

Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Centro de Ciências Rurais
Programa de Residência em Área Profissional da Saúde
Medicina Veterinária Preventiva

**EFEITO DE PROBIÓTICO A BASE DE *B. SUBTILIS* E
B. CEREUS SOBRE A CAMA DE FRANGOS
DESAFIADOS COM *SALMONELLA ENTERITIDIS***

MONOGRAFIA DO PROGRAMA DE RESIDÊNCIA

Maria Amélia Agnes Weiller

Santa Maria, RS, Brasil

2014

**EFEITO DE PROBIÓTICO A BASE DE B. SUBTILIS E B.
CEREUS SOBRE A CAMA DE FRANGOS DESAFIADOS COM
SALMONELLA ENTERITIDIS**

Maria Amélia Agnes Weiller

Trabalho de conclusão de Residência em Medicina Veterinária para obtenção do
título de Especialista em Medicina Veterinária Preventiva pela Universidade
Federal de Santa Maria

Orientadora: Dra. Maristela Lovato

Santa Maria, RS, Brasil

2014

Universidade Federal de Santa Maria

Centro de Ciência da Saúde

Centro de Ciências Rurais
Programa de Residência em Área Profissional da Saúde – Medicina
Veterinária/ Medicina Veterinária Preventiva
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Monografia de Programa
de Residência

EFEITO DE PROBIÓTICO A BASE DE B. SUBTILIS E B. CEREUS SOBRE
A CAMA DE FRANGOS DESAFIADOS COM SALMONELLA
ENTERITIDIS

elaborada por

Maria Amélia Agnes Weiller

Como requisito parcial para obtenção do grau de
Especialista em Medicina Veterinária Preventiva

Comissão Examinadora:

Maristela Lovato, Dra. (Presidente/Orientadora)

Paulo Dilkin, Dr. (UFSM)

Luis Antonio Sangioni, Dr. (UFSM)

Santa Maria, 13 de março de 2014.

AGRADECIMENTOS

À minha família, em especial à minha mãe que sempre me apoiou e, nas horas difíceis, sempre me deu forças para não esmorecer;

À minha orientadora, professora Maristela Lovato, pelos ensinamentos durante este período, pela acolhida, e por sempre ter me tratado como uma filha;

Aos professores Luis Sangioni e Sonia Botton pelas conversas e ensinamentos;

Ao professor Carlos Mallmann e ao professor Paulo Dilkin por terem me recebido no laboratório de uma maneira bastante carinhosa;

À toda a equipe do LCDPA pelo companheirismo e amizade firmados durante este período;

À equipe Lamic pela amizade e pelos dias alegres. Sem eles certamente o fardo seria mais pesado. Também levarei cada um com muito carinho!

À Maria José pelos conselhos e conversas;

À “tia Medi” pelo carinho, pelo bom dia gostoso de cada manhã;

Às minhas irmãs-amigas Joice e Liane pelo apoio incondicional, pelas conversas jogadas fora, pelas comilanças, pelos choros...

À Michele pelo carinho, compreensão, pela força, e pelo ombro que muitas vezes me concedeste para chorar;

E a todos que de certa forma cruzaram no meu caminho neste período...

...o meu muito obrigada!

RESUMO

Monografia de Programa de Residência Programa de Residência em Área Profissional da Saúde - Medicina Veterinária/ Medicina Veterinária Preventiva
Universidade Federal de Santa Maria

EFEITO DE PROBIÓTICO A BASE DE *B. SUBTILIS* E *B. CEREUS* SOBRE A CAMA DE FRANGOS DESAFIADOS COM SALMONELLA

AUTORA: MARIA AMÉLIA AGNES WEILLER

ORIENTADORA: MARISTELA LOVATO

Santa Maria, 14 de março de 2014

A alta frequência de bactérias potencialmente patogênicas para animais e humanos presentes em produtos de origem animal, assim como o aumento da resistência aos antimicrobianos, levaram a questionar o uso indiscriminado destes como aditivos em rações. Neste contexto, os probióticos surgem como alternativa de substituição ao uso dos promotores, o qual não determinam resíduos nos produtos de origem animal e não desenvolvem resistência às drogas antimicrobianas. Probióticos são definidos como microrganismos vivos que, quando administrados adequadamente, conferem benefícios à saúde do hospedeiro. Assim, objetivou-se determinar os benefícios do uso de um probiótico comercial a base de *Bacillus subtilis* e *Bacillus cereus* que proporciona à cama de frangos, quando incluídos na dieta de aves infectadas artificialmente com *Salmonella* Enteritidis (SE). Para isto utilizaram-se 100 frangos de corte, Coob®, alimentados com ração comercial, acrescida de probiótico, associado ou não ao promotor de crescimento e distribuídos em quatro tratamentos (G1- ração comercial com promotores de crescimento, com adição de probiótico e com inoculação de SE; G2- ração comercial sem promotores de crescimento, com adição de probiótico e com inoculação de SE; G3 – ração comercial com promotor de crescimento, sem a adição de probiótico e com inoculação de SE; e G4 – ração comercial com promotor de crescimento, sem a adição de probiótico e sem a inoculação de SE). Realizou-se *pool* da cama, de cada grupo, para a avaliação semanal dos valores de pH, umidade e contagem de enterobactérias e bactérias totais. Sugere-se que a adição do probiótico a base de *B. subtilis* e *B. cereus* na alimentação das aves possa ser benéfica no controle da contaminação bacteriana da cama uma vez que reduziu as contagens de enterobactérias. Também que foi efetiva no controle da umidade.

Palavras-chave: Enterobacteria, microbiologia, sanidade avícola

ABSTRACT

Monografia de Programa de Residência Programa de Residência em Área
Profissional da Saúde - Medicina Veterinária/ Medicina Veterinária Preventiva
Universidade Federal de Santa Maria

Effect of the use of *Bacillus subtilis* and *Bacillus cereus* on chicken litters challenged with *Salmonella* Enteritidis.

AUTHOR: Maria Amélia Agnes Weiller

ADVISER: Maristela Lovato

Santa Maria, March 14th, 2014.

The high frequency of bacteria potentially pathogenic to animals and humans in products of animal origin, as well as increased resistance to antimicrobial agents, led to question the indiscriminate use of antibiotics as additives in animal feed. Among the alternatives that have been studied, probiotics appear as the most promising one. Probiotics are defined as live microorganisms that, when administered properly, confer a health benefit to the host. The aim of this work was to determine the benefits of using a probiotic based on *Bacillus subtilis* and *Bacillus cereus* on chicken litter, when included in the diet of artificially infected birds with *Salmonella* Enteritidis (SE). For this we used 100 broilers coob® fed commercial diet plus probiotic, associated or not with growth promoter and assigned to four treatments (G1 – with growth promoters, with added probiotic and inoculation SE; G2 – without growth promoters, with added probiotic and inoculated with SE; G3 – with growth promoter without the addition of probiotic and inoculated with SE, and G4 – with promoter growth without the addition of probiotic for inoculation and without SE). We conducted a pool of chicken litter each group for weekly review of pH values, calculation of moisture and total count of bacteria and enterobacteria. It is suggested then that the addition of probiotic of *B. subtilis* and *B. cereus* in poultry feed may be beneficial in the control of bacterial contamination of the chicken litter.

Key words: Enterobacteria, microbiology, avian health.

LISTAS DE TABELAS e FIGURAS

Tabela 1. Quantificação do pH e umidade das camas de frangos de acordo com os grupos tratamentos durante as 6 semanas de alojamento.....	35
Tabela 2. Contagem de enterobactérias e bactérias totais presentes nas camas de frango de acordo com os grupos tratamentos.....	36
Figura 1. Perfil de contagem de bactérias totais e de enterobactérias.....	37

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	09
2 REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1 Probióticos.....	11
2.2 Caracterização do gênero <i>Salmonella</i>	14
2.3 Características epidemiológicas da <i>Salmonella</i>	14
2.4 <i>Salmonella sp</i> na cadeia produtiva do frango de corte e riscos para a saúde pública	15
3 FATORES QUE INFLUENCIAM A CONTAMINAÇÃO DA CAMA DE FRANGO.....	18
3.1 Umidade.....	18
3.2 Densidade de alojamento.....	19
3.4 pH.....	19
4 MICROBIOLOGIA DA CAMA.....	20
4.1 Quantificação de enterobactéria.....	21
4.2 Quantificação de bactérias totais.....	22
5 CAPÍTULO 1- EFEITO DO USO DO PROBIÓTICO PAST-TR PÓ ORAL SOBRE A CAMA DE FRANGOS DESAFIADOS COM <i>SALMONELLA</i> ENTERITIDIS	
RESUMO.....	25
ABSTRACT.....	26
INTRODUÇÃO	26
MATERIAIS E MÉTODO.....	28
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
CONCLUSÃO	32
BIBLIOGRAFIA	33
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	39
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

1. INTRODUÇÃO

As exportações brasileiras da carne de frango somaram 3,91 milhões de toneladas em 2013, gerando uma receita cambial de mais de meio bilhão de dólares. O desempenho por segmentos totalizaram exportações de 2,13 milhão de toneladas de cortes de frango (54,71%), 1,41 milhão de toneladas do frango inteiro (36,18%) e 179 mil toneladas de produtos industrializados (4,60%), demonstrando a importância deste setor para a economia brasileira (UBABEF, 2014). Porém, para garantir essa produtividade anual, é necessário um crescimento racional que vise, sobretudo, assegurar a qualidade através do controle de enfermidades que causam, além de prejuízos econômicos, transtornos à saúde pública. As medidas gerais de profilaxia e as normas de biossegurança empregadas na avicultura industrial dificultam, mas não impedem a presença de microrganismos patogênicos e, entre os patógenos veiculados na avicultura, destacam-se os do gênero *Salmonella* (SILVA, 2000).

Bactérias do gênero *Salmonella* são isoladas em todo o mundo, no entanto, em áreas de criação animal intensiva, principalmente de suínos e aves, os relatos são ainda mais frequentes (OIE, 2010). Na produção, existem inúmeros fatores que podem contribuir para a maior prevalência de *Salmonella* spp., como a falta de programas de higienização nas granjas, a presença de pragas nos locais de criação, a contaminação de rações e água de abastecimento, o uso de antibióticos de amplo espectro como promotores de crescimento e a presença de animais portadores da bactéria. A etapa de criação, portanto, pode ser epidemiologicamente muito importante na disseminação do agente e, conseqüentemente, dar origem a um produto contaminado (SANTOS, 2000).

Além de ser um importante patógeno responsável por doenças em animais, a *Salmonella* também é conhecida por acometer a saúde do homem, sendo uma das principais causas de gastroenterite veiculada por alimentos em todo o mundo, e um importante problema de saúde pública, tanto em países industrializados como naqueles em desenvolvimento (BERCHIERI, 2009).

Diversos países possuem programas de controle para prevenir a salmonelose, e estes incluem estudos para determinação da prevalência do microrganismo, seus sorovares e biótipos, como formas de subsídio às medidas de controle nos lotes e na garantia da qualidade dos produtos oferecidos nos mercados consumidores interno e externo (EFSA, 2008).

O aumento no uso indiscriminado de antibióticos inseridos no processo de produção de alimentos de origem animal tem sido cada vez mais questionado, pois pode funcionar como pressão de seleção para alguns sorovares de *Salmonella* e para a resistência desses aos antimicrobianos. CHEE-SANFORD et al. (2009) citam que aproximadamente 75% desses produtos não são absorvidos pelos animais e seriam eliminados pelas fezes e, quando a cama de aviário é utilizada como fertilizante, os antimicrobianos e seus metabólitos podem causar impactos adversos nos ecossistemas (WOLLENBERGER et al., 2002). Segundo MANAGAKI et al. (2007) antimicrobianos utilizados na produção avícola já foram detectados no solo, água, sedimentos e plantas.

A Comunidade Européia, em junho de 1999, banuiu o uso de alguns antibióticos promotores de crescimento na alimentação de aves em função do surgimento de resistência antimicrobiana a várias drogas usadas em terapia na medicina humana. No Brasil, a Secretaria de Saúde e o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) tem se manifestado contra a utilização indiscriminada de promotores de crescimento na alimentação animal, e busca proibir de forma crescente o seu uso.

Tendo em vista a importância da carne de frango e derivados na veiculação de *Salmonella* spp. aos humanos, e os crescentes índices de resistência bacteriana em função da utilização de antibióticos na alimentação destes animais, a busca por alternativas ao uso destas substâncias torna-se imprescindível, e o uso de probiótico tem se mostrado promissor.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Probióticos

Diversos são os conceitos encontrados na literatura para a descrição de um probiótico. Para KAUR et al. (2002), probióticos são suplementos alimentares compostos de microrganismos vivos que beneficiam a saúde do hospedeiro através do equilíbrio da microbiota intestinal. SALMINEN et al. (1999) os definem como preparados de microrganismos, ou seus componentes, que têm um efeito benéfico sobre a saúde e o bem estar do hospedeiro. SCHREZENMEIR & DE VRESE (2001) consideraram que o termo deveria ser utilizado para designar preparações ou produtos que contenham microrganismos viáveis definidos e em quantidade adequada para alterarem a microbiota própria das mucosas por colonização de um sistema do hospedeiro, produzindo efeitos benéficos em sua saúde.

A FAO (2002) define probiótico como microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades suficientes, conferem benefícios à saúde do hospedeiro. Porém, todos os autores concordam que, independentemente do conceito utilizado, os probióticos trazem benefícios à saúde do hospedeiro, não deixando resíduos nos produtos de origem animal e não favorecendo resistência às drogas, o que os faz candidatos preferenciais para substituir os antimicrobianos como aditivos alimentares.

Os probióticos vêm sendo utilizados, há anos, na alimentação humana, tanto com finalidade profilática como terapêutica. Elie Metchnikoff, biólogo russo que trabalhou no instituto Pasteur em meados de 1900 estudou sobre a misteriosa expectativa de vida dos integrantes de uma comunidade na Bulgária, e relatou que a expectativa acima de 115 anos ou mais estava relacionada ao consumo de produtos fermentados do leite os quais continham um microrganismo o qual denominou *Bacillus bulgaricus*. Este organismo passou a ser utilizado para o tratamento de desordens intestinais em humanos (BRON et al., 2012).

Embora existam vários estudos que mostram seus benefícios como aditivos na alimentação animal, ainda há certa resistência por parte do setor industrial avícola em sua utilização. Alguns gêneros de bactérias intestinais, como o *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* já foram diretamente relacionados ao estímulo da resposta imune por aumento da produção de anticorpos, ativação de macrófagos, proliferação de células T e produção de interferon, entre outros (FLEMMING, 2005). No entanto, trabalhos relacionados ao desempenho zootécnico

dos animais, ainda discordam bastante quanto aos resultados, onde alguns autores não observaram diferenças no desempenho dos animais e outros observaram melhorias no ganho de peso e conversão alimentar (FLEMMING & FREITAS, 2005). Os trabalhos divergem em função da não padronização da espécie de bactérias e da quantidade utilizadas, havendo também diferenças quanto ao alojamento dos animais testados e os desafios das aves.

Sabe-se que tanto os homens quanto os animais nascem com o trato digestivo estéril. Porém, logo após o nascimento, uma grande diversidade de microrganismos inicia a colonização do trato digestivo, e a concentração destes varia ao longo de todo seu comprimento. Geralmente os primeiros gêneros e espécies bacterianas que colonizam o trato intestinal persistem ao longo da vida do hospedeiro, passando a compor a microbiota intestinal. No hospedeiro, essas bactérias devem encontrar as condições propícias para a colonização e persistência, como temperatura e pH adequados, e oferta de nutrientes, entre outras (MILES, 1993). Entre os principais gêneros bacterianos que são identificados na microbiota cecal de aves, observam-se invariavelmente a presença da *Bacillus*, *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Eubacterium*, *Fusobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Peptostreptococcus*, *Propionibacterium*, *Ruminococcus*, *Serratia*, *Veillonella* e *Streptococcus*, entre outros (GUSILS et al., 1999).

As bactérias que habitam o trato intestinal podem estabelecer-se de duas formas: em íntima associação com o epitélio intestinal ou livre na luz intestinal, mas multiplicando-se mais rapidamente do que sua eliminação pelo peristaltismo intestinal. Outras espécies bacterianas não apresentam capacidade de aderir ao epitélio intestinal, tão pouco se multiplicam em tempo que compense a eliminação pelo peristaltismo, mas permanecem no intestino agregando-se a outras bactérias que por sua vez, estão aderidas à mucosa entérica (GUSILS et al., 1999).

O trato digestivo das aves é habitado por uma microbiota que tem sua formação iniciada imediatamente após o nascimento, constituindo importante barreira contra a colonização de microrganismos potencialmente patogênicos como *Salmonella* spp. A susceptibilidade das aves à colonização intestinal por esta bactéria é maior durante os primeiros dias de vida, sendo, posteriormente, reduzida à medida que há o desenvolvimento da microbiota intestinal normal. Esta microbiota intestinal aumenta consideravelmente

durante as primeiras semanas de vida, até se tomar uma população predominantemente de bactérias anaeróbias (SALANITRO et al., 1978).

Os mecanismos de ação dos probióticos não estão inteiramente elucidados. Especula-se que um ou mais processos, associados ou não, alterariam a atividade e a composição bacteriana intestinal. O equilíbrio entre os diferentes componentes da microbiota intestinal parece ser fundamental para o funcionamento normal e saudável da função digestiva e geral do hospedeiro (FLEMMING, 2005)).

A alta lotação de alojamento e o constante estresse, a que estão expostas as aves em condições normais de criação, invariavelmente, podem alterar esse equilíbrio intestinal e predispor as aves a diversas infecções, além de reduzir os índices de produtividade. Trabalhos pioneiros sugerem que possa haver competição entre bactérias benéficas e bactérias patogênicas, pelos sítios de ligação. O bloqueio dos sítios de ligação (receptores) na mucosa entérica pelas bactérias intestinais pode reduzir a área de interação nos cecos pelas bactérias patogênicas, como por exemplo, a *Salmonella* spp..

JIN et al. (1997) concluíram que a ocupação física dos sítios intestinais pela microbiota normal, especialmente *Lactobacillus* spp., poderia ser mais importante que outros fatores propostos como a exclusão competitiva (EC). Outros trabalhos confirmaram que a colonização intestinal por grande quantidade de bactérias pertencentes à microbiota intestinal normal, especialmente *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp., formando uma barreira física às bactérias patogênicas pelo preenchimento dos sítios de ligação, respaldaria a teoria de que esse mecanismo possa ser fator primário à EC (JIN et al., 1997, LAVERMICOCCA et al., 2005).

Diversos autores propõe que os probióticos podem produzir e liberar compostos como as bacteriocinas, ácidos orgânicos e peróxido de hidrogênio, que teriam ação antibacteriana especialmente em relação às bactérias patogênicas. As bacteriocinas apresentam atividade inibitória tanto para bactérias Gram negativas quanto para Gram positivas como *Salmonella* spp., *E. coli* e *Staphylococcus* spp., ressaltando a importância da presença de espécies de *Lactobacillus* produtoras de bacteriocinas na composição dos probióticos (JIN et al., 1997).

Aparentemente a ação bacteriostática dos ácidos graxos é dependente do pH, pois quanto maior a redução desse, maior a quantidade de ácido e, conseqüentemente, efeito antibacteriano mais intenso (JIN et al, 1997). Os autores salientam que não podemos

desvincular a presença destas substâncias antibacterianas e sua associação a exclusão competitiva, por exemplo.

Além das duas propostas já citadas, os probióticos podem agir via competição por nutrientes, onde há supressão do crescimento das bactérias intestinais, devido à carência nutricional, em detrimento de outras. Também, eles são capazes de estimular o sistema imune, o qual está diretamente relacionado com a microbiota intestinal (TANNOCK, 1999). Entretanto, o verdadeiro mecanismo, pelo qual essas bactérias estimulam o sistema imune, ainda permanece com muitos pontos obscuros.

2.2 Caracterização do gênero *Salmonella*

O gênero *Salmonella* pertence à família Enterobacteriaceae e é constituído pelas espécies *S. entérica* e *S. bongori*, sendo a primeira dividida em seis subespécies: enterica, salamae, arizonae, diarizonae, houtenae e indica. Cada subespécie ainda é subdividida em função de seu perfil antigênico. A espécie *S. bongori* agrupa 22 sorotipos e as subespécies de *S. entérica* agrupam mais de 2400 sorotipos (POPOFF et al., 2004).

Salmonelas são bacilos Gram negativos, aeróbios e anaeróbios facultativos, não formadores de esporos, catalase positiva e oxidase negativa, produzem ácidos e fermentam glicose, reduzem nitrato a nitrito e não produzem citocromo oxidase. Podem ser móveis ou não, sendo que a maioria possui flagelos peritríquios (LOUREIRO et al., 2010). São bactérias relativamente resistentes ao calor e substâncias químicas, porém não sobrevivem à temperatura de 55 °C em 1 hora ou em 60 °C de 15 a 20 minutos (LOUREIRO et al., 2010). Ainda, segundo o mesmo autor, são mesófilas, com temperatura de crescimento ótimo entre 35 e 37 °C e possuem a forma de bacilos pequenos medindo 0,7 a 1,5 por 2,0 a 5,0 micra. A maioria dos sorotipos é produtora de gás, H₂S, lisina e ornitina descarboxilase positiva, mas negativas para urease e indol.

2.2 Características epidemiológicas da *Salmonella*

Esta bactéria está amplamente difundida na natureza, principalmente onde existe uma alta densidade avícola. São capazes de infectar uma grande variedade de animais, podendo ser encontrada no trato gastrointestinal de mamíferos, répteis, sendo as aves um dos mais

importantes reservatórios capazes de introduzir a salmonela na cadeia alimentar do homem (TESSARI, 2008). Alguns sorovares têm seu hábitat limitado, sendo denominados hospedeiros específicos, como os sorovares *Typhi* e *Paratyphi* para seres humanos, *Abortusovis* para ovelhas, *Gallinarum* e *Pullorum* para aves e *Choleraesuis* para suínos (LOUREIRO et al., 2010).

As salmonelas paratíficas são as de maior interesse em saúde animal e saúde pública uma vez que não são espécie-específicas. Tanto a *Salmonella* específica das aves, quanto as paratíficas, podem causar problemas na produção, resultando em índices zootécnicos baixos, ocasionando perdas e prejudicando a comercialização dos produtos de origem avícola no mercado interno e externo (BERCHIERI JR., 2009).

A transmissão de *Salmonella* pode ocorrer de diversas formas e, portanto, sua epidemiologia é bastante complexa, sendo difícil determinar como um lote foi infectado ou como ocorre a disseminação bacteriana no plantel. Acredita-se que a *Salmonella* Enteritidis (SE) é transmitida verticalmente de ovários e ovidutos infectados para os ovos de frangas de postura. Outra via proposta é a penetração da bactéria através da casca do ovo pelas fezes das aves depositadas quando o ovo passa pela cloaca (PLYM, 2006). Uma vez que a SE atinge uma ave, é facilmente disseminada através das fezes (PLYM, 2006), e permanece no meio ambiente. Assim, aves comerciais podem ser infectadas por toda vida (DAVIES, 2002).

2.3 *Salmonella* sp na cadeia produtiva do frango de corte e riscos para a saúde pública

Os animais destinados à produção de carnes para consumo humano podem atuar como hospedeiros assintomáticos de patógenos entéricos importantes que representam risco de infecção para o homem, tornando o seu controle, redução ou eliminação completa um desafio para a indústria (DORMEDY et al., 2000).

Na produção industrial de frango de corte existem inúmeros fatores que contribuem para uma maior prevalência de *Salmonella*. Associações significativas foram encontradas entre o nível de infecção de frangos de corte e a higienização do aviário, ração, água, animais e materiais amostrados no ambiente. Autores citaram que os principais fatores de risco associados com a contaminação nas criações de frangos são a alta densidade de animais, taxa

de mortalidade, tipo de terreno e o acesso de outros animais ao ambiente de criação (DAI PRÁ, 2011).

As aves infectadas podem excretar 10^8 células da bactéria por grama de fezes, podendo infectar um lote de aves e alcançar lotes vizinhos sem que os animais apresentem nenhum sintoma da doença (PEREIRA et al., 1999). No abate, a contaminação fecal das carcaças durante o processo é inevitável, e o grau de contaminação depende das técnicas de abate aplicadas e manipulação das carcaças (CARDINALE et al., 2004). ARSENAULT et al. (2007) estudaram a incidência e os fatores de risco associados à *Salmonella* em 82 lotes de frangos de corte em quatro abatedouros do Canadá, onde foram analisadas 30 aves por lote. Os autores verificaram que a bactéria estava presente em 21,2% das carcaças analisadas, e que o principal fator de risco foi à presença da bactéria no intestino dos animais. Entre 1998 e 2003, WHITE et al. (2007) analisaram 47.090 amostras de carcaças de frango relacionadas com o programa americano de redução de patógenos, e destas, 5.251 (11,2%) foram positivas para *Salmonella*. Das amostras positivas, 124 (2,36%) eram *Salmonella* Enteritidis.

No Brasil, o agente também tem sido isolado em percentuais variados de produtos avícolas. TIROLI & COSTA (2006) isolaram *Salmonella* spp. em 50% das 60 amostras de carcaças de frangos analisadas, e CARVALHO & CORTEZ (2005) detectaram em 20% de 165 amostras analisadas. SANTOS et al. (2000) analisaram 150 amostras de carcaças de frangos de quatro diferentes marcas comerciais e constataram que a bactéria estava presente em 32% das amostras.

A *Salmonella* tem sido reconhecida mundialmente como um importante patógeno de origem alimentar, envolvida em muitos casos de surtos e considerada como uma das principais causas de gastroenterite humana. Em 2000, cerca de 2,1 milhões de pessoas morreram por doenças diarréicas, e uma alta proporção desses casos a causa é atribuída a alimentos e água contaminados (WHO, 2002). Em trabalho conduzido no Rio Grande do Sul, em 2000, foram analisados 99 relatórios de investigação de surtos com o objetivo de analisar a ocorrência de salmonelose transmitidas por alimentos. Dos 99 surtos ocorridos, 74,7% foram ocasionados por *Salmonella* spp. Destes, 72,2% foram associados a alimentos preparados com ovos e 11,4% a carne de frango, revelando que 83,6% dos casos tiveram alimentos oriundos da cadeia avícola envolvidos (NADVORNY, 2004). Na América Latina foram relatados 5300 surtos de enfermidades transmitidas por alimentos, entre os anos de 1995 e 2001, sendo 175 mil acometidos e causando 274 mortes. Na América do Sul 38,1%

dos surtos ocorreram no Brasil, 24,8% no Chile, 11,1% na Argentina, 8,3% no Peru, 8,2% no Uruguai, 6,3% no Paraguai e 3,2% no Equador. Porém, atenta-se que a avaliação destes dados deve ser criteriosa uma vez que os levantamentos epidemiológicos podem ser precários em alguns países, não refletindo a realidade (OIE, 2010).

Uma grande preocupação, quando se trata de Salmonelose, está relacionada à resistência bacteriana. Casos de multiresistência relacionados à *Salmonella* têm sido relatados em homens e animais, e são decorrentes do uso indiscriminado de agentes antimicrobianos (ZHAO et al., 2003). BREUIL et al. (2000), trabalharam na França com 13.397 isolados de *Salmonella* de origem animal, durante os anos de 1994 e 1997, sendo o mais prevalente a *S. Typhimurium* (41 e 35%), depois a *S. Enteritidis* (28 e 12%) e a terceira *S. Hadar* (3 e 17%), mas apenas um sorovar foi usado para verificar o perfil de resistência fenotípica, a *S. Typhimurium*, que das 163 amostras analisadas apenas 12 não foram multiresistentes a 5 ou mais drogas, e a maior resistência foi encontrada para o sorovar *S. Hadar* nos seguintes antimicrobianos: tetraciclina (91%) e ácido nalidíxico (72%). CORTEZ et al. (2006), identificaram oito sorovares de *Salmonella* das carcaças de frango resfriadas coletadas em abatedouros com Sistema de Inspeção Federal, sendo a mais prevalente a *S. Kentucky*, em segundo a *S. Enteritidis*, e dos doze antimicrobianos utilizados apenas a amicacina, ampicilina e aztreonam, obtiveram mais de 80% de resistência frente as 29 amostras isoladas dos vários estabelecimentos de abate. Novamente, a partir dos dados expostos acima, salienta-se a importância de produtos alternativos ao uso de antimicrobianos.

Em virtude da disseminação desta bactéria ocorrer frequentemente pelas fezes, é fundamental minimizar a disseminação por esta via. Relatos sugerem que alguns probióticos afetam a translocação bacteriana a partir do intestino, o que seria de grande importância para evitar as infecções de origem entérica, entre as quais as salmoneloses (PATTERSON, 2003). Assim, diversos produtos têm sido testados a fim de reduzir sua excreção. NAKAMURA et al. (2002) testando o produto comercial Aviguard®¹ concluíram que este impediu a infecção por *S. typhimurium* e *S. enteritidis*). Da mesma forma, Broilact®² impediu ou reduziu a colonização de *Campylobacter jejuni* no ceco (HAKKINEN e SCHNEITZ, 1999). Por sua vez, LINE et al. (1997) comprovaram que a levedura *Saccharomyces boulardii* reduziu a

¹ Aviguard®- Microflora Aviária- MSD Saúde Animal R. Coronel Bento Soares, 530 CEP 12730-340 Itagacaba - Cruzeiro/SP+55 12 2122-6600

² Broilact®- Imuvet Comercial Ltda- Daelcio Faria da Cunha 121, Distrito Industrial, Descalvado (13690000), São Paulo, Brasil

colonização de *Salmonella* em aves submetidas a estresse e, em trabalho posterior, que o probiótico reduziu a colonização de *Salmonella* mas não de *Campylobacter*.

3. FATORES QUE INFLUENCIAM A CONTAMINAÇÃO DA CAMA DE FRANGO

A cama de aviário, também conhecida como cama de frangos ou esterco de aviário, é o material constituído pelas dejeções e penas de galináceos, restos de rações e material orgânico absorvente da umidade usado sobre o piso do galpão (cepilho de madeira ou maravalha, palhas, cascas). Durante o ciclo de produção, as dejeções dos animais são misturadas ao material usado como substrato, e no final do ciclo, tem-se a cama de aviário que pode ser retirada ou reaproveitada no próximo lote. Diversos são os fatores que podem influenciar na qualidade microbiológica da cama.

3.1 Umidade

A umidade da cama de aves se destaca como um problema influenciado por diversos fatores tais como questões ambientais, de manejo, sanitárias e nutricionais, que possuem uma parcela de contribuição na amplitude da questão de contaminação. Na medida em que apresenta maior teor de umidade, a cama passa a influenciar diretamente as condições ambientais, especialmente no que se refere ao desafio microbiológico. Para DAI PRÁ (2011), os níveis de umidade da cama devem situar-se entre 20% e 35%. Uma cama com 22% de umidade não apresenta *Salmonella* spp., *E. coli*, *Listeria*, *Campylobacter* ou *Staphylococcus* spp. toxigênicos (FERREIRA et al., 2004). Abaixo destes teores já facilitam a incidência de poeiras em suspensão, irritando o sistema respiratório das aves, predispondo ao surgimento de infecções. Por outro lado, um excesso de umidade, acima de 35%, pode causar problemas de saúde e bem-estar nas aves, aumento da incidência de lesões no peito, queimaduras na pele, pododermatites, condenações e perda da qualidade das carcaças (BAIÃO, 1995).

A cama com alta umidade pode contribuir para um aumento dos níveis de amônia. A umidade associada com o processo de maturação da cama permite a proliferação de alguns tipos de fungos e bactérias desnitrificantes que desdobram o ácido úrico fecal através da enzima uricase, gerando subprodutos, sendo o principal deles a amônia. Embora, em níveis elevados no interior do galpão, a amônia possa causar transtornos às aves como irritação ocular, traqueíte, aerossaculite), ela é extremamente importante para o controle de algumas

populações de microrganismos, sendo que a maioria das enterobactérias e alguns vírus são sensíveis a um ambiente alcalino (DAI PRÁ, 2011).

3.2 Densidade de alojamento

Considerando o alto nível tecnológico empregado na criação de frangos de corte, assim como o alto custo das instalações aviárias, o manejo se torna um importante fator na rentabilidade da criação. Para TINÔCO et. al (2009) a densidade populacional, ou seja, número de aves alojadas por metro quadrado, é um dos fatores de manejo que se relacionam, sobretudo, com a otimização das instalações e do processo de produção de frangos de corte. No entanto, o aumento da densidade, mesmo considerando o máximo permitido pela clientela internacional, em termos de bem estar animal (14 aves/m²) pode se tornar um entrave na criação de frangos de corte, pois o excesso de animais por área pode ocasionar deterioração acelerada da cama, devido ao aumento de deposição de excretas e de umidade na mesma, com consequentes problemas no bem estar, sanidade e desempenho das aves. Tem-se hoje na avicultura nacional uma média de 14 aves/m², podendo estes valores variar em função da época do ano, valor da carne de frango, oferta de ovos.

3.3 pH

O pH é um indicador de elétrons dissociáveis podendo ser, até certo ponto, manipulado. Na cama de frango, pode ser elevado ou reduzido a níveis que dificultam a multiplicação de bactérias. Uma cama nova apresenta um pH levemente ácido, mas a partir da incorporação das fezes e o posterior desdobramento do ácido úrico em amônia, começa a ocorrer uma alcalinização gradativa (DAI PRÁ, 2010).

Dai Prá (2010) fala que após a criação do primeiro lote de frangos, a cama entra em uma fase de estabilização do pH, ao redor de 8 e 9, não havendo maiores alterações mesmo criando muitos lotes subsequentes. O mesmo autor cita que estes índices são amplamente favoráveis a multiplicação da maioria das bactérias, principalmente *Salmonella* spp. e *Campylobacter* sp.. Este mesmo autor cita que a redução do pH pode baixar a concentração de bactérias e melhorar as condições do ambiente no interior das instalações, pois a amônia somente volatiliza em condições de alcalinidade. Assim, a manutenção da acidez na cama é

benéfica para as aves, entretanto, é uma condição difícil de ser conseguida devido ao constante aporte de ácido úrico através das excretas. A acidificação do pH pode ser atingido com o uso de produtos a base de *Bacillus*, Aluminosilicatos e sílica, gesso agrícola (CaSO₄), Bissulfato de Sódio e Sulfato de Alumínio.

A elevação do pH em níveis entre 12 e 13 durante o período de vazio sanitário é bastante interessante, tanto na questão sanitária quanto na melhoria do ambiente interno do galpão. Esta condição cria um ambiente desfavorável para o desenvolvimento bacteriano, além de promover uma rápida volatilização da amônia em um período em que o galpão está aberto e sem aves no seu interior. Uma elevação no pH da cama pode ser obtido com a utilização de cal virgem ou cal hidratada, que proporcionam tais patamares com relativa facilidade e a baixo custo (DAI PRÁ, 2010).

Em relação a *Salmonella* spp., ela cresce em intervalo de pH de 4,5 a 9,0, com crescimento ótimo na faixa de 6,5 a 7,5. Geralmente, em pH abaixo de 4,0 e acima de 9,0 as salmonelas são destruídas lentamente (COSTA, 1996).

4. MICROBIOLOGIA DA CAMA

A microbiologia da cama é extremamente diversificada, em consequência do contínuo aporte de material fecal, secreções e descamações das aves durante o ciclo de criação, e também de fungos e bactérias do ambiente. Vários estudos correlacionam a sobrevivência de bactérias com a umidade e pH. Correlações entre positividade para *Salmonella* Enteritidis e variáveis físicas da cama como umidade, atividade da água (medição da água molecular livre) e pH foram observadas por OPARA et al. (1992) citados por PAGANINI (2004). Os autores observaram que quanto maior a umidade, maior a atividade de água e maior o pH, maior é a probabilidade de uma cama ser positiva para *Salmonella* Enteritidis.

A alta concentração de nutrientes, material orgânico e uma constante deposição de fezes pelos animais conferem à cama de aviário características de um substrato favorável à manutenção e desenvolvimento de uma elevada e diversificada população microbiana. Do ponto de vista da saúde pública e da preocupação pelo impacto mínimo da agricultura na qualidade ambiental, alguns desses organismos apresentam um grande interesse, pois podem contaminar o solo, os mananciais de água e infectar o homem e outros animais pelo contato

com a pele e pelo consumo de água, animais aquáticos e alimentos contaminados. Especificamente, entre os patógenos que podem ser transmitidos ao homem encontrados na cama de aviário citam-se o vírus da doença de NewCastle, *Chlamydia*, *Mycobacterium avium*, *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, vários sorotipos de *Salmonella* e *E. coli*. Estas duas últimas espécies, ambas pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, têm sido as de maior preocupação por apresentarem os maiores períodos de sobrevivência fora do organismo da ave e estarem mais frequentemente relacionadas com contaminações do solo e da água (TESSARI, 2011).

A *Salmonella* pode sobreviver por longos períodos no solo num estado viável, mas não detectável pelos métodos tradicionais de cultivo bacteriológico em laboratório. Os autores têm dúvidas se estas formas ainda são capazes de causar doenças em humanos. Em condições laboratoriais, esta bactéria resiste à temperatura de 55° C por 1 minuto, enquanto suas toxinas resistem à 60° C por 15 a 20 minutos (SILVA, 1999). Dependendo do manejo da cama, da eficiência e do período de retirada de antimicrobianos da ração, do tipo de material absorvente usado no galpão e do número de lotes criados na mesma cama, a população pode variar de zero a números bastante elevados.

A indústria avícola tem usado diversos produtos antimicrobianos, como promotores de crescimento, de forma contínua e em doses subterapêuticas na alimentação dos frangos, tendo um efeito de redução destes patógenos no trato digestivo das aves. Apesar dessa vantagem, esta prática tem selecionado inúmeros microrganismos patogênicos resistentes a estes produtos, que ao serem transmitidos ao homem e aos outros animais, provocam doenças de difícil tratamento terapêutico pela inocuidade de diversos antibióticos. Muitos dos produtos utilizados como promotores de crescimento são os mesmos antibióticos utilizados pela medicina humana. É neste aspecto que reside certamente uma das maiores preocupações da disseminação de patógenos resistentes no ambiente (VIEIRA, 2011).

4.1 Pesquisa de *Salmonella* em cama aviária

4.1.1 Quantificação de enterobactérias (Coliformes totais e coliformes termotolerantes)

As enterobactérias ou enterobacteriáceas são uma família de bacilos Gram-negativos, com muitas propriedades em comum. Embora possam ser encontradas amplamente na natureza, a maioria habita os intestinos do homem e dos animais, seja como membros da microbiota normal ou como agentes de infecção (TRABULSI, 1999). De acordo com a Instrução Normativa SDA 62 (MAPA, 2003), a Contagem de enterobactérias baseia-se na inoculação das diluições em Ágar cristal violeta vermelho neutro bile glicose (VRBG), cuja composição evidencia a habilidade dos microrganismos fermentarem a glicose com produção de ácido, reação indicada por uma viragem do indicador a vermelho e a precipitação de sais biliares ao redor das colônias.

Para tanto, coloca-se 25 gramas da amostra em 225ml de solução salina peptonada 0,1% e homogeniza-se por aproximadamente 60 segundos em “stomacher”, sendo esta a diluição 10^{-1} . A partir da diluição inicial (10^{-1}), efetua-se as demais diluições em solução salina peptonada 0,1% até 10^{-6} . Inocula-se 1mL de cada diluição selecionada em placas de Petri estéreis juntamente com cerca de 15 mL de Ágar cristal violeta vermelho neutro bile glicose (VRBG) previamente fundido e mantido a 46°C - 48°C em banho-maria. Homogeneiza-se cuidadosamente o inóculo com o meio e o mesmo permanece em repouso até total solidificação. Após completa solidificação do meio, incuba-se as placas em posição invertida em temperatura de $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 18 a 24 horas e seleciona-se as placas que contenham entre 15 e 150 colônias, conta-se as colônias de coloração vermelha, rodeadas ou não por halo de precipitação da bile presente no meio, com 0,5 a 2 mm de diâmetro e anota-se os resultados de contagem. A partir dos dados obtidos, calcula-se o número de microrganismos presentes na amostra em análise. O resultado será expresso em UFC/g.

4.1.2 Quantificação de bactérias totais

A técnica utilizada baseou-se em padrões da Anvisa (2001), para contagem de Bactérias Totais, a qual baseia-se na semeadura da amostra ou de suas diluições em Ágar padrão para contagem (PCA) seguida de incubação em temperatura de $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 48 horas. Para realização da técnica, coloca-se 25 gramas da amostra em 225mL de solução salina peptonada 0,1%, homogeniza-se por aproximadamente 60 segundos em “stomacher” sendo esta a diluição 10^{-1} . A partir da diluição inicial (10^{-1}), efetua-se as demais diluições em solução salina peptonada 0,1% até 10^{-6} .

Após semear 1mL de cada diluição selecionada em placas de Petri estéreis, devemos adicionar de 15 a 20mL de Ágar PCA fundido e mantido em banho-maria a 46 - 48°C .

Homogeneizar adequadamente o ágar com o inóculo e deixar solidificar em superfície plana. Incubar as placas invertidas a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ por 48 horas. Após, realizar a leitura selecionando as placas de acordo com o seguinte critério: contando todas as colônias presentes em placas que contenham entre 25 e 250 colônias.

5. CAPÍTULO I

Efeito de probiótico a base de *B. subtilis* e *B. cereus* sobre a cama de frangos desafiados com *Salmonella* Enteritidis

Maristela Lovato^{*}, Joice Magali Brustolin, Maria Amélia Agnes Weiller, Talieli Tavares, Ana Caroline Torres, Giovana Basso, Gustavo Henrique Schneiders, Paulo Henrique Ferronato

(Artigo submetido à revista Ciência Rural – ISSN 0103-8478 versão impressa)

Efeito de probiótico a base de *B. subtilis* e *B. cereus* sobre a cama de frangos desafiados com *Salmonella Enteritidis*

Maristela Lovato^{I*}, Joice Magali Brustolin^I, Maria Amélia Agnes Weiller^I, Talieli Tavares^I, Ana Caroline Torres^I, Giovana Basso^I, Gustavo Henrique Schneiders^I, Paulo Henrique Ferronato^I

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo determinar os benefícios que o uso de um probiótico comercial a base de *Bacillus subtilis* e *Bacillus cereus* proporciona à cama de frangos, quando incluídos na dieta de aves artificialmente infectadas com *Salmonella Enteritidis* (SE). Para isto utilizou-se 100 frangos de corte, *Coob*®, alimentados com ração comercial, acrescida de probiótico, associado ou não ao promotor de crescimento conforme tratamentos (G1- alimentados com ração comercial com promotores de crescimento, com adição de probiótico e com inoculação de SE; G2- alimentados com ração comercial sem promotores de crescimento, com adição de probiótico e com inoculação de SE; G3 – Grupo controle positivo, alimentados com ração com promotor de crescimento, sem a adição de probiótico e com inoculação de SE; e G4 – Grupo controle negativo, alimentados com ração com promotor de crescimento, sem a adição de probiótico e sem a inoculação de SE). Realizou-se um *pool* da cama de cada grupo para a avaliação semanal dos valores de pH, cálculo de umidade e contagem de enterobactérias e bactérias totais, de acordo com protocolos previstos na legislação vigente. Os resultados deste estudo sugerem que a adição do probiótico a base de *B. subtilis* e *B. cereus* à alimentação das aves possa ser benéfica no controle da contaminação bacteriana da cama, demonstrando uma diminuição na contagem de enterobactérias e um aumento na contagem total em decorrência da eliminação de bactérias benéficas produzidas pelo mesmo.

Palavras-chave: Sanidade Avícola, Salmonelose, microbiologia, pH.

ABSTRACT

The aimed of this study was to determine the benefits that the use of a probiotic based on *Bacillus subtilis* and *Bacillus cereus* provides to the poultry litter, when included in the diet of chickens artificially infected with *Salmonella* Enteritidis (SE). A hundred of Cobb broilers were used. The treatment that they receive was commercial diet plus probiotic, associated or not with growth promoter (G1-fed commercial diets with growth promoters, with added probiotics and inoculated with SE; G2-fed commercial diet without growth promoters, with added probiotics and inoculated with SE; G3 - positive control group fed diet with growth promoter without the addition of probiotic and inoculated with SE, and G4 - negative control group, fed with diets containing growth promoter without the addition of probiotic and without inoculation of SE). For all groups, we do a *pool* for assessment of pH weekly, *Enterobacteriaceae* and total bacteria counts, according to protocols provided by law. The results of this study suggest that the addition of probiotic based on *B. subtilis* and *B. cereus* on poultry feed can be beneficial to control bacterial contamination of the bed, showing a decrease in count of *Enterobacteriaceae* and an increase in bacterial total count due to the elimination of bacteria present on the comercial product.

Key words: Avian health, salmonellosis, microbiology, pH

INTRODUÇÃO

A alta frequência de bactérias potencialmente patogênicas para animais e humanos presentes em produtos de origem animal, assim como o aumento de sua resistência aos antimicrobianos, levaram a questionar o uso indiscriminado dos mesmos como aditivos em rações. ROSSA et al (2013) observaram que a resistência antimicrobiana das enterobactérias

isoladas das carcaças de frango convencional foi maior que a dos isolados dos frangos orgânicos, e que a tetraciclina foi o antimicrobiano com a maior frequência de resistência.

Considerando inevitável o banimento do uso de promotores de crescimento e objetivando a manutenção dos níveis de produtividade da moderna produção avícola, muitas pesquisas têm sido desenvolvidas em busca de alternativas ao uso destes aditivos (ROSTAGNO et al., 2003).

Probióticos podem ser definidos como sendo microrganismos vivos que, quando administradas em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2013), e que podem agir através da regulação da homeostase intestinal, expressão de bacteriocinas, indução da atividade enzimática, efeitos imunomodulatórios, entre outros (ITO, 2004).

Entre as diferentes alternativas estudadas, os probióticos aparecem como os mais promissores (PATTERSON, 2003), e merecem atenção especial como uma possível alternativa de substituição ao uso dos tradicionais promotores de crescimento, uma vez que não determinam resíduos nos produtos de origem animal e não desenvolvem resistência às drogas utilizadas em seres humanos (ANDREATTI & SAMPAIO, 2000).

Os trabalhos publicados com relação a utilização de probióticos divergem quanto aos resultados. MEURER (2010) em trabalho realizado com 1200 machos, *Coob*®, não observou diferenças no desempenho de animais com probiótico e promotor de crescimento, ou somente com probiótico e somente com promotor. Já, FLEMMING e FREITAS (2005), utilizando *Bacillus subtilis* observaram melhores resultados de *performance* em aves que utilizaram o probiótico. DA COSTA (2009) em trabalho realizado com perus não observou diferenças entre lotes tratados com probiótico e lotes não tratados. LIMA et al. (2003) sugere que a utilização de probiótico na alimentação dos animais se torna mais eficiente quando as condições ambientais e de sanidade não são as mais adequadas, ou seja, em condições de

superlotação, em condições de estresse por calor ou frio, em condições de desafio por agentes patogênicos, entre outros.

O objetivo deste trabalho foi determinar os benefícios que o uso de um probiótico comercial a base de *Bacillus subtilis* e *Bacillus cereus* proporciona à cama de frangos, quando incluídos na dieta de aves artificialmente infectadas com *Salmonella Enteritidis* (SE).

MATERIAIS E MÉTODO

O estudo foi realizado no Biotério do Laboratório Central de Diagnóstico de Patologias Aviárias (LCDPA). Utilizou-se 100 pintos comerciais *Coob*®, machos, com um dia de idade, alimentados com ração comercial acrescida de probiótico PAS-TR PROBIÓTICO - PÓ ORAL PARA AVES E SUÍNOS, composto por bactérias do gênero *Bacillus*, vivas na forma liofilizada, aeróbias, esporuladas, encapsuladas com íons Ca⁺⁺, associado ou não ao promotor de crescimento, conforme os tratamentos explicitados a seguir. No dia 2 de alojamento, foi inoculada *Salmonella Enteritidis* (SE), por via oral, na concentração de 10⁸ UFC/mL para cada ave.

As aves foram distribuídas em 4 grupos, sendo G1 – alimentados com ração comercial com promotores de crescimento (Bacitracina de Zinco), com adição de probiótico e com inoculação de SE; G2- alimentados com ração comercial sem promotores de crescimento, com adição de probiótico e com inoculação de SE; G3 – Grupo controle positivo, alimentados com ração com promotor de crescimento, sem a adição de probiótico e com inoculação de SE; e G4 – Grupo controle negativo, alimentados com ração com promotor de crescimento, sem a adição de probiótico e sem a inoculação de SE. Água e ração foram ofertadas *ad libitum*. A lotação dos animais era de 10 aves por metro quadrado, sendo os mesmo colocados em uma baia com paredes de alvenaria, mas com porta gradeada. A cama

utilizada nas baias era cama nova, de maravalha, com uma altura de 10 cm. As aves estavam alojadas em ambiente com climatizador, sendo que todo dia era aferida a temperatura do ambiente, e se necessário o mesmo era ligado ou desligado. Também, a cada dia a cama era revirada a fim de que não houvesse a formação de crostas e o ambiente se mantivesse confortável aos animais. As aves estavam sob um programa de luz crescente, controlada por timer.

Na fase final (36-42 dias), todos receberam ração comercial sem promotores de crescimento, conforme a legislação. Amostras de cama foram coletadas em 5 diferentes pontos (*pool*) das baias, anterior ao alojamento e durante as 6 semanas de alojamento para posterior análise.

Para a determinação do pH, utilizou-se 10g da amostra *in natura* diluída em 50mL de água destilada, durante 1 a 2 minutos (TEDESCO et al., 1995) com a leitura em pHmetro digital de bancada, modelo PHS-3B. Para a determinação da umidade, realizou-se a pesagem de 30g de cama, sendo posteriormente estas colocadas em estufa a 100°C, durante 24 horas (AOAC, 1996). Após, realizou-se a subtração dos pesos iniciais e finais obtendo-se o resultado em percentual.

Os *pools* das amostras de cama foram processadas para contagem de bactérias totais e de enterobactérias, e isolamento bacteriano de acordo com os protocolos previstos pela legislação vigente (BRASIL, 2003). Os resultados foram submetidos à análise estatística pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observou-se em todos os tratamentos um aumento gradativo do pH da cama com o passar das semanas, o qual passou de ácido (dia Zero) para alcalino (Tabela 1). Porém, não se

manteve suficientemente alcalino para promover o efeito inibitório sobre a multiplicação bacteriana, onde o ideal seria um pH em torno de 11 (SILVA, 2007).

Comparando-se os resultados dos G1 e G2, observou-se que os valores de pH são maiores no G1, onde havia a presença do promotor de crescimento e do probiótico, diferente do G3 onde não foi adicionado o probiótico. Pode-se inferir que o probiótico associado ao promotor de crescimento ajudou a elevar o pH da cama no decorrer do experimento.

Muitos fatores podem influenciar a viabilidade e multiplicação bacteriana na cama de um aviário. Entre estes pode-se destacar a atividade da água, pH, temperatura, umidade e a presença de amônia, os quais podem variar entre os diferentes métodos de manejo e tratamento da cama. (SILVA et al, 2007).

O fato de haver inoculação de SE nos tratamentos G1, G2 e G3 determinou que o pH fosse mais elevado uma vez que, nestes grupos, houve uma maior perda de líquidos via digestiva, aumentando a umidade da cama, o que, segundo MC WARD & TAYLOR (2000) reduz a atividade das bactérias produtoras de amônia, variando assim o pH.

A umidade da cama foi aumentando gradativamente e, no G3, obtiveram-se os maiores valores durante todo o período (Tabela 1). A umidade da cama de aves se destaca como um problema influenciado por diversos fatores, tais como questões ambientais, de manejo, sanitárias e fatores nutricionais os quais levam as aves ao aumento no consumo de água ou perda excessiva de água pelas excretas, e, na medida em que a cama apresenta maior teor de umidade, há uma influência direta no desafio microbiológico (VIEIRA et al., 2011).

Os resultados das contagens semanais de enterobactérias e bactérias totais presentes na cama encontram-se na Tabela 2. Observou-se que para as contagens de enterobactérias, o G4 (sem SE), a partir da 4ª semana, apresentou um aumento significativo seguido de redução na 5ª semana (Figura 1a), o que pode ser atribuído pela queda da imunidade materna e estabelecimento da imunidade ativa, ou algum fator estressante que elevou a presença das

enterobactérias. LEEDLE (2000) relata que probióticos podem ser importantes no desenvolvimento de imunocompetência em animais jovens, particularmente quando é necessária a proteção contra antígenos que causam reações inflamatórias no intestino. No G3 observou-se um aumento na 5ª semana, coincidindo com a retirada da ração com promotor de crescimento. Como este grupo foi desafiado com SE o mesmo apresentou uma contagem maior quando relacionada ao G4 (sem desafio). No G1 a contagem foi relativamente baixa, porém superior ao G2 durante as duas primeiras semanas, se equivalendo na 3ª e 4ª semana, seguido de um aumento. Isto é confirmado por SILVA (2000), o qual cita que os probióticos produzem substâncias antibacterianas e enzimas; assim como o estímulo ao sistema imune de mucosa, ocorrendo a produção de anticorpos (IgA), que bloqueiam os receptores e reduzem o número de bactérias patogênicas na luz intestinal e conseqüentemente no meio externo.

Analisando os 4 grupos, nota-se que as contagens de enterobactérias permaneceram semelhantes mesmo no grupo não desafiado com SE, o que pode ser atribuído ao fato das aves desafiadas terem desenvolvido imunidade frente ao agente, utilizando-se dos recursos disponíveis para contornar tal situação. Nos recém-nascidos a imunidade é o resultado da exposição intestinal a uma variedade de antígenos, tais como as bactérias patogênicas, o que é importante na defesa dos animais jovens principalmente contra diarreia (SISSONS, 1989).

Para a contagem de bactérias totais (Figura 1b), observou-se uma dispersão variada, onde o G1 manteve baixas contagens até a 4ª semana havendo um pico durante a 5ª semana, regredindo posteriormente. O G2 apresentou contagens baixas até a 3ª semana, elevando-se entre a 3ª e 4ª, mantendo-se estável até a 5ª semana, regredindo novamente na 6ª semana. O G3 apresentou baixas contagens até a 4ª semana, sendo que a partir desta apresentou um crescimento exponencial até a 6ª semana. Já o G4 foi o grupo que mais apresentou variação, mostrando picos na 2ª e 4ª semana, chegando na 5ª semana com contagens baixas as quais se mantiveram até a 6ª semana.

ITO (2004) verificou que a partir do 25º dia de tratamento com probiótico, se estabelece uma condição de eubiose, desfavorecendo o crescimento de enterobactérias patogênicas e aumentando o número de bactérias benéficas, o que se notou no G2. As bactérias probióticas também protegem os vilos e as superfícies absortivas contra toxinas irritantes produzidas pelos microrganismos patogênicos, permitindo, assim, a regeneração da mucosa intestinal lesada e manutenção da qualidade das fezes (DOBROGOSZ et al.,1991).

Na comparação entre o G3 e o G4 novamente nota-se que o grupo que foi desafiado apresentou melhor resposta imunológica (LEEDLE, 2000), resultando numa menor liberação de bactérias totais na cama. Os picos de contaminação presentes no G4 podem ser atribuídos a desafios por diferentes agentes bacterianos demonstrando seu crescimento e posterior controle pelo sistema imune. Nos G1 e G2 as contagens finais foram baixas, ressaltando-se que o G1, recebeu apenas probiótico nesta semana, sem a adição do promotor de crescimento, devido à troca de ração para realização do jejum pré abate. Observou-se então que a ação do probiótico foi capaz de reduzir o número de bactérias totais mesmo sem a presença do promotor de crescimento, e ainda que o G2 já apresentou um aumento na contagem na 3ª semana quando comparado ao G1 e G3. Sugere-se que o promotor de crescimento presente nestes grupos tenha suprimido a produção destas bactérias benéficas por uma semana a mais do que quando utilizado somente o probiótico.

Na análise bacteriológica da cama, somente foi isolada a SE nos G1, G2 e G3 durante a primeira semana após a exposição. Nas demais semanas o isolamento foi negativo em todos os grupos. BUSH et al. (2007), citam que a cama aviária não é um ambiente favorável à sobrevivência e multiplicação de salmonelas, admitindo que fatores como pH, concentração de amônia, umidade e competição entre micro-organismos saprófitas da cama, atuando simultaneamente, possam estar associados ao efeito redutor desta bactéria. Na análise estatística não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos.

CONCLUSÃO

Observou-se que a adição do probiótico à alimentação das aves apresentou um melhor controle sobre a contagem de enterobactérias presentes na cama, e que o aumento das bactérias totais nos grupos se deve a um aumento de bactérias benéficas influenciadas pela ação do mesmo.

Não se observou diferenças significativas quando se utilizou o probiótico ou probiótico associado ao promotor de crescimento. Sugere-se que a utilização do probiótico na alimentação das aves possa ser benéfica no controle da contaminação bacteriana da cama.

AGRADECIMENTO

Os autores agradecem a Imeve Biotecnologia pelo apoio na realização deste estudo.

COMITÊ DE ÉTICA E BIOSSEGURANÇA

Este trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFSM, sob o parecer de número 101/2012.

BIBLIOGRAFIA

- ANDREATTI, R. L. e SAMPAIO, H. M. **Probióticos e Prebióticos. Educação continuada.** São Paulo, v. 02, n. 03, p. 059-071, 2000.
- AOAC-Associação de Químicos Analíticos Oficiais. Métodos Oficiais de Análise 16 Ed., AOAC, Virginia, EUA. 1996.

BUSH, D. J. et al. Effecting of stacking method on *Salmonella* elimination from recycled poultry bedding. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 571-578, 2007. DOI: 10.1016/j.biortech.2006.02.017

DA COSTA, A. C. R. **Utilização de probióticos em perus (Meleagris Gallopavo) como promotores do crescimento**. 85p., 2009. Dissertação. Universidade Técnica de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária, Lisboa, 2009.

DOBROGOSZ, W.J. et al. Delivery of viable *Lactobacillus reuteri* to the gastrointestinal tract of poultry. **Poultry Science**, n.70 (suplemento 1), p.158, 1991.

FLEMMING e FREITAS. **Utilização de leveduras, probióticos e manonoligossacarídeos na alimentação de frangos de corte**. 2005. Tese, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005

ITO, N.M.K. et al. Saúde gastrintestinal, manejo e medidas para controlar as enfermidades gastrintestinais. In: PRODUÇÃO DE FRANGOS DE CORTE, 2004, Campinas. **Anais...** Campinas: FACTA, 2004. p.206-260.

LEEDLE, J. Probiotics and DFMs - Mode of action in the gastrointestinal tract.

In: Simpósio sobre aditivos alternativos na Nutrição Animal. 2000, Campinas. **Anais...** Campinas: Colégio Brasileiro de Nutrição Animal, 2000. p. 25-40.

LIMA, A.C.F. e al. Efeito do uso de probiótico sobre o desempenho e atividade de enzimas digestivas de frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.32 n.1 Viçosa Jan./Feb. 2003 DOI: 10.1590/S1516-35982003000100025

Mc WARD, G.W.; TAYLOR, D.R. Acidified clay litter amendment. **Journal of Applied Poultry Research**, v.9, n.4, 518-529 p. 2000

MEURER et al. Evaluation of the use of probiotics in diets with or without growth promoters for broiler chicks. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, n.12, 2687-2690 p. 2010.

PATTERSON, J.A. & BURKHOLDER, K.M. Application of Prebiotics and Probiotics in Poultry Production **Poultry Science**. vol. 82, no. 4, 627- 631 p. 2003.

ROSSA et al. Resistência antimicrobiana e ocorrência de micro-organismos patogênicos e indicadores em frangos orgânicos e convencionais: estudo comparativo. **Biotemas**, v.26 n.3, 211-220p.,2013.< <http://dx.doi.org/10.5007/2175-7925.2013v26n3p211>>

ROSTAGNO, H.S.; ALBINO, L.F.T.; FERES, F.A. et al. **Utilização de probióticos e prebióticos em aves**. In: FERREIRA, C.L.F. (Ed.) Prebióticos e probióticos: atualização e prospecção. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 181-202, 2003.

SILVA E.N. Alimentos funcionais para aves: prebióticos e probióticos na alimentação avícola. Conferência de Ciência e Tecnologia Avícolas. Campinas - SP. **Anais... Facta**, v. 2, p.241- 251. 2000.

SILVA, A. L. **Utilização de Cama de Frango e Diferentes Níveis de adubação Nitrogenada para Obtenção de Matéria Seca em Brachiaria cv. Arandu**. 2007. 45f. Monografia Graduação. Faculdades Integradas de Mineiros. Mineiros, 2007.

SISSONS, J. W. Potential of probiotic organisms to prevent diarrhoea and promote digestion in farm animals – a review. **Journal of Science Food Agricultural**, v. 49, n. 1, p.1- 13, 1989. DOI: 10.1002/jsfa.2740490102

TEDESCO, M.J. et al. **Análise de solo, plantas e outros materiais**. Porto Alegre Universidade Federal do Rio Grande do Sul 174p, 1995. (Boletim técnico, 5)

VIEIRA, M F A **Caracterização e análise da qualidade sanitária de camas de frango de diferentes materiais reutilizados sequencialmente**. 2011. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós Graduação em Engenharia Agrícola. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2011.

Tabela 1. Quantificação do pH e umidade das camas de frangos de acordo com os grupos tratamentos durante as 6 semanas de alojamento.

pH	1ª semana	2ª semana	3ª semana	4ª semana	5ª semana	6ª semana	Médias
Grupo 1	6,4 ^a	7,19 ^a	6,07 ^a	8,53 ^a	9,15 ^a	9,31 ^a	7,775 ^a
Grupo 2	6,27 ^a	6,82 ^a	4,72 ^a	7,8 ^a	8,64 ^a	9,13 ^a	7,23 ^a
Grupo 3	6,73 ^a	5,19 ^a	6,67 ^a	8,02 ^a	9,13 ^a	9,35 ^a	7,51 ^a
Grupo 4	7,06 ^a	6,83 ^a	6,68 ^a	8,03 ^a	8,86 ^a	9,0 ^a	7,74 ^a

Umidade	1ª semana	2ª semana	3ª semana	4ª semana	5ª semana	6ª semana	Médias
(%)							
Grupo 1	15,45 ^a	22,65 ^a	34,45 ^a	36,30 ^a	37,60 ^a	32,30 ^a	29,79 ^a
Grupo 2	15,10 ^a	12,50 ^a	19,65 ^a	27,80 ^a	36,40 ^a	30,95 ^a	23,73 ^a
Grupo 3	18 ^a	15,6 ^a	26,30 ^a	41,8 ^a	35,4 ^a	42,8 ^a	29,98 ^a
Grupo 4	14 ^a	22 ^a	33,3 ^a	25,7 ^a	28,1 ^a	24,7 ^a	24,63 ^a

Tabela 2. Contagem de enterobactérias e bactérias totais presentes nas camas de frango de acordo com os grupos tratamentos.

Contagem de				
Enterobactérias	G 01	G 02	G 03	G 04
Semanas	(x10⁻⁴)	(x10⁻⁴)	(x10⁻⁴)	(x10⁻⁴)
Dia Zero	6	6	6	6
1ª sem.	17,45 ^a	2,9 ^a	0,52 ^a	10,8 ^a
2ª sem.	0,765 ^a	4,05 ^a	0,27 ^a	2,18 ^a
3ª sem.	0,315 ^a	3,38 ^a	0,54 ^a	0,76 ^a
4ª sem.	3,26 ^a	0,19 ^a	5,8 ^a	0,16 ^a
5ª sem.	29,2 ^a	2,01 ^a	0,85 ^a	142 ^a
6ª sem.	8,38 ^a	2,65 ^a	54 ^a	1 ^a
Médias	9,33 ^a	3,025 ^a	9,71 ^a	23,12 ^a

Contagem de				
Bactérias Totais	G 01	G 02	G 03	G 04
Semanas	(x10⁻⁴)	(x10⁻⁴)	(x10⁻⁴)	(x10⁻⁴)
Dia Zero	24,8	24,8	24,8	24,8
1ª sem.	12,8 ^a	8,75 ^a	0,46 ^a	12,2 ^a
2ª sem.	0,78 ^a	8,75 ^a	24,2 ^a	251 ^a
3ª sem.	2,19 ^a	4,65 ^a	0,7 ^a	2,24 ^a
4ª sem.	1,17 ^a	125,56 ^a	2,31 ^a	251 ^a
5ª sem.	126,12 ^a	125,90 ^a	75 ^a	1,34 ^a
6ª sem.	6,68 ^a	1,60 ^a	251 ^a	0,63 ^a

Médias

24,9^a

42,85^a

54,06^a

77,60^a

Letras diferentes indicam que houve diferença estatística para o teste de Tukey, com $p < 0,05$.

Considerações Finais

A busca de alternativas que visem à manutenção da produtividade do setor avícola, mas sem comprometer a saúde pública é salutar. Reduzir o uso de substâncias antimicrobianas na produção, reduzindo assim o surgimento de resistência aos antimicrobianos deve se tornar prioridade. Assim, os probióticos ganham cada vez maior importância dentro da produção animal, sendo de grande necessidade que novas pesquisas venham a ser realizadas com o intuito de determinar os reais benefícios destes produtos no setor, indicando se os mesmos são capazes de substituir os produtos já bem estabelecidos.

O Programa de Residência em Área Profissional da Saúde em Medicina Veterinária, subárea de Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) possibilitou um aprofundamento da formação acadêmica, a partir do conhecimento e treinamento nos serviços prestados pelos laboratórios vinculados ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da UFSM, o Laboratório Central de Patologias Aviárias (LCDPA) e o Laboratório de Análises Micotoxicológicas (LAMIC). As vivências proporcionadas pela interface com a área da saúde, a partir de uma concepção ampliada de saúde humana e animal, vivenciadas na comunidade local, contribuíram para a capacitação e consolidação de Médicos Veterinários como profissionais da área da saúde, estimulando-me a buscar áreas que antes eram deixadas para trás.

Referências Bibliográficas

- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001.
- ARSENAULT, J.; et al.. Prevalence and risk factors for Salmonella and Campylobacter spp. carcass contamination in broiler chickens slaughtered in Quebec, Canada. **Journal of Food Protection**, v. 70, n. 8, p. 1820-1828, ago. 2007.
- BAIÃO, N.C. Efeitos da alta densidade populacional sobre o ambiente das instalações avícolas In: Simposio Internacional sobre ambiências e instalações na avicultura industrial, 1995, São Paulo. **Anais...** Campinas, SP; FACTA, 1995. p. 67-75.
- BERCHIERI JR., A. et al. **Doenças das aves**. 2. ed. Campinas, SP: FACTA, 2009. 1104 p.
- BREUIL, J. et al.. Antibiotic Resistance in Samonellae Isolat ed from Humans and Animals in France: Comparative data from 1994 and 1997. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v.46, p. 965-971, 2000.
- BRON, P. et al. Emerging Molecular insights into the interaction between probiotics and the host intestinal mucosa. **Nature Reviews/Microbiology**, volume 10, 2012.
- BUSH, D. J. et al. Effecting of stacking method on *Salmonella* elimination from recycled poultry bedding. **Bioresource Tecnology**, v. 98, p. 571-578, 2007. DOI: 10.1016/j.biortech.2006.02.017
- CARDINALE, E.; et al. Risk factors for Salmonella enterica subsp. enterica infection in se negalese broiler-chicken flocks. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 63, n. 3-4, p. 151-161, 2004.

CARVALHO, A. C. F. B.; CORTEZ, A. L. L. Salmonella spp. em carcaças, carne mecanicamente separada, lingüiças e cortes comerciais de frango. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 6, p. 1465-1468, nov./dez. 2005.

CHEE-SANFORD et al. Fate and transport of antibiotic residues and antibiotic resistance genes following land application of manure waste. **J Environ Qual**. Apr 27;38(3):1086-108, 2009. doi: 10.2134/jeq2008.0128.

COSTA, C.A.F. e ÁVILA, V.S Efeito da idade das aves e da reutilização e manejo da cama do aviário sobre a coccidiose em frangos de corte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.48, n.4, p.430-413, 1996.

COSTA, A. C. R. Utilização de probióticos em perus (*Meleagris Gallopavo*) como promotores do crescimento. 85f. **Dissertação** de Mestrado em Medicina Veterinária. Universidade Técnica de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária, Lisboa, 2009.

DAI PRÁ, Novas Estratégias para a Utilização de Cama em Aviários. In: **Conferência FACTA**, Ciência e Tecnologia Avícolas, 2011.

DAVIES, J.R.; et al.. The effects of feeding broiler litter on microbial contamination of beef carcasses. **Bioresource Technology**, v. 84, n.2, p.191-196, 2002.

FERREIRA, H.A. et al. Efeito de Condicionadores Químicos na cama de frango sobre o desempenho de frangos de corte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** v.56, n.4, 2004.

DORMEDY et al. Validation of acid washes as critical control points in hazard analysis and critical control point systems. **J Food Prot**. Dec;63(12):1676-80, 2000.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA – Committed to ensuring food safety in Europe disponível em http://www.efsa.europa.eu/EFSA/efsa_locale1178620753812_home.htm, 2009.

FEFANA- EU Feed Additives e Premixtures Association: **Antimicrobials as Feed Additives**, Editgraph, Goussainville, France. Impression 1 semestre 2005

GUSILS C. et al. Some probiotic properties of chicken lactobacilli. **Can. J. Microbiol.** 45 p. 981-987, 1999.

HAKKINEN, M.; SCHNEITZ, C. Efficacy of a commercial competitive exclusion product against *Campylobacter jejuni*. **British Poultry Science**, v.40, n.5, p.619-621, 1999.

INSTRUÇÃO NORMATIVA SDA nº 62 de 26/08/2003, disponível em <<http://www.legisweb.com.br/legislacao/?id=75773>>, acesso em março de 2014.

LAVERMICOCCA, P. et al. Studydy of adhesion and survival of lactobacilli and bifidobacteria on table olives with the aim of formulating a new probiotic food. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 8, p. 4233–4240, 2005

LINE, J.E. et al. Yeast treatment to reduce *Salmonella* and *Campylobacter* populations associated with broiler chickens subjected to transport stress. **Poultry Science**, v.76, n.9, p.1227-1231, 1997.

LINE, J.E. et al. Effect of yeast-supplemented feed on *Salmonella* and *Campylobacter* populations in broilers. **Poultry Science**, v.77, n.3, p.405-410, 1998.

LOUREIRO et al. *Salmonella* serovars of human origin Identified in Pará State, Brazil from 1991 to 2008 **Rev Pan-Amaz Saude**, 1(1):93-100, 2010.

MANAGAKI, S., et al.. Distribution of macrolides, sulfonamides, and trimethoprim in tropical waters: ubiquitous occurrence of veterinary antibiotics in the Mekong Delta. **Environ Sci Technol**, 41: 8004-8010. 2007.

MILES RD. Manipulation of the microflora of the gastrointestinal tract: natural ways to prevent colonization by pathogens In: Proceedings of Flórida Altech **Biotechnology in the Feed Industry**; 1993.

- NADVORNY, A. Ocorrência de *Salmonella* sp. em surtos de doenças transmitidas por alimentos no Rio Grande do Sul em 2000, **Acta scientiae veterinariae**. Porto Alegre, RS. Vol. 32, n. 1 (2004), p. 47-51
- PAGANINI, F.J. Manejo da cama. In: **Produção de frangos de corte**.. FACTA, Campinas, SP. Brasil, 2004. pp. 107-116
- PEREIRA, V. L. A.; SILVA, G. M.; LEMOS, M. Presença de *Salmonella* em frangos de corte aparentemente saudáveis em unidades de criação industrial na região de São José do Vale do Rio Preto – RJ. **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias**, Niterói, v. 6, n.3, p. 156–161, 1999.
- PATTERSON, J.A. & BURKHOLDER, K.M. Application of Prebiotics and Probiotics in Poultry Production **Poultry Science**. vol. 82, no. 4, p. 627-631, apr 2003.
- PLYM, L. WIERUP, M. *Salmonella* contamination: a significant challenge to the global marketing of animal food products. **Revue Scientifique et Technique**, Paris, 2006.
- POPOFF et al. Supplement 2002 to the Kauffmann-white scheme. **Research in Microbiology**, 2004.
- SANTOS, D. M. S.; et al. *Salmonella* em carcaças de frango congeladas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 20, n. 1, p. 39-42, jan./mar. 2000.
- SANTOS, I. I. Promotores de crescimento na alimentação de frangos de corte: desempenho zootécnico e análise de resíduos (antimicrobianos) na cama de aviário. 2002. **Dissertação** (Mestrado em Agroecossistemas) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina Florianópolis, 78p.
- SILVA, E. A. J. **Manual de Controle Higiênico – Sanitário em Alimentos**. 3aed. São Paulo: Varela, p.3-394. 1999.
- SOARES, L.L.P. Restrições e uso de aditivos (promotores de crescimento) em rações para aves: visão do fabricante. In: Conferência Apinco de ciência e tecnologia avícolas, 1996, Curitiba. **Anais...** Campinas: Facta, 1996. p.27-36

TANNOCK, G.W; A fresh look at the intestinal microflora. **Probiotics: a critical review**. 1999

TAVECHIO, Ana T.; AMARAL, Luiz A. Salmonella em carcaças de frango congeladas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 20, p. 39-42, 2000.

TEDESCO, M.J. et al. Análise de solo, plantas e outros materiais. Porto Alegre Universidade Federal do Rio Grande do Sul 1995. 174p. (**Boletim técnico**, 5)

União Brasileira de Avicultura (UBABEF), disponível em <http://www.ubabef.com.br> e acesso em 02/03/2014.

TESSARI, E.N et al.. Divulgação técnica: Salmonela na segurança dos alimentos. **Biológico**, São Paulo, v.70, 2008.

TESSARI, E.N.C.; et al. Incidência de Salmonella spp. em pintos de corte recém nascidos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.70, n.3, p.279 281, 2003

TESSARI, E.N. et al. Potencial energético da cama de aviário produzida na região sudoeste do paraná utilizada como substrato para a produção de biogás, **Dissertação**, Curitiba, 2011, 80p.

TIROLLI, I. C. C.; COSTA, C. A. Ocorrência de Salmonella spp. em carcaças de frango recém abatidos em feiras e mercados da cidade de Manaus-AM. **Acta Amazônica**, v. 36, n. 2, p. 205-208, 2006.

TINÔCO, I.F.F et al. **Produção de Frango de corte de alta densidade**. Viçosa, CPT, 2009. 256p

TRABULSI,L.R. **Microbiologia**. 3o ed. Rio de Janeiro. São Paulo. Livraria Atheneu 1999; p314-342

VIEIRA, M F A Caracterização e análise da qualidade sanitária de camas de frango de diferentes materiais reutilizados sequencialmente. **Dissertação** de Mestrado, Programa de Pós Graduação em Engenharia Agrícola. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 2011

WHITE, P. L.; et al. Salmonella Enteritidis in meat, poultry, and pasteurized egg products regulated by the U.S. Food Safety and Inspection Service, 1998 through 2003. **Journal of Food Protection**, v. 70, n. 3, p. 582-591, mar. 2007.

WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH – OIE Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. Salmonellosis. Pais, 2010. Disponível em <[http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.09.09_SALMONELLOSI S.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.09.09_SALMONELLOSI_S.pdf)>

WOLLENBERGER, L. et al.. Acute and chronic toxicity of veterinary antibiotics to *Daphnia magna*. **Chemosphere**, 40: 723-730, 2002.

ZHAO, S. et al. Characterization of *Salmonella* entérica serotype Newport isolated from humans and food animals. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n.12, p. 5366-5371, dez. 2003.

.