonelose humana (MEDEIROS, 2011).

De acordo com Vattay et al. (1988), observou-se que a presença de ácidos orgânicos no intestino pode aumentar a produção de muco, seja pela estimulação

dos receptores químicos conectados aos nervos colinérgicos ou por efeito direto nas células caliciformes.

Nava et al. (2009), utilizando técnicas de biologia molecular (Reação em Cadeia da Polimerase - PCR) indicaram que o uso de ácidos orgânicos na água de frangos por 22 dias consecutivos afetam a população microbiana no íleo.

O tratamento da água de bebida com uma mistura de ácidos orgânicos (ácido fórmico, ácido propiônico e ácido butanóico) também promoveu redução na transmissão horizontal de *Salmonella* sp. em um experimento onde foram misturados animais infectados e não infectados com *Salmonella* sp. e observou-se uma redução na quantidade de *Salmonella* sp. presente no swab de arrasto, no papo e no ceco dos frangos de corte infectados aos 49 dias de idade (HOFACRE; MATHIS, 2007).

A utilização de uma combinação de ácido fórmico com ácido propiônico que resultando em 2 % de inclusão na dieta de pintos de postura com 1 dia, reduziu a colonização de *Salmonella enterica* Pullorum no papo e cecos, bem como a excreção dessa bactéria, havendo também redução da mortalidade após 3 semanas de tratamento em aves experimentalmente desafiadas no terceiro dia com 10^4 UFC/mL/ave de *S. enterica* Pullorum (AL-TARAZI; ALSHWABKEH, 2003).

Em frangos positivos para *Salmonella enterica* Heidelberg tratados com componentes não farmacêuticos, dentre eles, ácidos orgânicos, houve redução significativa da porcentagem de culturas positivas no papo, quando comparado a frangos de um grupo controle (ALALI et al., 2013).

3.7 PROBIÓTICOS

Probiótico foi definido inicialmente, como substâncias produzidas por microrganismos que estimulam um ao outro (LILLY; STILLWELL, 1965). Posteriormente o termo foi usado para definir suplementos para animais que produzem efeitos benéficos sobre o animal hospedeiro (PARKER, 1974).

Probióticos são definidos como suplementos alimentares compostos de microrganismos vivos que atuam no animal hospedeiro otimizando seu balanço intestinal microbiano (FULLER, 1989). De acordo com a definição adotada pela FAO (2001), probióticos são microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas podem conferir um benefício à saúde do hospedeiro.

Mais precisamente, os probióticos são microrganismos vivos não patogênicos e não tóxicos na natureza, a qual, quando administrada por via digestiva são favoráveis para a saúde do hospedeiro (GUILLOT, 1998). Esses são reconhecidos como cepas específicas de culturas de microrganismos vivos que produzem benefícios ao organismo hospedeiro, sendo isoladas do intestino de animais adultos saudáveis, geralmente da mesma espécie à qual será administrado (O'DEA et al., 2006).

Os probióticos estão sendo utilizados para melhorar a saúde de aves e, subsequentemente, resultam em melhor produção (PANDA et al., 2003). De acordo com Gabriel et al. (2006), *Lactobacillus* sp., assim como *Streptococcus* sp. e alguns coliformes, podem ser encontrados no intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo) onde o pH está mais próximo da neutralidade.

As espécies mais utilizadas no preparo de probióticos são: *Lactobacillus bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. lactis*, *L. salivarius*, *L. plantarium*, *L. reuteri*, *L. johnsii*, *Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus faecium*, *E. faecalis*, *Bifidobacterium* spp., *Bacillus subtilis* e *B. toyoi* (RAMOS, 2009).

De acordo com Ferreira et al. (2010), os probióticos possuem efeitos diretos na mucosa intestinal, como inibição da multiplicação de patógenos microbianos, crescente aumento das junções epiteliais e modificação da permeabilidade intestinal, modulação da resposta imune e das células imunes da mucosa intestinal, secreção de produtos antimicrobianos e decomposição dos antígenos luminiais patogênicos.

Uma ocorrência crucial no desenvolvimento dos probióticos foi a descoberta de que pintos de corte recém-nascidos poderiam ser protegidos contra a colonização por *Salmonella enterica* Enteritidis dosando-se uma suspensão de conteúdos intestinais derivados de frangos adultos saudáveis, chamado de exclusão competitiva (NURMI; RANTALA, 1973).

Probióticos em frango de corte mantém a microflora intestinal pela exclusão competitiva e antagonismo (FULLER, 1989; KABIR et al., 2005; KIZERWETTER; BINEK, 2009), alterando o metabolismo, aumentando a atividade da enzima digestiva e diminuindo a atividade da enzima bacteriana e produção de amoníaco (COLE et al., 1987; YOON et al., 2004).

Exclusão competitiva é uma medida para proteger os pintos de corte recém-nascidos, perus, codornas e faisões e possivelmente, outras aves de caça, também, contra salmonelas e outros agentes enteropatogênicos (SCHNEITZ, 2005).

A inoculação de uma microflora adulta em pintos de um dia, demonstraram com sucesso a exclusão competitiva em sua microbiota intestinal, com melhorias na função intestinal e resistência a doenças (NISBET et al., 1998; STERN et al., 2001).

Os probióticos agem através da competição por locais de adesão ao epitélio intestinal, impedindo a adesão das colônias de bactérias patogênicas (CHICHLOWSKI et al., 2007; CHOUDHARI et al., 2008).

Outro efeito benéfico observado pelo do uso de probióticos é conseguido através da redução do pH, pela produção de ácidos graxos voláteis, que inibem o crescimento de bactérias nocivas (CHICHLOWSKI et al., 2007; CHOUDHARI et al., 2008).

Bactérias ácido lácticas são bem conhecidas por colonizarem a parede cecal no intestino do frango de corte, apresentando efeito de exclusão competitiva. (FULLER, 1989; YORUK et al., 2004).

Um dos maiores desafios na avicultura industrial mundial nos últimos anos são as doenças entéricas, por levarem os plantéis avícolas à perda de produtividade, ao aumento de mortalidade e à contaminação de produtos de origem avícola para o consumo humano. Frequentemente produtos avícolas têm sido relacionados com toxinfecções alimentares em humanos e em vários países, sugerindo que produtos elaborados com carne de aves portadoras de bactérias possam ser fontes de infecção (SANTOS; TURNES, 2005).

3.8 MÉTODOS DE DETECÇÃO DE *Salmonella* sp.

Resultados laboratoriais de pesquisa de *Salmonella* sp. respondem a questões definidas (como a presença ou ausência de um determinado sorovar de *Salmonella* sp. em um tipo particular da amostra).

A metodologia convencional de pesquisa de *Salmonella* sp. fundamenta-se de forma geral em cinco etapas: pré enriquecimento; enriquecimento seletivo; semeadura em meios sólidos seletivos; testes bioquímicos; sorotipagem para caracterização antigênica (ISO, 2007; BRASIL, 1995).

Apesar de ser um método mais moroso e trabalhoso, o método convencional para detectar a presença de *Salmonella* spp. é amplamente utilizado, sendo este, o método oficial recomendado pela Legislação Brasileira (GIOMBELLI; SILVA, 2002).

As ferramentas moleculares de diagnóstico, baseadas na análise de DNA, possuem atualmente grande importância no estudo epidemiológico de *Salmonella* spp.

O sistema de detecção de patógenos BAX System[®] é um método de triagem utilizado para alimentos e amostras ambientais. Este sistema utiliza a tecnologia da PCR a qual cria milhões de cópias do fragmento de ácido desoxirribonucléico (DNA) alvo, caso esteja presente. Em seguida é possível obter resultados “positivo ou negativo”, diretamente do sistema (BAX System[®], DuPont Qualicon, 2003).

O BAX System[®] detecta 100 % de sorotipos de salmonela em todos os alimentos, incluindo carne bovina, frango, frutas e produtos vegetais, produtos lácteos, chocolates e produtos de panificadora, ração animal e massa após pré-enriquecimento. A realização das análises requer quatro passos: enriquecimento da amostra, extração de DNA, amplificação de DNA e leitura de resultados (BAX System[®], DuPont Qualicon, 2003).

Além das metodologias qualitativas, há a possibilidade da aplicação das metodologias quantitativas. As análises quantitativas geram uma informação mais precisa, pois o nível de contaminação do alimento, assim como o sorovar relacionado, estará diretamente relacionado ao risco de ocorrência da doença (SANCHEZ-VARGAS et al., 2011)

O método de número mais provável (NMP) produz resultados estimados da população bacteriana com base em probabilidade estatística, assumindo-se que o número verdadeiro de organismos presentes em uma amostra está entre os limites que se supõe ser 95 %. Deste modo, a tabulação de NMP representa uma faixa estimada e não os valores absolutos (PEELER; MACCLURE, 1992).

REFERÊNCIAS

Al-TARAZI, Y. H.; ALSHAWABKEH, K. Effect of Dietary Formic and Propionic Acids on *Salmonella* Pullorum Shedding and Mortality in Layer Chicks after Experimental Infection. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 50, n. 3, p. 112-117, 2003.

ALALI, W.Q.; HOFACRE, C.L.; MATHIS, G.F.; FALTYS, G.; RICKE, S.C.; DOYLE, M.P. Effect of non-pharmaceutical compounds on shedding and colonization of *Salmonella enterica* serovar Heidelberg in broilers. **Food Control**, v.31, p.125-128, 2013.

AMIT-ROMACH, E.; SKLAN, D.; UNI, Z. Microflora ecology of the chicken intestine using 16S ribosomal DNA primers. **Poultry Science**, v. 83, p.1093–1098, 2004.

ANDREATTI FILHO, R.L.; OKAMOTO, A.S. *Salmonella* e saúde intestinal. In: CONFERÊNCIA FACTA-PRÊMIO LAMAS, 10 a 12 de junho de 2013. Campinas. **Anais...** Campinas: FACTA, 2013. p.393-424. 1 CD-ROM.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS PRODUTORES E EXPORTADORES DE FRANGO (ABEF). **Relatório Anual 2003**. Disponível em: < <http://abpa-br.com.br/files/publicacoes/7a2e75e6e722893b704b577ef66e8d37.pdf>>. Acesso em 9 de agosto de 2015.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL (ABPA). **Relatório Anual 2015**. Disponível em < http://abpa-br.com.br/files/RelatorioAnual_UBABEF_2015_DIGITAL.pdf>. Acesso em 9 de agosto de 2015.

BACK, A. **Manual de doenças de aves**. 2.ed. Cascavel-PR: Editora Integração, 2010. 311p.

BAX System® PCR assay with automated detection for bacterial screening. Manual do usuário. Wilmington, DE.: DuPont Qualicon, 2003.

BERCHIERI JÚNIOR, A.; FREITAS NETO, O.C. Salmoneloses. In: BERCHIERI JÚNIOR, A.; SILVA, E.N; DI FÁBIO, J.; SESTI, L.; ZUANAZE, M.A.F. (Eds.). **Doenças das aves**, 2.ed. Campinas: FACTA, p.435-454, 2009.

Bio Resource International (BRI), 2015. Disponível em: <http://briworldwide.com/wp-content/uploads/2015/02/ChickenEnzymeArt_Complete.jpg>. Acesso em 10 de julho de 2015.

BORSOI, A.; MORAES, H. L. S.; SALLE, C. T. P.; NASCIMENTO, V. P. Número mais provável de *Salmonella* isoladas de carcaças de frango resfriadas. **Ciência Rural**, v.40, n.11, p. 2338-2342, 2010.

BORSOI, A.; SANTIN, E.; SANTOS, L. R.; SALLE, C. T.; MORAES, H. L.; NASCIMENTO, V. P. *Salmonella* fecal excretion control in broiler chickens by organic acids and essential oils blend feed added. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v.13, n.1, p.65-69, 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA): **Aves**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/aves>>. Acesso em 9 de agosto de 2015.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Secretaria de Defesa Agropecuária. **Ofício Circular Conjunto DAS/DIPOA nº 1, de 15 de janeiro de 2009**. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/servlet/VisualizarAnexo?id=6078>. Acesso em 10 de agosto de 2014.

BRASIL. Portaria Ministerial nº 126 de 03 de novembro de 1995. Normas de credenciamento e monitoramento de laboratórios de diagnóstico das salmonelas aviárias. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 06 nov. 1995. Seção I, p.17694-17698, 1995.

BRASIL. **Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN net)**. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica, Coordenação Geral de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Brasília, 2014.

BRENNER, F. W.; VILLAR, R. G.; ANGULO, F. J.; TAUXE, R.; SWAMINATHAN, B. *Salmonella* Nomenclature. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 7, p. 2465-2467, 2000.

CARDOSO, A. L. S. P.; TESSARI, E. N. C. **Salmonela na Segurança dos Alimentos e na Avicultura**. Centro Avançado de Pesquisa Tecnológica do Agronegócio Avícola. São Paulo, SP. Número 80. 27/08/2008. Disponível em: http://www.biologico.sp.gov.br/artigos_ok.php?id_artigo=80. Acesso em 13 de junho de 2015.

CHERRINGTON, C.A.; HINTON, M.; CHOPRA, I. Organic acids: Chemistry, antibacterial activity and practical applications. **Advances in Microbial Physiology**, San Diego, v.32, p.87-108, 1991.

CHICHLOWSKI, M., et al. Metabolic and physiological impact of probiotics or direct-fed microbials on poultry: A brief review of current knowledge. **International Journal of Poultry Science**, v. 6, p. 694-704, 2007.

CHITTICK, P. et al. Summary of National Reports of foodborne outbreaks of *Salmonella* Heidelberg infections in the United States: clues for disease prevention. **Journal of Food Protection**, v. 69, n. 5, p. 1150-1153, 2006.

CHOUDHARI, A., SHINDE, S.; RAMTEKE, B.N. Prebiotics and probiotics as health promoter. **Veterinary World**, v. 1, p. 59-61, 2008.

COLE, C.B.; FULLER, R.; NEWPORT, M.J. The effect of diluted yoghurt on the gut microbiology and growth of piglets. **Food Microbiology**, v. 4, p.83-85, 1987.

COLLA, F.L.; RODRIGUES, L.B.; BORSOI, A.; DICKEL, E.L.; NASCIMENTO, V.P. DO; SANTOS, L.R. DOS. Isolamento de *Salmonella* Heidelberg em diferentes pontos da tecnologia de abate de frangos de corte. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 79, n. 4, p.603-606, 2012.

DEMEZUK, W.; SOULE, G.; CLARK, C. Phase based typing scheme for *Salmonella enterica* serovar Heidelberg, a causative agent of food poisonings in Canada. **Journal of Clinical Microbiology**, p.4279-4284, 2003.

DIBNER, J.J.; BUTTIN, P. Use of organic acids as a model to study the impact of gut microflora on nutrition and metabolism. **Journal of Applied Poultry Research**, v.11, p.453-463, 2002.

DICKEL, E.L. **Utilização da técnica microbiológica convencional, reação em cadeia pela polimerase (PCR) e ensaio imunoenzimático (ELISA) no monitoramento de *Salmonella* em carcaças de frango para o controle higiênico sanitário do processo de abate.** 2004 137f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

EDWARDS, R.A.; PUENTE, J.L. Fimbrial expression in enteric bacteria: a critical step in intestinal pathogenesis. **Trends Microbiology**, v. 6, n. 7, p. 282-287, 1998.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATIONS (FAO);
WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. **Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria**. Córdoba: FAO, 2001. 34 p. Disponível em:
<ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/probio_report_en.pdf>. Acesso em 12 de agosto de 2014.

FERREIRA, A. A.; NATALI, M. R.; DELANI, T. C. O.; MARTINS, R. M.; PRESTES, T. S. Papel do sistema imune e atuação dos probióticos na doença de Crohn. **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**, Umuarama, v. 14, n. 2, p. 171-177, 2010.

FORTUNA J.L.; FRANCO R.B. Pequeno dossiê epidemiológico da *Salmonella*, como causadora de infecções alimentares. **Revista Higiene Alimentar**, v. 128, p. 33-43, 2005.

FRANCO, B. D. G. M; LANDGRAF. M. T. D. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo, ed. Atheneu, p. 27-171, 1996.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 66, p. 365–378, 1989.

GABRIEL, I; LESSIRE, M; MALLET, S; GUILLOT, JF. Microflora of the digestive tract: critical factors and consequences for poultry. **World's Poultry Science Journal**, v.62, p.499-511, 2006.

GIOMBELLI, A.; SILVA, N. L. Avaliação do método tradicional para detecção de *Salmonella* spp. em carnes in natura. **Revista Higiene Alimentar**, v. 16, n. 95, p. 88-91. 2002.

GRANDIN, T. Introduction: management and economic factors of handling and transport. In *Livestock Handling and Transport*. Ed T. Grandin. Wallingford, **CAB International**, p. 1-9, 1993.

GUIBOURDENCHE, M.; ROGGENTIN, P.; MIKOLEIT, M.; FIELDS, P. I.; BOCKEMUHL, J.; GRIMONT, P.A.D.; WEILL, F. Supplement 2003-2007 (No. 47) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. **Research in Microbiology**, Paris, v. 161, n. 1, p. 26-29, 2010.

GUILLOT, J.F. Les probiotiques en alimentation animale. **Cahiers Agricultures**, v. 7, p.49-54, 1998.

HERES, L.; ENGEL, b.; URLINGS, H.A.P; WAGENAAR, J.A.; VAN KNAPEN, F. Effect of acidified feed on susceptibility of broiler chickens to intestinal infection by *Campylobacter* and *Salmonella*. **Veterinary Microbiology**, v. 99, p.259-267, 2004.

HOFACRE, C.L.; MATHIS, G.F.; MILLER, S.H.; LAVORGNA, M.W. Use of Bacitracin and Roxarsone to reduce *Salmonella* Heidelberg shedding following a necrotic enteritis challenge model. **Journal of Applied Poultry Research**, v.16, p.275-279, 2007.

HOFER, E.; SILVA FILHO, S. J.; REIS, E. M. F. Prevalência de sorovares de *Salmonella* isolados de aves do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Brasília, v. 17, n .2, p. 55-62, 1997.

HUMPHREY, T. J.; BASKERVILLE, A.; WHITEHEAD, A.; ROWE, B.; HHENLEY, A. Influence of feeding patterns on the artificial infection of laying hens with *Salmonella* Enteritidis phage type 4. **The Veterinary Record**, v.132, n.16, p.407-409, 1993.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO). **ISO 6579** – Annex D. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp, 2002. AMENDMENT 1: Annex D: Detection of *Salmonella* spp: in animal faeces and in environmental samples from the primary production stage, 4 th ed. 2007.

KABIR, S.M.L.; RAHMAN, M.M.; RAHMAN, M.B.; RAHMAN, M.M.; AHMED, S.U. The dynamics of probiotics on growth performance and immune response in broiler. **International Journal of Poultry Science**, v.3, n. 5, p. 361-364, 2004.

KEMP, G. K.; ALDRICH, M.L.; GUERRA, M.L.; SCHEIDER, K.R. Continuous online processing of fecal-and ingesta-contaminated poultry carcasses using an acidified sodium chlorite antimicrobial intervention. **Journal of Food Protection**, Florida - USA, v. 64, n.6, p. 807 – 812, 2001.

KIZERWETTER-SWIDA, M.; BINEK, M. Protective effect of potentially probiotic *Lactobacillus* strain on infection with pathogenic bacteria in chickens. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v. 12, p. 15-20, 2009.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.A.; COX, M.M. Principles of Biochemistry. New York. **Worth Publishers**, p.576, 1993.

LEITÃO M.F.F. Qualidade e segurança alimentar em produtos avícolas. **Anais da Conferência Apinco de Ciência e Tecnologia Avícolas**. Campinas, SP. Brasil; 1: 181-190, 2001.

LILLY, D.M.; STILLWELL, H. Probiotics: growth promoting factors produced by microorganisms. **Science**, v. 147, p. 747-748, 1965.

MACARI, M.A.; MAIORKA, A. Aspectos Fisiológicos da Qualidade Intestinal e Produtividade em Frangos de Corte. **Departamento de Morfofisiologia Animal, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias**, Campus Jaboticabal, 2001.

MEDEIROS M.A.N.; OLIVEIRA D.C.N.; RODRIGUES D.P.; FREITAS D.R.C. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* in chicken carcasses at retail in 15 Brazilian cities. **Revista Panamericana de Salud Publica**, 2011.

MENDES, A.A. jejum pré-abate em frangos de corte. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 3,n. 3, p. 199-209, 2001.

NAVA M. G.; ATTENE-RAMOS, M.S.; GASKINS, H.R.; RICHARDS, J.D. Molecular analysis of microbial community structure in the chicken ileum following organic acid supplementation. **Veterinary Microbiology**, v.137, p.345–353, 2009.

NISBET, D.J.; TELLEZ, G.I.; LOWRY, V.K.; ANDERSON, R.C.; GARCIA, G.; NAVA, G.; KOGUT, M.H.; CORRIER, D.E.; STANKER, L.H. Effect of a commercial competitive exclusion culture (Preempt) on mortality and horizontal transmission of *Salmonella* gallinarum in broiler chickens. **Avian Disease**, v. 42, p. 651-656, 1998.

NORTHCUTT, J.K.; BERRANG, M.E.; DICKENS, J.A.; FLETCHER, D.L.; COX, N.A. Effect of broiler age, feed withdrawal, and transportation on levels of coliforms, *Campylobacter*, *Escherichia coli* and *Salmonella* on carcasses before and after immersion chilling. **Poultry Science**, Champaign, v.82, n.1, p.169-173, 2003.

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

O'DEA, E.E., FASENKO, G.M., ALLISON, G.E., KORVER, D.R., TANNOCK, G.W. and GUAN, L.L. Investigating the effects of commercial probiotics on broiler chick quality and production efficiency. **Poultry Science**, v. 85, p. 1855–1863, 2006.

OMWANDHO, C. O. A.; KUBOTA, T. *Salmonella enterica* serovar Enteritidis: a Mini-review of contamination routes and limitations to effective control. **Japan Agricultural Research Quarterly**, Tokyo, v. 44, n. 1, p. 7-16, 2010.

OSTERMANN, et al. Metabolismo e bases conceituais para a ação benéfica de ácidos orgânicos para frangos de corte. In: **Ave World**: Revista do Agricultor Moderno. São Paulo: Animal World, ano 3, n.15, p.28-31, 2005.

PANDA, A.K., RAO, S.S.R., RAJU, M.V.L.N. and SHARMA, S.S. Effect of probiotic (*Lactobacillus sporogenes*) feeding on egg production and quality, yolk cholesterol and humoral immune response of White Leghorn layer breeders. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 88, p. 43-47, 2008.

PARKER, B. Probiotics, the other half of the antibiotics story. **Animal Nutrition and Health**, v. 29, p. 4-8, 1974.

PEELER, J.T.; MACCLURE, F.D. Appendix 2. Most probable number determination. In: GARTHRIGHT, W.E. **Bacteriological Analytical Manual**, AOAC International. p.439-452, 1992,

PUBLIC HEALTH AGENCY OF CANADA (PHAC). *Salmonella* - C-EnterNet 2009 Annual Report - Public Health, 2009. Disponível em: www.phac-aspc.gc.ca/c-enternet/pubs/2009/ch04-eng.php. Acesso em: 14 de julho de 2014.

PUBLIC HEALTH AGENCY OF CANADA (PHAC) *Salmonella* Heidelberg - Ceftiofur-related resistance in human and retail chicken isolates, 2007. Disponível em: <http://www.phac-aspc.gc.ca/cipars-picra/heidelberg/pdf/heidelberg_e.pdf>. Acesso em: 12 junho de 2015.

RAMIREZ, G. A.; SARLIN, L. L.; CALDWELL, D. J.; YEZAK, C. R. JR.; HUME, M. E.; CORRIER, D. E. Effect of feed withdrawal on the incidence of *Salmonella* in the crops and ceca of market age broiler chickens. **Poultry Science**, v.76 n.4, p.654-656, 1997.

RAMOS, L.S.N. **Aditivos alternativos a antibióticos em rações para frangos de corte**. 2009. 86 folhas. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Centro de Ciências Agrárias/Universidade Federal do Piauí. 2009.

RICKE S.C. Perspectives on the use of organic acids and short chain fatty acids as antimicrobial. **Poultry Science**, Champaign, v.82, p.632-639, 2003.

RODRIGUES, L.B.; SANTOS, L.R.; RIZZO, N.N.; TAGLIARI, V.Z.; OLIVEIRA, A.P.; TRENHAGO, G.; RODEGHERI, S.C.; TAGLIETI, R.M.; DICKEL, E.L.; NASCIMENTO, V.P. Avaliação da hidrofobicidade e da formação de biofilme em poliestireno por *Salmonella* Heidelberg isoladas de abatedouro avícola. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 37, n.3, p.225-230, 2009.

SALLES, M.A.F.; SILVA, P.K.S.; FONSECA, S.; REIS, V.; CARNEIRO, A.L.; BRANCO, F.R.; SILVA, P.L.; CUNHA, A.P. Pesquisa de *Salmonella* spp. através de provas de triagem rápida e convencional, em carcaças de frangos abatidos no município de Uberlândia, MG. **Revista Higiene Alimentar**, v.92, n.92, p.3640, 2002;

SANCHEZ-VARGAS, F. M., et al. *Salmonella* infections: An update on epidemiology, management, and prevention. **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 9, p.263-277, 2011.

SANTOS, G. R. J.; TURNES, G. C. Probióticos em avicultura. **Ciência Rural**, v. 35, n. 3, p. 741-747, 2005.

SANTOS FILHO, J. I.; MARTINS, F. M.; MIELE, M. Estudos sobre economia. In: Sonho, desafio e tecnologia: 35 anos de contribuições da Embrapa Suínos e Aves. Concórdia: EmbrapaSuínos e Aves, 2011.

SCHNEITZ, C. Competitive exclusion in poultry—30 years of research. **Food Control**, v. 16, p. 657-667, 2005.

SILVA, C. L.; SAES, M. S. M. **Estruturas e características da cadeia de valor a partir do tipo de governança: uma avaliação preliminar da avicultura de corte paranaense**. Informe Gepec, Toledo/ PR, 2005.

SINDIAVIAPAR - Sindicato das Indústrias de Produtos Avícolas do Estado do Paraná. Disponível em: < <http://www.sindiavipar.com.br/index.php?modulo=8>>. Acesso em 09 de agosto de 2015.

SOLOMONS, S.G.; FRYHLE, C. Química Orgânica, 7 ed. Rio de Janeiro: **LTC Livros Técnicos e Científicos**, v.1 e 2, 2002.

SOUZA, I.D.P. Heidelberg é a salmonela da vez. **O presente rural** - Avicultura, corte e postura, Paraná, p.28, fev./mar. 2015.

STERN, N.J.; COX, N.A.; BAILEY, J.S.; BERRANG, M.E.; MUSGROVE, M.T. Comparison of mucosal competitive exclusion and competitive exclusion treatment to reduce *Salmonella* and *Campylobacter* spp. colonization in broiler chickens. **Poultry Science**, v. 80, p. 156-160, 2001.

STRATFORD, M.; PLUMRIDGE, A.; NEBEVON-CARON, G.; ARCHER, D.B. Inhibition of spoilage mould conidia by acetic acid and sorbic acid involves different modes of action, requiring modification of the classical weak-acid theory. **International Journal of Food Microbiology**, v. 136, p. 37-43, 2009.

TANNOCK, O.W. Studies of the intestinal microflora: a prerequisite for the development of probiotics. **International Dairy Journal**, v.8, p.527-533, 1998.
TELLEZ, G., et al. Digestive physiology and role of microorganisms. **Journal Applied Poultry Research**, v. 15, p. 136-144, 2006.

VAILLANT, V., de VALK, H., BARON, E., ANCELLE, T., COLIN, P., DELMAS, M.C., DUFOUR, B., POUILLOT, R., LE STRAT, Y., WEINBRECK, P., JOUGLA, E., DESENCLOS, J.C. Foodborne infections in France. **Foodborne Pathogen Disease**, v. 2, p221–232, 2005.

VATTAY, P.; FEIL, W.; KLIMESCH, S.; WENZI, E.; STARLINGER, M.; SCHIESSLER, R. Acid stimulated alkaline secretion in the rabbit duodenum is passive and correlates with mucosal damage. **Gut**, v. 29, p. 284-290, 1988.

VON RUCKERT, D.A.S.; PINTO, P.S.A.; SANTOS, B.M.; MOREIRA, M.A.S.; RODRIGUES, A.C.S. Pontos críticos de controle de *Salmonella* spp. no abate de frangos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, vol.61, n.2 , p. 326-330, 2009.

WOLFENDEN, A.D. et al. Effect of organic acids and probiotics on *Salmonella* Enteritidis infection in broiler chickens, **International Journal of Poultry Science**, v. 6, p. 403-405, 2007.

YOON, C.; NA, C.S.; PARK, J.H.; HAN, S.K.; NAM, Y.M.; KWON, J.T. Effect of feeding multiple probiotics on performance and fecal noxious gas emission in broiler chicks. **Korean Journal of Poultry Science**, v. 3, p. 229-235, 2004.

YORUK, M.A., et al. The effects of supplementation of humate and probiotic on egg production and quality parameters during the late laying period in hens. **Poultry Science**, v. 83, p. 84-88, 2004.

ZHAO, S.; WHITE, D.G.; FRIEDMAN, S.L.; GLENN, A.; BLICKENSTAFF, K.; AYERS, S.L.; ABBOTT, J.W.; HALL-ROBINSON, E.; MCDERMOTT, P.F. Antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* serovar Heidelberg from retail meat and poultry, 2002–2006. **Applied and Environmental Microbiology**, v.74, p.6656–6662, 2008.

**CAPÍTULO 1 - PREVALÊNCIA DE *Salmonella enterica* Heidelberg EM
FRANGOS DE CORTE**

RESUMO

MARTINS, João Carlos Gandara. **Prevalência de *Salmonella enterica* Heidelberg em frangos de corte.** 12p. Dissertação (Mestrado Profissional em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Londrina, 2015.

A *Salmonella* sp. pode ser transmitida verticalmente para progênie de lotes de aves de reprodução infectadas e horizontalmente entre lotes. No modelo atual de criação intensiva em larga escala, microrganismos como a *Salmonella* sp., uma vez que adentram nas granjas, podem facilmente se disseminar. O presente experimento coletou informações sobre os coeficientes de prevalência da cepa de *Salmonella enterica* sorovar Heidelberg em frangos de corte. Para este experimento, foram alojados 42 pintos de corte fêmeas. Destas aves, 20 % foram desafiados no segundo dia de vida com inóculo de *S. enterica* Heidelberg na dose $1,0 \times 10^8$ Unidades Formadoras de Colônia – UFC/mL. As demais foram administradas com caldo *Brain Heart Infusion* – BHI. Após 28 dias todas as aves foram eutanasiadas, necropsiadas e os cecos foram coletados, para que pudesse ser realizada a pesquisa de *Salmonella* sp. Todas as aves mostraram presença de *S. enterica* Heidelberg no ceco, determinando a taxa de prevalência de 100 %. A frequência da salmoneloses em frangos de corte pode ser estimada por meio do coeficiente de prevalência.

Palavras-chave: *Salmonella* sp. Frequência. Transmissão horizontal

ABSTRACT

MARTINS, João Carlos Gandara. **Prevalence of *Salmonella enterica* Heidelberg in broiler chickens**. 12p. Dissertation (Professional Masters Degree in Food Technology) - Federal University of Technology – Paraná. Londrina, 2015.

Salmonella sp. can be transmitted vertically to the progeny batch of infected poultry breeding and horizontally among batches. In the current model intensive breeding on a large scale, microorganisms such as *Salmonella* sp., once that it enter in the farms can easily spread. The present study collected information on prevalence rates of *Salmonella enterica* serovar Heidelberg strain in broiler chickens. For this experiment, was housed 42 broiler chicks female distributed in a boxing. Of these chickens, 20 % were challenged on the second day of life with inoculum of *S. enterica* Heidelberg in a dose $1,0 \times 10^8$ Colony Forming Units – CFU/mL. The others were inoculated with Brain Heart Infusion broth – BHI. After 28 days all fowls were euthanized, necropsied, and the cecum were collected, so it could be performed detection of *Salmonella* sp. All fowls showed presence of *S. enterica* Heidelberg in the cecum, determining the prevalence rate of 100 %. The frequency of salmonellosis in broiler chickens can be estimated using the prevalence rate.

Keywords: *Salmonella* sp. Frequency. Horizontal transmission.

4 INTRODUÇÃO

De acordo com Merchán-Hamann; Tauil; Costa (2000), o coeficiente de prevalência é uma importante informação, visto que expressa a proporção que, em determinado momento, é portadora do evento de interesse em relação ao total. Já Wagner (1998), define como a medida da proporção de indivíduos em uma população que está acometida de uma doença em um determinado momento.

A *Salmonella* sp. pode ser transmitida, verticalmente, para progênie de lotes de aves de reprodução infectadas e horizontalmente entre lotes (GAST, 1997). A frequência e duração da colonização do intestino em lotes de frangos são influenciadas pela idade, linhagem genética, estado imunológico e pela dose de *Salmonella* sp. à qual foram expostas (GAST, *et al.*, 2005). O controle da salmonelose representa um grande desafio ao setor avícola, principalmente pela diversidade e emergência de novos sorovares e pela sua relação com a saúde pública (MUNIZ, 2012).

Atualmente, *Salmonella enterica* Heidelberg tem ganhado destaque na América do Norte, e tem sido encontrada também na produção de frango de corte em outros países. Estima-se que salmoneloses causem mais do que 1,2 milhões de casos de doenças por ano nos Estados Unidos da América, com mais de 23.000 hospitalizações e 450 mortes (SCALLAN *et al.*, 2011). Um total de 634 pessoas foram infectadas com sete cepas de *S. enterica* Heidelberg, em surtos ocorridos entre 01 de março de 2013 a 11 de julho de 2014, em 29 estados americanos e em Porto Rico (CDC, 2014).

Salmonella sp. é comercialmente importante em poedeiras, perus, e frangos de corte, devido ao aumento na produção de ovos e carne (NAYAK; KENNEY, 2002; GAST *et al.*, 2004; CHITTICK *et al.*, 2006).

No modelo atual de criação intensiva em larga escala, microrganismos como *Salmonella* sp., uma vez que adentram nas granjas, podem facilmente se disseminar. Por não possuírem hospedeiros específicos, há grande dificuldade de erradicar a bactéria do ambiente de criação ou eliminá-los dos produtos provenientes de animais contaminados (CARDOSO; TESSARI, 2008; FREITAS NETO *et al.*, 2010).

O presente estudo avaliou os coeficientes de prevalência da cepa de *Salmonella enterica* sorovar Heidelberg em frangos de corte.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 MATERIAL

Para execução do experimento foram utilizados 42 pintos de corte fêmeas da linhagem Cobb 500™, alojados em um boxe com 4 m² de área ou 3,40 m² de área útil, com densidade de 10 aves por m² ou 12,5 aves por m² de área útil, com cama de maravalha nova e com espessura de 7 cm, forradas com papel Kraft do dia 0 ao 4º dia de idade. Foram utilizados comedouros manuais e bebedouros pendulares.

5.2 LOCAL

O experimento teve duração de 28 dias, e foi realizado no aviário experimental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) – Câmpus de Dois Vizinhos – PR. Os procedimentos da pesquisa foram submetidos e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UTFPR, e aprovado sob o Protocolo 2015-005, seguindo as determinações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

5.3 AMBIENTE

Previamente ao início do experimento, para a confirmação da ausência de *Salmonella* spp. foi realizado *swab* de cama, caminhando-se em toda a extensão do boxe, *swab* das telas do boxe e *swab* dos comedouros e bebedouros. No momento do alojamento, foi realizado *swab* de fundo de caixa dos pintos de corte de origem. Os materiais coletados foram acondicionados em caixa térmica com temperatura inferior a 8 °C, e enviado para laboratório de patologia animal, onde foi realizada análise convencional, seguindo a *International Organization for Standardization* – ISO 6579:2007 (ISO, 2007).

5.4 MANEJOS EXPERIMENTAIS

Previamente ao alojamento, o ambiente recebeu aquecimento durante um período de 8 horas, para o aquecimento da cama e ambiente. O boxe onde os pintos

de corte foram alojados estava dentro de um aviário medindo 12 m x 8 m (comprimento x largura), com telha francesa, piso de chão batido, muretas e oitão em alvenaria, forração e cortinas laterais plásticas, sendo a tela aviária malha 2. Antes do início do experimento, o aviário foi lavado, realizado a aplicação de inseticida no piso, muretas, oitões, e pilares para controle de cascudinho (*Alphitobius diaperinus*) e desinfetado.

Para controle de ambiência, utilizou-se lâmpadas de aquecimento infravermelho, e o manejo de cortina foi manual. As temperaturas e umidades relativas médias (mínima e máxima) foram registradas diariamente dentro do galpão, com auxílio de termo-higrômetro manual. Água e alimento foram fornecidos *ad libitum* aos animais, respeitando-se a ração adequada para a fase (*Phase feeding*) durante todo o experimento, como fase inicial (1 a 14 dias de idade), fase de crescimento (15 a 23 dias de idade) e fase final (24 a 28 dias de idade). Bebedouros e comedouros foram mantidos limpos diariamente. O programa de luz seguiu o padrão recomendado para a linhagem das aves, através de um temporizador.

Para prevenir que as aves fossem contaminadas por outra fonte de *Salmonella* sp., foram adotadas medidas de biossegurança, como a lavagem das mãos com detergente e aplicação de álcool 70 % (peso/volume), o uso de pedilúvio, com cal hidratada na entrada do galpão, uso de botas plásticas ao acessar o boxe, uso de luvas de procedimento ao manejar as aves, além do controle de roedores no galpão, e ao seu redor.

5.5 PREPARO DO INÓCULO DE *Salmonella enterica* Heidelberg E DESAFIO DAS AVES

A *Salmonella enterica* Heidelberg ATCC 8326 foi inoculada em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) por 12 h a 37 °C. Após este período, a concentração do inóculo foi ajustada, diluindo em caldo BHI, em concentração equivalente à 0,5 na escala de McFarland, correspondente a 10⁸ Unidades Formadoras de Colônia (UFC)/mL.

Das 42 aves alojadas, 20 % (8 aves) foram inoculadas individualmente por via oral, com auxílio de agulha de gavagem, no segundo dia de vida com 1 mL de inóculo de *Salmonella enterica* sub sp. *enterica* sorovar Heidelberg ATCC 8326 na dose 1,0 x 10⁸ UFC/mL. As demais foram administradas com caldo BHI, no mesmo

dia, seguindo-se a mesma técnica, com o objetivo de simular o estresse conferido às inoculadas com *S. enterica* Heidelberg.

5.6 MONITORAMENTO DA CAMA ATRAVÉS DE SWAB DE PROPÉ

Para o monitoramento de *Salmonella* sp. na cama do boxe, foi realizado *swab* de propé, caminhando-se em toda a extensão do boxe no 18º dia de vida. O material coletado foi acondicionado em caixa térmica com temperatura inferior a 8 °C, e enviado para laboratório, onde foi realizado pré-enriquecimento. A amostra pré-enriquecida foi submetida à análise por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), utilizando-se o protocolo do fabricante (BAX System[®], DuPont Qualicon, 2003).

5.7 COLETA DE MATERIAL E ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

No 28º dia, foi realizado o jejum alimentar de seis horas e hídrico de uma hora. Após o jejum, foi realizada a eutanásia por deslocamento cervical de seis em seis aves, respeitando os aspectos éticos preconizados pelo Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV) Resolução nº 1000 de 11 de maio de 2012 (CFMV, 2012). A seguir, foi realizada necropsia e colheita de ceco de todas as aves.

Os cecos foram coletados de forma asséptica, com o objetivo de evitar contaminação cruzada, sendo acondicionados em embalagens assépticas e esterilizadas (Nasco[®], Fort Atkinson, WI), e acondicionadas em caixa térmica com temperatura inferior a 8 °C. O material coletado foi enviado ao laboratório de patologia animal credenciado pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), para que fosse realizada pesquisa de *Salmonella* sp. utilizando-se a técnica de isolamento, com identificação bioquímica e sorológica (sorotipagem). A técnica utilizada neste experimento foi realizada de acordo com Portaria nº 126 de 03 de novembro de 1995 do MAPA (BRASIL, 1995).

As amostras maceradas foram enriquecidas com água peptonada e incubadas a 36 ± 1°C por 18-24h. Após o período de incubação foram semeadas para placas contendo o meio de cultura *Rappaport Vassiliadis semisolid modification* (MSRV), as placas foram incubadas a 42-43°C por 48h. As placas de MSRV com crescimento suspeito de *Salmonella* sp. foram repicadas em placas contendo o meio de cultura ágar *Xylose Lysine desoxycholate* (XLD) e verde brilhante (VB) para

confirmação da característica da colônia de *Salmonella* sp. e incubadas a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ por 18-24h. Das placas de XLD/VB colônias suspeitas foram repicadas em bioquímico preliminar: ágar tríplice de açúcar e ferro (TSI - *Triple Sugar Iron*), ágar lisina-ferro (LIA - *Lysine Iron Agar*), meio sulfeto-indol-motilidade (SIM – *Sulfide Indole Motility Medium*), caldo de ureia e ágar nutriente ($36^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}/24\text{h}$) e análise sorológica.

5.8 ESTUDO DE PREVALÊNCIA

A Equação 1 foi utilizada para determinação do coeficiente de prevalência de *Salmonella enterica* Heidelberg em frangos de corte.

$$P = \frac{\text{número de indivíduos afetados em um determinado momento}}{\text{Total de indivíduos estudados}} \times 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

O numerador corresponde à contagem de portadores do evento num determinado momento. O denominador corresponde ao total de indivíduos avaliados.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As análises realizadas no início do experimento na cama do aviário, telas dos boxes, comedouros e bebedouros foram ausentes para *Salmonella* spp. Esta é uma informação importante, pois evitou assim, a possibilidade de uma contaminação por outra *Salmonella* spp.

De acordo com JAENISCH et al. (2004) a higienização das instalações compreende os procedimentos de limpeza e desinfecção, onde associada ao vazio sanitário, torna-se fundamental para minimizar os riscos de infecções, assim como, a quebra do ciclo de vida de determinados agentes infecciosos.

O resultado da coleta de *swab* de fundo de caixa dos pintos de origem foi ausente, sendo este um dado comprobatório da sanidade das aves alojadas. Segundo Zancan et al. (2000) este procedimento é utilizado para comprovar a ausência de *Salmonella* spp.

O *swab* de cama realizado nos 18 dias de idade foi positivo para *Salmonella* sp. A excreção das aves contaminadas experimentalmente com *S. enterica* Heidelberg pode ter colonizado o ambiente de criação. De acordo com Kingston et al. (1981) a partir de *swabs* de arrasto, coletados do chão dos galpões de frangos, é possível detectar a presença de *Salmonella* com alta sensibilidade.

Os dados coletados do experimento realizado foram inseridos na Equação 1 para obter os resultados do coeficiente de prevalência.

A Equação 1 apresenta o coeficiente de prevalência de *Salmonella enterica* Heidelberg em frangos de corte no 28º dia de vida, sendo observado neste trabalho 100 % de prevalência.

$$P = \frac{42 \text{ indivíduos afetados no } 28^{\circ} \text{ dia de vida}}{42 \text{ indivíduos estudados}} \times 100 \quad (\text{Eq.1})$$

$$P = 1 \times 100$$

$$P = 100 \%$$

O coeficiente de prevalência de 100 % para *Salmonella* sp. encontrado neste experimento difere de outros experimentos realizados com a mesmo sorovar. Menconi et al. (2011) em um experimento realizado com 40 pintos de corte de 1 dia, desafiados com *S. enterica* Heidelberg na dosagem de $1,0 \times 10^6$ UFC/ave, recuperaram a *Salmonella* sp. no ceco após 24 h e 72 h em 80 %, e 70 % respectivamente dos 20 pintos de corte desafiados para cada período avaliado. Em outro experimento, com a dosagem de $1,0 \times 10^5$ UFC/ave de *S. enterica* Heidelberg, Menconi et al. (2011), recuperou a *Salmonella* sp. no ceco após 24 h e 72 h em 90 %, e 35 % respectivamente dos 20 pintos de corte desafiados para cada período avaliado. Essas diferenças no coeficiente de prevalência podem ocorrer em função do tempo e dosagem do desafio realizado.

A contaminação via oral das 8 aves desafiadas nesse experimento está de acordo com o estudo descrito por Wolfenden et al. (2007), onde foram realizados 3 experimentos, desafiando 20 aves do grupo controle positivo com $1,0 \times 10^4$ UFC/ave de *S. enterica* Enteritidis. Foi recuperado após 48 horas da inoculação a cepa nas tonsilas cecais em 100 % das aves desafiadas.

Das oito aves desafiadas experimentalmente no 2º dia de vida, todas se mantiveram contaminadas até o 28º dia de vida, sendo responsáveis pela contaminação horizontal das outras 34 aves sentinelas, alojadas no mesmo boxe.

Acredita-se que a dosagem elevada do inoculo de SH utilizada nesse estudo (10^8 UFC/ave) possibilitou a contaminação horizontal das demais aves. Segundo Gast e Holt (1999), a colonização das salmonelas nos frangos de corte podem ocorrer via transmissão horizontal. Uma vez que a colonização da tonsila cecal é estabelecida pela *Salmonella* sp., a bactéria é consistentemente excretada nas fezes (BAKER et al., 1980).

O coeficiente de prevalência demonstrando as aves desafiadas e as sentinelas que foram contaminadas durante os 28 dias de idade pela transmissão horizontal estão dispostos na Figura A1.

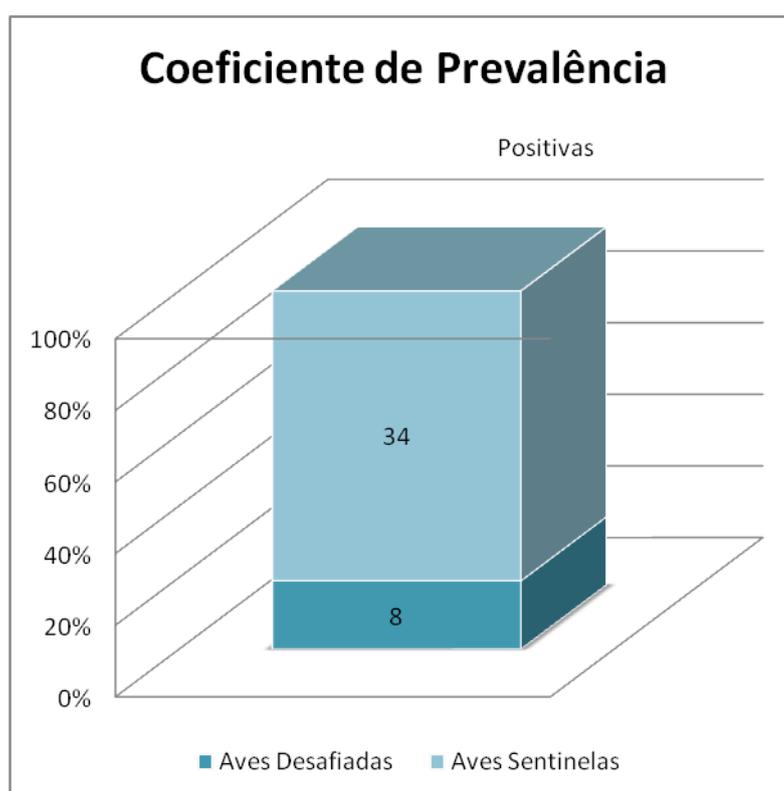


Figura A1: Coeficiente de Prevalência de 100 %, demonstrando as aves desafiadas e sentinelas.

O principal local de colonização da *Salmonella* sp. em aves é o ceco. As aves se infectam por via oral, e quando chega ao intestino a bactéria invade as células epiteliais iniciando a fase sistêmica da infecção, ocorrendo a distribuição para outros órgãos como o fígado, baço onde a bactéria pode ser isolada. Outra via importante para a infecção é a transmissão vertical, em que as galinhas positivas transmitem o micro-organismo através do oviduto a sua progênie (MUNIZ, 2012).

Gast et al. (2004) observaram que galinhas desafiadas experimentalmente via oral com quatro diferentes tipos de *S. enterica* Heidelberg, e uma de *S. enterica*

Enteritidis, tiveram seu trato intestinal, fígado, ovário, baço, ovários e ovidutos, colonizados pelas cinco cepas dos dois sorotipos. As quatro cepas de *S. enterica* Heidelberg foram encontradas no conteúdo interno dos ovos destas aves, porém em menor frequência que a *S. enterica* Enteritidis.

7 CONCLUSÃO

O coeficiente de prevalência da cepa de *Salmonella* Heidelberg ATCC 8326 em frangos de corte foi de 100 %. A utilização desse coeficiente mostrou-se um método adequado para a determinação da frequência de salmoneloses em frangos de corte.

O coeficiente de prevalência está diretamente relacionado a dosagem do inóculo administrado as aves. A alta dosagem pode ter favorecido a prevalência de salmonela, sendo esse parâmetro importante para determinar as condições experimentais da etapa seguinte do estudo.

REFERÊNCIAS

BAKER, R.C.; GOFF, J.P. and MULNIX, E.J. *Salmonellae* recovery following oral and intravenous inoculation of laying hens. **Poultry Science**, v. 59, p. 1067-1072, 1980.

BAX System® PCR assay with automated detection for bacterial screening. Manual do usuário. Wilmington, DE.: DuPont Qualicon, 2003.

BRASIL. Portaria Ministerial nº 126 de 03 de novembro de 1995. Normas de credenciamento e monitoramento de laboratórios de diagnóstico das salmonelas aviárias. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 06 nov. 1995. Seção I, p.17694-17698, 1995.

CARDOSO, A. L. S. P.; TESSARI, E. N. C. *Salmonella* na segurança de alimentos. **Arquivo do Instituto Biológico**, Descalvado, v. 70, n.1, p. 11- 13, 2008.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Multistate outbreak of multidrug-resistant *Salmonella* Heidelberg infections linked to foster farm brand chicken.** Disponível em :<
<http://www.cdc.gov/Salmonella/heidelberg-10-13/>>. Acesso em 13 de agosto de 2014.

CHITTICK, P. et al. Summary of National Reports of foodborne outbreaks of *Salmonella* Heidelberg infections in the United States: clues for disease prevention. **Journal of Food Protection**, v. 69, n. 5, p. 1150-1153, 2006.

CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA VETERINÁRIA (CFMV). RESOLUÇÃO Nº 1000, DE 11 DE MAIO DE 2012. Disponível em:
<<http://www.fcav.unesp.br/Home/Comissoes/ceua/resolucao-cfmv-n-1000-2012.pdf>>. Acesso em 01 de julho de 2015.

FREITAS NETO, O. C. et al. Sources of humannon-typhoid salmonellosis: a review. **Brazilian Journal of Poultry Science**, Campinas, v. 12, n. 1, p. 1-11, 2010.

GAST, R.K. *Salmonella* infections. In: CALNEK, B.W.; BARNES, H.J.; BEARD, C.W.; McDOUGALD, L.R.; SAIF, Y.M. (Eds.). **Diseases of Poultry**, Ames: Iowa. State University Press, p. 81-122, 1997.

GAST, R.K.; HOLT, P.S. Experimental horizontal transmission of *Salmonella enteritidis* strains (phage types 4, 8 and 13a) in chicks. **Avian Disease**, v. 43, p. 774-778, 1999.

GAST, R.; GUARD-BOULDIN J.; HOLT, P.S. Colonization of reproductive organs and internal contamination of eggs after experimental infection of laying hens with *Salmonella* Heidelberg or *Salmonella* Enteritidis. **Avian Disease**, v. 48, p. 863-869, 2004.

GAST, R.; GUARD-BOULDIN, J.; HOLT, P.S. The relationship between the duration of fecal shedding and the production of contaminated eggs by laying hens infected with strains of *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Heidelberg. **Avian Disease**, v. 49, p. 382-386, 2005.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO). **ISO 6579** – Annex D. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp, 2002. AMENDMENT 1: Annex D: Detection of *Salmonella* spp: in animal faeces and in environmental samples from the primary production stage, 4 th ed. 2007.

JAENISCH, F. R. F., et al. Importância da Higienização na Produção Avícola. 2004. Disponível em: http://www.cnpsa.embrapa.br/sgc/sgc_publicacoes/cot363.pdf. Acesso em: 11 de agosto de 2015.

KINGSTON, D.J. A comparison of culturing drag *swab* and litter for identification of infections with *Salmonella* spp. In commercial chicken flocks. **Avian Disease**, v.25, n.2, p.513-516, 1981.

MENCONI, A.; WOLFENDEN, A.D.; SHIVARAMAIAH, S.; TERRAES, J. C.; URBANO, T.; KUTTEL, J.; KREMER, C.; HARGIS, B. M.; TELLEZ, G. Effect of lactic acid bacteria probiotic culture for the treatment of *Salmonella enterica* serovar Heidelberg in neonatal broiler chickens and turkey poults. **Poultry Science**, v. 90, p. 561-565, 2011.

MERCHÁN-HAMANN, E.; TAUIL, P.L.; COSTA, M.P. Terminologia das medidas e indicadores em epidemiologia: subsídios para uma padronização da nomenclatura. **Informe epidemiológico do SUS**, v. 9, n.4, p.273-284, 2000.

MUNIZ, E. C. Atualidades no estudo das salmoneloses aviárias. In: XIII Simpósio Brasil Sul de Avicultura e IV Brasil Sul Poultry Fair, 2012, Chapecó (SC). **Anais...** Chapecó: Núcleo Oeste de Médicos Veterinários, p. 13-26, 2012.

NAYAK R.; KENNEY, P.B. Screening of *Salmonella* isolates from a turkey production facility for antibiotic resistance. **Poultry Science**, v .81, p. 1496-1500, 2002.

SCALLAN E, HOEKSTRA RM, ANGULO FJ, TAUXE RV, WIDDOWSON MA, ROY SL, JONES JL, GRIFFIN PM. Foodborne illness acquired in the United States- -major pathogens. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 1, p. 7-12, Janeiro, 2011.

WAGNER, MB. Medindo a ocorrência da doença: prevalência ou incidência? **Jornal de Pediatria**, v. 74, n. 2, p. 157-162, 1998.

WOLFENDEN, A.D. et al. Effect of organic acids and probiotics on *Salmonella* enteritidis infection in broiler chickens. **International Journal of Poultry Science**, v. 6, p. 403-405, 2007.

ZANCAN, F.B.; BERCHIERI JÚNIOR, A.; FERNANDES, S.A.; GAMA, N.M.S.Q. *Salmonella* spp investigation in transport box of day old birds. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.31, n. 3, p.230-232, 2000.

**CAPÍTULO 2 – AVALIAÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS E PROBIÓTICO PARA
REDUÇÃO DE *Salmonella enterica* Heidelberg EM FRANGOS DE CORTE**

RESUMO

MARTINS, João Carlos Gandara. **Avaliação de ácidos orgânicos e probiótico para redução de *Salmonella enterica* Heidelberg em frangos de corte.** 21p. Dissertação (Mestrado Profissional em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Londrina, 2015.

Empresas avícolas buscam aprimorar as condições higiênico-sanitárias na cadeia produtiva para que se reduza o risco da contaminação na linha de abate de frangos de corte. Neste estudo, foi avaliado o efeito da administração de uma mistura de ácidos orgânicos e probiótico na redução da contaminação por *Salmonella enterica* Heidelberg (SH) em frangos de corte. Duzentos pintos de corte fêmeas foram distribuídos em cinco tratamentos, sendo um grupo controle positivo e 4 testes (T1, T2, T3 T4), com 4 repetições cada. No 2º dia de vida, 20 % das aves receberam o inóculo de SH. A administração de ácidos orgânicos foi realizada nas idades 0, 14 e 24 nos tratamentos onde foi utilizado probiótico. Já o probiótico foi administrado nas idades 1, 15 e 25 dias. Nos tratamentos 2 e 4, a dosagem de probiótico foi de 10^6 Unidades Formadoras de Colônia – UFC/ave, e nos tratamentos 1 e 3, de 5×10^5 UFC/ave. As aves foram eutanasiadas, necropsiadas e tiveram o ceco coletado com 28 dias de idade. Para a análise quantitativa de *Salmonella* sp., utilizou-se a técnica de Número mais provável – NMP/g. O controle positivo teve contagem de 5.106 NMP/g e o T2 contagem de 41 NMP/g, apresentando diferença significativa ($p < 0,05$) entre o T2 e o controle positivo, bem como entre o T2 e o T1, que teve contagem de 1.354 NMP/g. Para a avaliação do índice de aves contaminadas, as aves avaliadas com contagens > 3 NMP/g foram consideradas positivas, e as aves com contagens < 3 NMP/g, foi realizada pesquisa de *Salmonella* spp. para confirmar a ausência. Houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos. Houve redução no índice de aves contaminadas de 58,34 % e 25 % nos tratamentos T2 e T4, respectivamente. Não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) na avaliação do desempenho zootécnico das aves. A associação de ácidos orgânicos e probiótico utilizada no T2 mostrou-se uma ferramenta eficaz no controle de *S. enterica* Heidelberg em frangos de corte aos 28 dias de idade.

Palavras-chave: Controle de *Salmonella*. Probiótico. Ácidos orgânicos. Cadeia produtiva. Desempenho zootécnico.

ABSTRACT

MARTINS, João Carlos Gandara. **Evaluation of organic acids and probiotic to reduce *Salmonella enterica* Heidelberg in broiler chickens.** 21p. Dissertation (Professional Masters Degree in Food Technology) - Federal University of Technology – Paraná. Londrina, 2015.

Poultry companies seek to improve the sanitary conditions in the supply chain so as to reduce the risk of contamination in broiler slaughter line. In this study, –was evaluated the effect of administration of a mixture of organic acids and probiotics in reducing contamination by *Salmonella enterica* Heidelberg (SH) in broilers. Two hundred broiler chickens female were distributed in a positive control group and 4 treatments (T1, T2, T3, T4), with four repetitions each. On the second day of life, 20 % of birds received the inoculums of SH. Administration of organic acids was performed at ages 0, 14 and 24 in the treatments where it was used probiotic. But the probiotic was administered at ages 1, 15 and 25 days. In treatments 2 and 4, the probiotic dose was 10^6 CFU/bird, and treatments 1 and 3, 5×10^5 CFU/bird. The birds were euthanized, necropsied and the cecum were collected at 28 days of age. For quantitative analysis of *Salmonella*, was used the technique of Most Probable Number – MPN/g. The positive control was 5.106 counts MPN/ g and T2 counts 41 MPN/ g, with a significant difference ($p < 0,05$) between the positive control and T2 and between T2 and T1, that had counting 1.354 MPN/g. For the evaluation of infected birds index, the birds evaluated with scores > 3 MPN/g were considered positive, and the birds with scores < 3 MPN/g, *Salmonella* spp. survey was conducted to confirm the absence. There was a significant difference ($p < 0,05$) between treatments. There was reduction in infected birds index of 58,34 % and 25 % in T2 and T4, respectively. No significant differences were observed ($p > 0,05$) in evaluating the performance of birds. The combination of organic acids and probiotic used in the T2 proved to be an effective tool in *Salmonella* control in broilers at 28 days of age.

Keywords: Control of *Salmonella*. Probiotic. Organic acids. Productive chain. Growth performance.

8 INTRODUÇÃO

Salmonella enterica sorovar Heidelberg tem sido reconhecida como um dos mais comuns sorovares associados à infecções alimentares em todo o mundo (ZAIDI et al., 2008; BORSOI et al., 2009; ELGROUD et al., 2009; WALES et al., 2009; DUTIL et al., 2010). Na América do Norte, *S. enterica* Heidelberg está entre os três sorovares mais isolados de pessoas infectadas com *Salmonella*, classificação esta que não ocorre em outras regiões do mundo (BUCHER, 2007). No Brasil, desde 1962, a *S. enterica* Heidelberg tem sido identificada em aves e produtos derivados (HOFER et al., 1997).

O processo higiênico sanitário do abate de frangos de corte foi avaliado por Dickel (2004) em três abatedouros na Região Sul do Brasil. O autor relatou que carcaças, antes e depois do *chiller*, apresentaram 31,7 % e 20 % de positividade, respectivamente, sendo identificados os sorovares Heidelberg (63,9 %), Enteritidis (31,9 %), Worthington (2,1 %) e Tennessee (2,1 %).

Fontes de infecções humanas por *S. enterica* Heidelberg incluem o consumo de carne de frango ou ovos mal cozidos, e de alimentos produzidos com ovos (CHITTICK et al., 2006; ZHAO et al., 2008; BORSOI et al., 2009).

As empresas avícolas buscam constantemente aprimorar as condições higiênico-sanitárias em toda a cadeia produtiva. Para que se reduza o risco da contaminação na linha de abate de frangos de corte, são necessários, além de um bom programa de limpeza e desinfecção da planta frigorífica, que as aves sejam ausentes para *Salmonella* spp.

A ausência de determinados microrganismos causadores de zoonoses em produtos de origem animal específicos é uma exigência de regulamentos nacionais e internacionais (SILVA, 1998). A partir da crescente ênfase na segurança de produtos cárneos que chegam ao consumidor, tem-se estimulado a identificação de meios para reduzir ou eliminar *Salmonella* spp. antes do abate (FUNK et al., 2001).

A principal forma de controle de *Salmonella* em produção de aves relaciona-se a medidas de biossegurança e vacinação (BARROW, 2007). Mas, várias ferramentas também têm sido empregadas como uso de antibióticos, ácidos orgânicos de cadeia curta na água ou ração, prebióticos, probióticos e vacinação (VAN IMMERSEEL et al., 2005; PICKLER et al., 2012).

A acidificação da água de bebida das aves com ácidos orgânicos pode reduzir significativamente a quantidade de *Salmonella* sp. nas carcaças, no papo e nas tonsilas cecais quando usado durante o período de jejum hídrico no pré-abate (BYRD et al., 2001; JARQUIN et al., 2007).

O uso de probióticos na agropecuária tem aumentado como possível alternativa aos antibióticos utilizados como promotores de crescimento (CASTANON, 2007), e em certos casos, para o controle de patógenos entéricos específicos (ALVAREZ-OLMOS; OBERHELMAN, 2001; DOMINGUEZ-BELLO; BLASER, 2008). Tellez et al. (2006) realizaram uma triagem de bactérias, o que permitiu a identificação de 11 bactérias ácido lácticas que foram eficazes no tratamento de frangos ou perus infectados com *Salmonella* sp.

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da administração de ácidos orgânicos e probiótico na redução da contaminação por *Salmonella enterica* sorovar Heidelberg em frangos de corte.

9 MATERIAL E MÉTODOS

9.1 MATERIAL

Para execução do experimento, foram utilizados duzentos pintos de corte fêmeas da linhagem Cobb 500™, distribuídos em 20 boxes com 1 m² de área ou 0,80 m² de área útil, com densidade de 10 aves por m² ou 12,5 aves por m² de área útil, e cama de maravalha nova com espessura de 7 cm, forradas com papel Kraft do dia 0 ao 4º dia de idade. Foram utilizados comedouros manuais e bebedouros pendulares.

9.2 LOCAL

O experimento teve duração de 28 dias, e foi realizado no aviário experimental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) – Câmpus de Dois Vizinhos – PR. Os procedimentos da pesquisa foram submetidos e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UTFPR, sob o Protocolo 2015-005, seguindo as determinações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

9.3 AMBIENTE

Previamente ao início do experimento, para a confirmação da ausência de *Salmonella* spp. foi realizado *swab* de cama, caminhando-se em toda a extensão dos boxes, *swab* das telas dos boxes e *swab* dos comedouros e bebedouros. No momento do alojamento, foi realizado *swab* de fundo de caixa dos pintos de corte de origem. Os materiais coletados foram acondicionados em caixa térmica com temperatura inferior a 8 °C, e enviado para laboratório de microbiologia, onde foi realizado pré-enriquecimento. A amostra pré-enriquecida foi submetida à análise por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), utilizando-se o protocolo do fabricante do BAX System® (BAX System®, DuPont Qualicon, 2003).

9.4 MANEJOS EXPERIMENTAIS

Antes do alojamento, o ambiente recebeu aquecimento durante um período de 8 horas, para o aquecimento da cama e ambiente. Os boxes onde os pintos de corte foram alojados encontrava-se dentro de um aviário medindo 12 m x 8 m (comprimento x largura), com telha francesa, piso de chão batido, muretas e oitão em alvenaria, forração e cortinas laterais plásticas, sendo a tela aviária malha 2. Previamente ao experimento, o aviário foi lavado, realizado a aplicação de inseticida no piso, muretas, oitões e pilares, para controle de cascudinho (*Alphitobius diaperinus*), e desinfetado.

Para controle de ambiência, utilizou-se máquina de aquecimento a lenha, com sensor de temperatura para controle automático da mesma. O manejo de cortina foi manual. As temperaturas e umidades relativas médias (mínima e máxima) foram registradas diariamente dentro do galpão, com auxílio de termo-higrômetro manual. Água e alimento foram fornecidos *ad libitum* aos animais, respeitando-se a ração adequada para a fase (*Phase feeding*) durante todo o experimento: Fase inicial (1 a 14 dias de idade), fase de crescimento (15 a 23 dias de idade) e fase final (24 a 28 dias de idade). Bebedouros e comedouros foram mantidos limpos diariamente. O programa de luz seguiu o padrão recomendado para a linhagem, através de um temporizador.

Para prevenir que as aves pudessem ser contaminadas por outra fonte de *Salmonella* sp., foram adotadas medidas de biossegurança, como a lavagem das

mãos com detergente, e aplicação de álcool 70% (p/v), o uso de pedilúvio, com cal hidratada na entrada do galpão, uso de botas plásticas ao acessar o boxe, uso de luvas de procedimento ao manejar as aves, além do controle de roedores no galpão, e ao redor do mesmo.

9.5 PREPARO DO INÓCULO DE *Salmonella enterica* Heidelberg E DESAFIO DAS AVES

A *Salmonella enterica* Heidelberg ATCC 8326 foi inoculada em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) por 12 h a 37 °C. Após este período, a concentração do inóculo foi ajustada, diluindo em caldo BHI, em concentração equivalente à 0,5 na escala de McFarland, correspondente a 10^8 UFC/mL.

Foram alojados 200 pintos de corte em delineamento inteiramente casualizado, em 5 tratamentos, com quatro boxes por tratamento contendo 10 aves cada. No segundo dia de vida, 20 % das aves de cada boxe (2 aves de 10 aves total/boxe) foram inoculadas com 1 mL de *Salmonella enterica* sub sp. *enterica* sorovar Heidelberg ATCC 8326 na dose $1,0 \times 10^8$ UFC/ave.

As demais aves foram administradas com 1 mL de caldo BHI, seguindo o mesmo procedimento, com o objetivo de simular o estresse conferido.

9.6 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com cinco tratamentos, sendo um controle positivo e quatro testes, com quatro repetições por tratamento de 10 aves por unidade experimental. As duzentas aves foram distribuídas aleatoriamente nas unidades experimentais.

Um produto à base de ácidos orgânicos foi administrado via água de bebida para as aves dos tratamentos teste 12 h antes do probiótico. A administração deste produto foi realizada nas idades 0, 14 e 24 dias. Esta mistura de ácidos era composta por cinco diferentes ácidos orgânicos (lático, acético, tânico, propiônico e caprílico). Foi fornecida a dosagem recomendada pelo fabricante, e o produto ficou disponível por um período de 12 h.

O probiótico utilizado era um composto comercial, à base de bactérias ácido lácticas, composto por 11 cepas de *Lactobacillus*, sendo: *Lactobacillus bulgaricus* (3

cepas) *Lactobacillus casei* (2 cepas) *Lactobacillus cellobiosus* (2 cepas) *Lactobacillus fermentum* (3 cepas) *Lactobacillus helveticus* (1 cepa). Este foi diluído em água e administrado nos bebedouros nas idades 1, 15 e 25 dias. Nos tratamentos 2 e 4, a dosagem foi de acordo com a recomendação do fabricante, sendo de 0,006 g/ ave, ou 10^6 UFC/ ave. Já para os tratamentos 1 e 3, a dosagem utilizada foi a metade da recomendada 0,003 g/ ave, ou 5×10^5 UFC/ave. O produto ficou disponível por um período de 12 h.

A mistura de ácidos orgânicos e probiótico por serem produtos comerciais, são registrados no Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). A Tabela 1 apresenta os diferentes tratamentos empregados.

Tabela 1 - Tratamentos empregados para a redução da contaminação por *Salmonella enterica* Heidelberg em frangos de corte com diferentes administrações.

Tratamento	AO (diluição L/L)	PB (UFC/ave)	Número de administrações
CP	0	0	0
T1	1:1000	5×10^5	1
T2	1:1000	10^6	1
T3	1:1000	5×10^5	3
T4	1:1000	10^6	3

CP = Controle positivo; T1 = Tratamento 1; T2 = Tratamento 2; T3 = Tratamento 3; T4 = Tratamento 4; AO = Mistura de ácidos orgânicos; PB = probiótico;

9.7 MONITORAMENTO DA CAMA ATRAVÉS DE SWAB DE PROPÉ

Para monitoramento da cama onde o experimento foi realizado, foi utilizado um par de propé de pano por tratamento, entrando em contato com toda a extensão da cama. Após a coleta, os materiais coletados foram acondicionados em caixa térmica com temperatura inferior a $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ e enviado para laboratório de patologia animal credenciado pelo MAPA para que fossem analisados quanto ao conteúdo de *Salmonella* sp. conforme a ISO 6579:2007 (ISO, 2007).

9.8 COLETA DE MATERIAL

No 28º dia, foi realizado o jejum alimentar de seis horas e hídrico de uma hora. Após o jejum, foi realizada eutanásia por deslocamento cervical, respeitando-se os aspectos éticos preconizados pelo Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV), Resolução nº 1000 de 11 de maio de 2012 (CFMV, 2012), que dispõe sobre procedimentos e métodos de eutanásia em animais e dá outras providências.

Foi realizada a necropsia e colheita de ceco de 3 aves por repetição de cada tratamento. Os cecos foram coletados de forma asséptica, através do uso de uma pinça e uma tesoura por ave, com o objetivo de evitar contaminação cruzada. Após a coleta, os cecos foram acondicionados individualmente em frascos coletores assépticos esterilizados (Deskarplás), macerados e acondicionados em caixa térmica com temperatura inferior a 8°C. Posterior à coleta, o material foi remetido a um laboratório de patologia animal credenciado pelo MAPA, para que fossem realizadas as análises laboratoriais. A Figura B1 demonstra os passos (1 a 4) da técnica de coleta realizada.

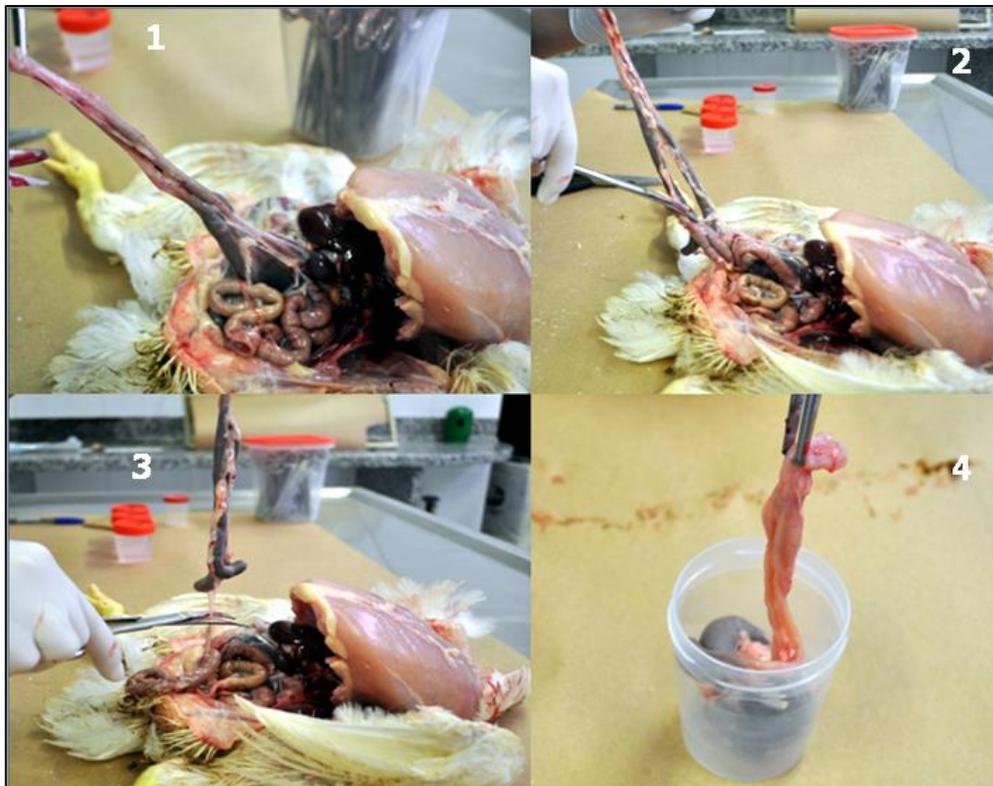


Figura B1: Coleta de ceco e acondicionamento em embalagem asséptica.
Fonte: Mercolab (2015)

9.9 PROCEDIMENTO DE CONTAGEM DE *Salmonella enterica* Heidelberg PELA TÉCNICA DE NÚMERO MAIS PROVÁVEL POR GRAMA (NMP/g)

Após a pesagem das amostras, foi realizado o pré-enriquecimento, adicionando água peptonada na proporção de 1:10, após homogeneização das amostras, essas foram diluídas (diluição seriada) em -1, -2 -3 -4 e -5. De cada diluição foi passado alíquotas de 1mL para cada 3 tubos contendo 9 mL de água peptonada. Os tubos foram incubados a 36 ± 1 °C por 21 ± 3 h.

Após o período de incubação, os tubos que apresentaram crescimento (aspecto turvo) foram semeados para placas contendo o meio de cultura *Rappaport Vassiliadis semisolid modification* (MSRV), as placas foram incubadas a $42,5 \pm 0,5$ °C por 48 h. As placas de MSRV com crescimento suspeito de *Salmonella* foram repicadas em placas contendo o meio de cultura ágar *Xylose Lysine desoxycholate* (XLD) e verde brilhante (VB) para confirmação da característica da colônia de *Salmonella* sp. e incubadas a 37 ± 1 °C por 21 ± 3 h. Das placas de XLD/VB colônias suspeitas foram repicadas em bioquímico preliminar: ágar tríplice de açúcar e ferro (TSI - *Triple Sugar Iron*), ágar lisina-ferro (LIA - *Lysine Iron Agar*), meio sulfeto-indol-motilidade (SIM – *Sulfide Indole Motility Medium*), caldo de ureia e ágar nutriente (36 ± 1 °C/24h) e análise sorológica, conforme Figura B2.



Figura B2: Diluição seriada; placa MSRV; placa XLD/VB; bioquímica.
Fonte: Mercolab (2015)

Os resultados de positividade das placas foram transferidos para a tabela de Blodgett (2006), na qual o NMP/g está estabelecido com diferentes limites de confiança, sendo 95% o limite adotado nesta pesquisa, a fim de obter-se o NMP para cada amostra.

9.10 ÍNDICE DE AVES CONTAMINADAS COM *Salmonella enterica* Heidelberg

Para avaliar o índice de aves contaminadas com *Salmonella enterica* Heidelberg, foi adotado o seguinte procedimento: contagens > 3 NMP/g foram consideradas positivas; contagens < 3 NMP/g, foi realizada pesquisa de *Salmonella* sp. para confirmar a ausência, conforme a Portaria nº 126 de 03 de novembro de 1995 do MAPA (BRASIL, 1995).

9.11 DESEMPENHO ZOOTÉCNICO

As variáveis zootécnicas analisadas foram: peso médio nos dias 0, 7^o, 14^o, 21^o e 28^o de idade, ganho de peso diário, conversão alimentar e mortalidade total aos 28 dias de idade, conforme metodologia proposta por Miragliotta (2005).

9.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As médias de contagem do Número Mais Provável (NMP) por grama de *Salmonella enterica* Heidelberg foram transformadas aplicando-se $(NMP + 1)^{-1/3}$ para satisfazer a pressuposição de normalidade e igualdade de variância. Após, foi realizada ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 95 % de confiança.

O índice de aves contaminadas por *Salmonella enterica* Heidelberg foi comparado utilizando o teste Qui-quadrado (χ^2) a 95 % de confiança.

Os resultados da variável zootécnica peso médio foram submetidos ao teste de normalidade e posteriormente ao teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis a 95 % de confiança para comparação de médias. Os resultados de ganho de peso diário e conversão alimentar foram submetidos ao teste de normalidade, análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey a 95 % de confiança. Todas as análises foram realizadas utilizando o programa estatístico Action versão 2.9.29.368.534 – Junho/2015, com versão do R: 3.0.2.

10 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das análises realizadas na cama do aviário, telas dos boxes, comedouros e bebedouros foram negativos para *Salmonella* sp. em análise realizada no PCR automatizado BAX System®. Esse controle foi fundamental para evitar a contaminação cruzada das aves por outra fonte de *Salmonella* spp. que não fosse a *S. enterica* Heidelberg.

De acordo com Kuana (2009), recomenda-se estabelecer um plano de limpeza e desinfecção com objetivos claros, e um programa de ação detalhado, estabelecendo uma ordem a ser realizados para limpar, desinfetar e preparar as

instalações, incluindo o processo de pós-desinfecção, os quais avaliam o processo executado.

Por meio da análise de mecônio presente no fundo das caixas de transporte no momento da chegada das aves no aviário, os pintos de corte foram monitorados quanto à presença de *Salmonella* sp. O resultado foi negativo em análise realizada no PCR automatizado BAX System[®]. De acordo com Brasil (2004), este é um método validado para detecção de *Salmonella* spp.

Os swabs de cama realizados nos 28 dias de idade foram ausentes para *Salmonella enterica* Heidelberg em todos os tratamentos, inclusive no controle positivo. Esses resultados podem ser falsos negativos, visto que a técnica utilizada foi qualitativa (pesquisa) e não quantitativa (contagem). A cama no final do experimento encontrava-se com baixa umidade, e possivelmente, com baixa atividade de água (a_w) devido ao sistema de aquecimento dentro do galpão. Segundo Hayes et al. (2000) um ambiente de baixa a_w (<0,84) provavelmente representa uma barreira física para a criação ou a manutenção de *Salmonella* spp. em frangos de corte.

10.1 CONTAGEM BACTERIANA NO CECO

As contagens de colônias de *Salmonella enterica* sorovar Heidelberg (SH) no ceco encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2 - Contagem de colônias no ceco de aves desafiadas com SH e submetidas a diferentes tratamentos com mistura de ácidos orgânicos e probiótico

Tratamentos	Descrição	Contagem de colônias (NMP/g)
		28 dias
CP	Controle Positivo	5106 ^b
T1	AO + ½ PB ¹	1354 ^b
T2	AO + PB ¹	41 ^a
T3	AO + ½ PB ³	200 ^{ab}
T4	AO + PB ³	888 ^{ab}
Valor de P		0,006*

*Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa $p < 0,05$ pelo teste de Tukey.

AO = Mistura de ácidos orgânicos;

½ PB = 5×10^5 UFC/ave de probiótico;

PB = 10^6 UFC/ave de probiótico;

¹ = uma administração de AO e PB;

³ = três administrações de AO e PB.

Obtiveram-se diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos na contagem de SH referente à colonização do ceco aos 28 dias de idade.

O T2 com contagem de 41 NMP/g apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparado ao controle positivo (5106 NMP/g). O resultado pode ter ocorrido em função da ação do ácido orgânico ao longo do trato gastrointestinal, e da colonização do ceco pelo probiótico na dose utilizada de 10^6 UFC/ave.

De acordo com Higgins et al. (2007) a combinação do ácido orgânico com o probiótico pode ser mais eficaz, porque o provável local de ação do ácido orgânico é o papo, e o local de ação do probiótico, foi demonstrado ser mais eficaz na redução da colonização de *Salmonella* spp. no ceco e tonsilas cecais.

Resultados positivos utilizando ácidos orgânicos frente ao desafio das aves com *Salmonella* sp. foram descritos por Tellez et al. (2013). Os autores avaliaram a combinação dos ácidos acético, láctico, propiônico no tratamento de frangos de corte desafiados com *Salmonella enterica* Typhimurium (ST), observando significativa redução de ST nos cecos e papo das aves tratadas.

Também houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre o T2 e T1, o qual tiveram diferenças nos tratamentos, apenas entre a dosagem de probiótico utilizada, sendo, 10^6 e 5×10^5 , respectivamente.

A dosagem reduzida de probiótico que o T1 recebeu, frente ao desafio de *Salmonella enterica* Heidelberg com elevada dosagem ($1,0 \times 10^8$ UFC/ave), pode ter sido insuficiente para causar inibição, através de seus mecanismos antimicrobianos, do crescimento da SH, como ocorreu no T2. Segundo Gast et al. (2005) a frequência e duração da colonização do intestino em lotes de frangos são influenciadas pela idade, linhagem genética, estado imunológico e pela dose de *Salmonella* sp. à qual foram expostas.

Patterson e Burkholder (2003) citam que microrganismos como os *Lactobacillus* podem agir na inibição de patógenos através da competição por sítios de ligação, competição por nutrientes, produção de compostos tóxicos, assim como a estimulação do sistema imunológico.

Os resultados encontrados no presente trabalho corroboram com os descritos por Wolfenden et al. (2007), que combinaram probióticos e ácidos orgânicos, e reduziu de forma consistente e significativa *Salmonella enterica* Enteritidis no papo e tonsilas cecais de frango de corte.

No T4, o qual recebeu a mesma dosagem de probiótico do T2, porém com 2 administrações a mais, não houve redução significativa ($p > 0,05$) frente ao grupo controle positivo. As aves do T4 podem não ter ingerido a dose de probiótico

preconizada, pois o produto diluído ficou disponível nos bebedouros para a ingestão via oral.

Vários métodos de tratamento utilizando-se probióticos são descritos, como através da ração, adição à água de bebida, pulverização sobre as aves, inoculação via cloaca, inoculação em ovos embrionados, através de cama usada, em cápsulas gelatinosas e via intra-esofágica (SCHNEITZ, 1992; ZIPRIN et al., 1993; ANDREATTI FILHO et al., 1997). A via de administração dos probióticos pode determinar uma melhora ou piora na capacidade de colonização intestinal pelas bactérias presentes no produto utilizado. A inoculação direta no esôfago (intra-esofágica) é a mais eficiente (STAVRIC, 1992). Porém, devido à necessidade de aplicação em massa, métodos de administração através da água de bebida ou pulverização são os mais indicados em condições de campo (SCHNEITZ, 1992).

10.2 ÍNDICE DE AVES CONTAMINADAS COM *Salmonella enterica* Heidelberg

No grupo controle positivo, houve 100 % de presença de *Salmonella enterica* Heidelberg (SH) das aves avaliadas. Esse dado corrobora com as observações do capítulo 1, em que observou-se a transmissão horizontal de SH para 100% das aves.

Observou-se 100 % de presença de SH também nos tratamentos T1 e T3. Nestes tratamentos, as aves receberam 5×10^5 UFC/ave de probiótico. Através da menor dosagem de probiótico, pode não ter desenvolvido um reforço na barreira intestinal, como aumento de muco, e como consequência, ocorreu maior colonização de *Salmonella enterica* Heidelberg no ceco.

As bactérias probióticas podem aumentar a produção mucinas, uma camada de glicoproteínas que, quando em contacto com água, forma uma película que lubrifica e protege o epitélio intestinal contra agentes patogênicos, formando uma barreira física entre o epitélio e o conteúdo do lúmen intestinal (OLIVEIRA-SEQUEIRA et al., 2008), mantendo-se as bactérias num lugar seguro no lúmen intestinal (MATTAR et al., 2002).

Em tratamentos realizados por Menconi et al. (2011) com a dosagem de 10^6 UFC/ ave de probiótico em pintos de corte desafiados com 10^6 UFC/ave de *S. enterica* Heidelberg, houve recuperação da bactéria de 80 % e 70 % no grupo

controle em 24 e 48 horas, respectivamente. O que difere os dois trabalhos foi o período de avaliação da contaminação.

Nos tratamentos T2 e T4, houve redução de contaminação em 58,34 % e 25 % das aves avaliadas, respectivamente. A redução da presença de SH, pode estar relacionada à dosagem mais elevada de probiótico (10^6 UFC/ave).

Wolfenden et al. (2007) realizaram tratamentos associando mistura de ácidos orgânicos e probiótico com a dosagem de $1,8 \times 10^7$ UFC/ave em pintos de corte desafiados com $2,4 \times 10^4$ UFC/ave de *Salmonella enterica* Enteritidis, reduzindo 85 % e 79 % em 24 e 48 horas, respectivamente nas tonsilas cecais.

Os dados da Tabela 3 demonstram os resultados de presença de *Salmonella enterica* Heidelberg recuperados nos cecos dos frangos de corte submetidos aos tratamentos.

Tabela 3 - Percentual de aves contaminadas com SH aos 28 dias de idade nos diferentes tratamentos.

Tratamentos	(Presença/total (% presença))
	28 dias
Controle Positivo	(12/12)100
T1	(12/12)100
T2	(5/12)41,66
T3	(12/12)100
T4	(9/12)75
Valor de P	<0.05*

* $p < 0,05$ indica que há associação entre os tratamentos utilizados e os percentuais de presença encontrados pelo teste de Qui-quadrado;

Houve redução no número de aves contaminadas com *Salmonella enterica* Heidelberg nos tratamentos T2 e T4. O uso de probióticos antes do desafio, conforme realizado no presente experimento pode ter contribuído para que houvesse essa redução.

Em dois experimentos com pintos de corte de 1 dia, Higgins et al. (2010) realizaram tratamentos com probiótico a base de bactérias ácido lácticas na dose 1×10^6 UFC/ave administrado 24 horas antes do desafio com *Salmonella enterica* Enteritidis na dose 1×10^4 UFC/ave. Esses autores não observaram diferença significativa na redução de SE quando comparado ao grupo controle. Porém, quando executaram em outros dois experimentos, com a dosagem de SE de 4×10^3 e 9×10^3 , com a mesma dose de probiótico, esta diferença foi significativa.

As reduções no percentual de aves contaminadas e a redução na colonização do ceco refletem a importância de que o controle das salmoneloses a campo pode

contribuir para uma redução da contaminação na linha de abate, principalmente na área da evisceração, na qual podem ocorrer rompimentos a nível intestinal e de papo.

O aumento da resistência de *S. enterica* Heidelberg serve de alerta para a progressão da resistência bacteriana aos sanitizantes usados em abatedouros avícolas e para a necessidade de se documentar e inibir esta progressão (COLLA et al., 2012).

10.3 DESEMPENHO ZOOTÉCNICO DAS AVES

Os resultados de peso médio corporal e desvio padrão de frangos de corte nas diferentes idades submetidas aos tratamentos experimentais estão dispostos na Tabela 4.

Tabela 4 - Peso médio corporal (g) e desvio padrão de frangos de corte nos dias 0, 7, 14, 21 e 28 dias

Tratamento	Peso médio em gramas				
	0 dia	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias
CP	43,13 ± 1,11 ^a	131,00 ± 8,04 ^a	310,75 ± 38,75 ^a	578,75 ± 39,50 ^a	968,75 ± 98,04 ^a
T1	44,38 ± 1,11 ^a	127,00 ± 6,79 ^a	312,38 ± 44,63 ^a	592,83 ± 48,65 ^a	995,50 ± 101,32 ^a
T2	43,88 ± 1,49 ^a	129,25 ± 6,70 ^a	314,25 ± 35,74 ^a	625,00 ± 45,21 ^a	1043,17 ± 57,58 ^a
T3	45,50 ± 0,91 ^a	137,72 ± 1,66 ^a	364,17 ± 6,60 ^a	650,24 ± 47,22 ^a	1103,31 ± 28,34 ^a
T4	43,25 ± 1,66 ^a	127,47 ± 4,84 ^a	277,71 ± 11,34 ^a	551,71 ± 40,75 ^a	904,86 ± 87,47 ^a
Valor de P	0,09	0,17	0,28	0,57	0,60

*Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa $p < 0,05$ no teste de Kruskal-Wallis.

Para os valores de peso médio das aves nas diferentes idades submetidas aos tratamentos com diferentes dosagens e administrações de probiótico, não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) em nenhuma das idades avaliadas. Uma provável causa de não ter ocorrido esta diferença, pode estar associada a fatores de manejo e ambientais.

Rocha et al. (2010) concluíram que o uso de probióticos, ácidos orgânicos e prebióticos para frangos de corte não obtiveram resultados melhores em relação aos parâmetros de desempenho avaliados.

Santos (2013) avaliou o peso médio de aves tratadas com diferentes probióticos com flora definida e indefinida e inoculação de *Salmonella enterica* Enteritidis, não observando diferença significativa ($p > 0,05$) entre os tratamentos.

Porém, efeitos positivos foram encontrados por Tellez et al. (2012), em que ensaios em escalas comerciais indicaram que a administração apropriada de

probióticos de culturas definidas para perus e frangos melhorou o desempenho zootécnico.

As médias de ganho de peso diário e conversão alimentar das aves nas diferentes idades submetidas aos tratamentos experimentais estão descritos na Tabela 5.

Tabela 5 – Média e desvio padrão de ganho de peso diário e conversão alimentar nos diferentes tratamentos

Tratamentos	Médias	
	28 dias	
	Ganho de peso diário (g)	Conversão alimentar (kg)
Controle Positivo	34,60 ± 3,50 ^a	2,008 ± 0,067 ^a
T1	35,55 ± 3,62 ^a	2,009 ± 0,148 ^a
T2	35,81 ± 2,61 ^a	2,024 ± 0,036 ^a
T3	38,60 ± 0,53 ^a	1,901 ± 0,055 ^a
T4	34,56 ± 5,89 ^a	1,978 ± 0,126 ^a
Valor de P	0,64	0,53

*Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa $p < 0,05$ no teste de Tukey.

Neste estudo não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) no ganho de peso diário e na conversão alimentar, entre os diferentes tratamentos, provavelmente devido às condições ambientais, alimentação fornecida e equipamentos de fornecimento de água (bebedouros pendulares). De acordo com Pickler et al. (2012) ao avaliar o uso de ácidos orgânicos no desempenho de frangos de corte, esses apresentaram resultados controversos, provavelmente devido aos diferentes mecanismos de ação, condições ambientais, dose e produto utilizado e parâmetros avaliados.

Em relação à mortalidade das aves, a taxa observada foi de 2,5 % entre os 5 tratamentos. Esta mortalidade ocorreu apenas nos tratamentos T3, e T4, com 5 % e 7,5 %, respectivamente na primeira semana de vida. Todas as aves foram necropsiadas, e as lesões macroscópicas encontradas foram características de infecção por *Escherichia coli* (pericardite, aerossaculite e perihepatite). Acredita-se que nenhuma das mortes estava relacionada à infecção por *Salmonella enterica* sorotipo Heidelberg, e que a causa mais provável de contaminação foi vertical pela *E. coli*.

Segundo Ito et al. (2007) a contaminação do ovo pela *E. coli* pode acontecer durante a ovoposição se estendendo até a fase de incubação, culminando na infecção do pinto e desenvolvimento do quadro de colibacilose.

Segundo Mellata et al. (2003) *E. coli* nas aves causam doenças extraintestinais que podem ocasionar aerossaculite, pericardite, perihepatite, salpingite, onfalite, peritonite e até a morte.

11 CONCLUSÃO

O protocolo de ácidos orgânicos e probiótico utilizado no tratamento 2 mostrou-se uma ferramenta eficaz na redução da contagem de *Salmonella enterica* Heidelberg em frangos de corte aos 28 dias de idade, apresentando diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparado ao controle positivo e ao tratamento 1.

Os tratamentos 2 e 4 reduziram a quantidade de aves contaminadas por *S. enterica* Heidelberg aos 28 dias de idade..

Neste estudo não foram observados diferenças significativas ($p > 0,05$) no peso médio das aves, no ganho de peso diário e na conversão alimentar, entre os diferentes tratamentos.

REFERÊNCIAS

ALVAREZ-OLMOS, M. I.; OBERHELMAN, R. A. Probiotic agents and infectious diseases: A modern perspective on a traditional therapy, **Clinical Infectious Diseases**, v. 32, n. 11, p. 1567-1576, 2001.

ANDREATTI FILHO, R.L.; SILVA, E.N.; CURI, P.R. Ácidos orgânicos e microbiota cecal anaeróbia no controle da infecção experimental de frangos por *Salmonella* Typhimurium e *Salmonella* Enteritidis. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 49, p. 661–72, 1997.

BARROW, P. A. *Salmonella* infections: immune and non-immune protection with vaccines, **Avian Pathology**, v. 36, n. 1, p.1-13, 2007.

BAX System® PCR assay with automated detection for bacterial screening. Manual do usuário. Wilmington, DE.: DuPont Qualicon, 2003.

BLODGETT, R. FDA Bacteriological Analytical Manual Online, Appendix 2, Most Probable Number Determination from Serial Dilutions, 2006.

BORSOI, A., et al. Inoculation of newly hatched broiler chicks with two Brazilian isolates of *Salmonella* Heidelberg strains with different virulence gene profiles, antimicrobial resistance, and pulsed field gel electrophoresis patterns to intestinal changes evaluation. **Poultry Science**, v. 88, p. 750-758, 2009.

BRASIL. Instrução Normativa nº41, de 7 de junho de 2004. Validação da metodologia utilizada pelo sistema de detecção patogênica para alimentos e amostras ambientais – A-BAX® para detecção de *Salmonella* spp. em amostras de alimentos, água e amostras ambientais (swab), como método alternativo equivalente ao método de referência do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Diário Oficial da União, Brasília DF, n. 113, 15 jun. 2004. Seção 1, p.3-6.

BUCHER, O. et al. Occurrence and characterization of *Salmonella* from chicken nuggets, strips, and pelleted broiler feed. **Journal of Food Protection**, v. 70, n. 10, p. 2251-2258, 2007.

BYRD, J.A., et al. Effect of lactic acid administration in the drinking water during preslaughter feed withdrawal on *Salmonella* and *Campylobacter* contamination of broilers. **Poultry Science**, v. 80, p. 278-83, 2001.

CASTANON, J. History of the use of antibiotic as growth promoters in European poultry feeds, **Poultry Science**, v. 86, n. 11, p. 2466-2471, 2007.

CHITTICK, P., et al. A summary of national reports of foodborne outbreaks of *Salmonella* Heidelberg infections in the United States: Clues for disease prevention. **Journal of Food Protection**, v. 69, p. 1150-1153, 2006.

COLLA F.L., et al. Avaliação *in vitro* de clorexidina, amônia quaternária e ácido peracético frente a amostras de *Salmonella* Heidelberg isoladas de abatedouro avícola em 2005 e 2009. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 4, p. 289-292, 2012.

CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA VETERINÁRIA (CFMV). RESOLUÇÃO Nº 1000, DE 11 DE MAIO DE 2012. Disponível em: <http://www.fcav.unesp.br/Home/Comissoes/ceua/resolucao-cfmv-n-1000-2012.pdf>. Acesso em 01 de julho de 2015.

DICKEL, E.L. **Utilização da técnica microbiológica convencional, reação em cadeia pela polimerase (PCR) e ensaio imunoenzimático (ELISA) no monitoramento de *Salmonella* em carcaças de frango para o controle higiênico sanitário do processo de abate.**2004. 137f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

DOMINGUEZ-BELLO, M.G.; BLASER, M. J. Do you have a probiotic in your future? **Microbes and Infection**, v. 10, n. 9, p. 1072-1076, 2008.

DUTIL, L., et al. Ceftiofur resistance in *Salmonella enterica* serovar Heidelberg from chicken meat and humans, Canada. **Emerging Infection Diseases**, v. 16, p. 48-54, 2010.

ELGROUD, R., et al. Characteristics of *Salmonella* contamination of broilers and slaughterhouses in the region of Constantine (Algeria). **Zoonoses Public Health**, v. 56, p. 84-93, 2009.

FUNK, J.A. et al. Longitudinal study of *Salmonella enterica* in growing pigs reared in multiple-site swine production systems. **Veterinary Microbiology**, v. 83, p.45-60, 2001

GAST, R.; GUARD-BOULDIN, J.; HOLT P.S. The relationship between the duration of fecal shedding and the production of contaminated eggs by laying hens infected with strains of *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Heidelberg. **Avian Disease**, v. 49, p. 382-386, 2005.

HAYES, J.R.; CARR, L.E.; MALLINSON, E.T.; DOUGLASS, L.W.; JOSEPH, S.W. Characterization of the contribution of water activity and moisture content to the population distribution of *Salmonella* spp in commercial poultry houses. **Poultry Science**, v.79, p.1557-1561, 2000.

HIGGINS, J.P., et al. Temporal Effects of Lactic Acid Bacteria Probiotic Culture on *Salmonella* in neonatal Broilers. **Poultry Science**, v. 86: In press, 2007.

HIGGINS, J. P.; HIGGINS S. E.; WOLFENDEN, A. D.; HENDERSON, S. N.; TORRES-RODRIGUEZ, A.; VICENTE, J. L.; HARGIS, B. M.; TELLEZ G. Effect of lactic acid bacteria probiotic culture treatment timing on *Salmonella* Enteritidis in neonatal broilers. **Poultry Science**, v. 89, p. 243-247, 2010.

HOFER, E.; SILVA FILHO, S.J.; REIS E.M.F. Prevalência de sorovares de *Salmonella* isolados de aves no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.17, n.2, p.55-62,1997.

ITO, N.M.K. et al. **Diagnóstico diferencial das enfermidades bacterianas, fúngicas e parasitárias que acometem os frangos de corte**. Cascavel, PR: Coluna do Saber, 2007. 160p.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO). **ISO 6579** – Annex D. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp, 2002. AMENDMENT 1: Annex D: Detection of *Salmonella* spp: in animal faeces and in environmental samples from the primary production stage, 4 th ed. 2007.

JARQUIN, R.L., et al. The Evaluation of Organic Acids and Probiotic Cultures to Reduce *Salmonella* Enteritidis Horizontal Transmission and Crop Infection in Broiler Chickens. **International Journal of Poultry Science**, v.6, p. 182-186, 2007.

KUANA, S. L. Limpeza e desinfecção de instalações avícolas. In: JÚNIOR, A. B.; SILVA, E. N.; FÁBIO, J. DI.; SESTI, L.; ZUANAZE, M. A. A. **Doenças das aves**. 2ª ed. Campinas: Facta, 2009. 1.104 p.

MATTAR, A.; DANIEL, H.; DRONGAWSKI, R.; WONGYI, F.; HARMON, C.; CORAN, A. Probiotics up-regulate MUC-2 mucin gene expression in a Caco-2 cell-culture model. **Pediatric Surgery International**, v. 18, n. 7, p. 586-590, 2002.

MELLATA, M., et al. Role of virulence factors resistance of avian pathogenic *Escherichia coli* to serum and in pathogenicity. *Infection and Immunity*, v. 71, n. 1, p. 536-540, 2003.

MENCONI, A., et al. Effect of lactic acid bacteria probiotic culture for the treatment of *Salmonella enterica* serovar Heidelberg in neonatal broiler chickens and turkey poults. **Poultry Science**, v. 90, p. 561-565, 2011.

MIRAGLIOTTA, M.Y. **Avaliação das condições do ambiente interno em dois galpões de produção comercial de frangos de corte, com ventilação e densidade populacional diferenciados**. 2005. 244f. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola, na área de concentração de Construções Rurais e Ambiente). Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, 2005.

OLIVEIRA-SEQUEIRA, T.C. G., MELO, C. & GOMES, M.I.T.V. Potencial bioterapêutico dos probióticos nas parasitoses intestinais. **Ciência Rural**, v. 38, n., p. 2670-2679, Nov. 2008

PATTERSON J.A.; BURKHOLDER K.M. Application of prebiotics and probiotics in poultry production. **Poultry Science**, v. 82, p. 627–631, 2003.

PICKLER, Larissa et al. Avaliação microbiológica, histológica e imunológica de frangos de corte desafiados com *Salmonella* Enteritidis e Minnesota e tratados com ácidos orgânicos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 32, n. 1, p. 27-36, Jan. 2012.

ROCHA, A. P.; ABREU, R. D.; COSTA, M. C. M.; OLIVEIRA, G. J. C.; ALBINATI, R. C. B.; PAZ, A. S.; QUEIROZ, L. G.; PEDREIRA, T. M. Prebióticos, ácidos orgânicos e probióticos em rações para frangos de corte. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v. 11, n. 3, p. 793-801, 2010.

SANTOS, G. R. J. **Probióticos e simbiótico sobre desempenho zootécnico e morfometria intestinal de frangos desafiados com *Salmonella* Enteritidis**. 2013. 86f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, 2013.

SCHNEITZ, C. Automated droplet application of a competitive exclusion preparation. **Poultry Science**, v.71, p.2125–8, 1992.

SILVA, E.N. *Salmonella* Enteritidis em aves e saúde pública. **Higiene Alimentar**, v.9, p. 9-12, 1998.

STAVRIC, S. Defined cultures and prospects. **International Journal of Food Microbiology**, v. 15, p. 245–63, 1992.

TELLEZ, G. et al. Digestive physiology and the role of microorganisms. **The Journal of Applied Poultry Research**, v. 15, p. 136-144, 2006.

TELLEZ, G.; PIXLEY, C.; WOLFENDEN, R. E.; LAYTON, S. L.; HARGIS, B. M. Probiotics/direct fed microbials for *Salmonella* control in poultry. **Food Research International**, v. 45, p. 628 – 633, 2012.

TELLEZ, G. et al. Effect of organic acids on *Salmonella* Typhimurium infection in Broiler Chickens. **International Journal of Poultry Science**, Pakistan, v. 12, n. 2, p. 72-75, 2013.

VAN IMMERSEEL, F. et al. Vaccination and early protection against non-host-specific *Salmonella* serotypes in poultry: exploitation of innate immunity and microbial activity. **Epidemiology and Infection**, v. 133, n.6, p. 959–978, 2005.

WALES, A. D., et al. Longitudinal survey of the occurrence of *Salmonella* in pigs and the environment of nucleus breeder and multiplier pig herds in England. **Veterinary Record**, 165:648–657, 2009.

WOLFENDEN, A.D. et al. Effect of organic acids and probiotics on *Salmonella* Enteritidis infection in broiler chickens. **International Journal of Poultry Science**, v. 6, p. 403-405, 2007.

ZAIDI, M. B., et al. Integrated food chain surveillance system for *Salmonella* spp. in Mexico. **Emerging Infection Diseases**, v. 14, p.429-435, 2008.

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.

ZHAO, S., et al. Antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* serovar Heidelberg isolates from retail meats, including poultry, from 2002 to 2006. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 21, p. 6656-6662, 2008.