

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS FRENTE À
CONTAMINAÇÃO POR *SALMONELLA* ENTERITIDIS
EM AVES TRATADAS E NÃO TRATADAS COM
ÁCIDOS ORGÂNICOS E SUA DETECÇÃO POR
MÉTODOS FENOTÍPICOS E GENOTÍPICOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Fernanda Flores

**Santa Maria, RS, Brasil
2011**

**PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS FRENTE À
CONTAMINAÇÃO POR *SALMONELLA* ENTERITIDIS EM
AVES TRATADAS E NÃO TRATADAS COM ÁCIDOS
ORGÂNICOS E SUA DETECÇÃO POR MÉTODOS
FENOTÍPICOS E GENOTÍPICOS**

Fernanda Flores

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de concentração em Medicina Veterinária Preventiva, da Universidade Federal de Santa Maria (UFMS, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Medicina Veterinária

Orientadora: Profa. Maristela Lovato

Coorientadora: Profa. Sônia de Avila Botton

Santa Maria, RS, Brasil

2011

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária**

A comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de Mestrado

**PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS FRENTE À CONTAMINAÇÃO POR
SALMONELLA ENTERITIDIS EM AVES TRATADAS E NÃO
TRATADAS COM ÁCIDOS ORGÂNICOS E SUA DETECÇÃO POR
MÉTODOS FENOTÍPICOS E GENOTÍPICOS**

Elaborada por
Fernanda Flores

Como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Medicina Veterinária

Comissão Examinadora:

Maristela Lovato, Dra., UFSM
(Presidente/Orientadora)

Sônia de Avila Botton, Dra., UFSM

Luciana Ruschel dos Santos, Dra., UPF

Santa Maria, 07 de Novembro de 2011.

Agradecimentos

Agradeço e dedico este trabalho a minha família, em especial meus pais, Antonio e Jurita, minhas irmãs Daniela e Andressa, meu namorado Flávio, ao Tio Cláudio, e ao Léo que me deram forças nos momentos difíceis e me impulsionaram a buscar meus sonhos vencendo todos os obstáculos. Vocês são a razão da minha Vida!

Em especial agradecimento a minha orientadora Dra. Maristela Lovato por dividir comigo seus conhecimentos e por todas as oportunidades de crescimento pessoal e profissional.

A todos os amigos e colegas do Laboratório Central de Diagnóstico de Patologias Aviárias e do Núcleo de Estudos e Pesquisa em Animais Silvestres (LCDPA/NEPAS), pois sem eles não seria possível a realização deste e de outros trabalhos. Agradeço por todos os momentos compartilhados com vocês.

Um agradecimento especial aos amigos Fábio, César, Tassiana, Joice e Gisele pelo apoio incondicional.

Ao CNPq pela concessão da minha bolsa, bem como ao Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária (PPGMV) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) pela oportunidade de cursar um dos melhores programas de ensino em uma excelente instituição.

A IMUNOVA Análises Biológicas e ao professor Luis Felipe Caron da UFPR pela contribuição na realização dos testes de citometria de fluxo.

A SIMBIOS Biotecnologia pela parceria na realização do teste de Real-time PCR, em especial ao Msc. André Fonseca e ao Dr. Vagner Lunge.

Ao Professor Paulo Pacheco do Departamento de Zootecnia da UFSM pelo auxílio na estatística dos experimentos.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS FRENTE À CONTAMINAÇÃO POR *SALMONELLA* ENTERITIDIS EM AVES TRATADAS E NÃO TRATADAS COM ÁCIDOS ORGÂNICOS E SUA DETECÇÃO POR MÉTODOS FENOTÍPICOS E GENOTÍPICOS

AUTORA: FERNANDA FLORES
ORIENTADORA: MARISTELA LOVATO
Santa Maria, 07 de Novembro de 2011

A Salmonelose é um problema de saúde coletiva a qual envolve questões de sanidade animal e de manejo de alimentos que requerem práticas conjugadas para minimizar seus efeitos. Essa enfermidade é uma das zoonoses com maior impacto sobre a saúde pública em todo o mundo devido à: elevada endemicidade, morbidade, difícil controle e, sobretudo, pelo desenvolvimento de resistência a antimicrobianos. Este último tem levado a busca de alternativas no controle as quais incluem probióticos, prebióticos e os ácidos orgânicos. Outro fator importante é a elucidação do papel do sistema imune da ave com relação a este micro-organismo, o qual é ainda pouco conhecido devido à complexidade deste patógeno e a indisponibilidade de técnicas imunológicas mais sensíveis. Além disso, um diagnóstico rápido e preciso capaz de detectar todos os sorotipos de *Salmonella* spp. ainda são utópicos. Portanto a necessidade de mais conhecimento neste campo é fundamental para estabelecer um plano de controle deste patógeno. Este trabalho - dividido em dois capítulos - teve como objetivo estabelecer parâmetros imunitários de linfócitos circulantes, através da técnica de citometria de fluxo, em aves contaminadas com *Salmonella* Enteritidis e tratadas com ácidos orgânicos, bem como avaliar a eficiência do diagnóstico fenotípico, pelo método microbiológico convencional comparado com métodos microbiológicos quantitativos, e com o método genotípico, pela técnica de Real-time PCR, em amostras de aves infectadas com *Salmonella* spp. de forma natural e experimental. Com isso percebeu-se no primeiro estudo (Capítulo 1) que grupos não infectados apresentaram maior quantidade média de linfócitos T CD4⁺, CD8β⁺, MHC II^{bright+} e TCRVβ1⁺ e o grupo infectado apresentou maior proporção de células circulantes e um retorno gradual foi observado quando o tratamento foi eficaz na redução bacteriana. No segundo estudo (Capítulo 2) existiu variabilidade no comportamento das amostras natural e experimentalmente infectadas em relação ao número de aves positivas e a técnica utilizada para a sua detecção. No entanto não houve diferença significativa pelo teste de Qui-quadrado entre os métodos fenotípicos e genotípicos avaliados neste experimento.

Palavras-Chave: *Salmonella*, sistema imunológico, citometria de fluxo, diagnóstico, biologia molecular.

ABSTRACT

Master's Dissertation
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

IMMUNOLOGICAL PARAMETERS IN THE CONTAMINATION BY *SALMONELLA* ENTERITIDIS IN POULTRY TREATED AND NOT TREATED WITH ORGANIC ACIDS AND THEIR DETECTION BY PHENOTYPIC AND GENOTYPIC METHODS

AUTHOR: FERNANDA FLORES
ADVISER: MARISTELA LOVATO
Santa Maria, November, 07, 2011

Salmonellosis is a public health problem that involves issues in animal health and food handling practices that require combined actions to minimize its effects. This disease is a zoonosis with the greatest impact on public health throughout the world due to: high endemicity, high mortality and especially by its difficult to control and the development of antimicrobial resistance. This last issue has led the search for alternatives of control which includes probiotics, prebiotics and organic acids. Another important factor is the elucidation of the role of the immune system of the bird which is still largely unknown due to the complexity of this pathogen and the availability of more sensitive immunological techniques. In addition, rapid and accurate diagnoses which can detect all serotypes are utopian today. Therefore the need for more knowledge in this field is critical to a plan to control *Salmonella* spp. This work - divided into two chapters - aims to establish parameters of immune lymphocytes circulating through the technique of flow cytometry in birds infected with *Salmonella* Enteritidis and treated with organic acids, as well as evaluate the efficiency of phenotypic diagnosis by conventional microbiological method compared with quantitative methods, and the genotypic method, through the Real-time PCR in poultry samples from naturally and artificially infected with *Salmonella* spp. Thus, was noticed in the first study that groups not infected had higher average number of lymphocytes T CD4⁺, CD8β⁺, MHC II^{bright+} and TCRVβ1⁺ and the infected group had a higher proportion of circulating cells and gradual recovery was observed when treatment was effective in bacterial reduction. In the second study there was variability in the behavior of different samples and there was no significant difference between the phenotypic and genotypic tests used. However no significant difference were note by χ^2 test between the phenotypic and genotypic methods evaluated in this experiment.

Keywords: *Salmonella*, immune system, flow cytometry, diagnostics, molecular biology.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I

Figura 1 - Gráficos representativos da avaliação citométrica dos parâmetros imunes.....32

Figura 2 - Quantidade circulante dos diversos subtipos celulares estudadas neste trabalho em aves infectadas experimentalmente com *Salmonella* Enteritidis de acordo com os tratamentos.....33

Capítulo II

Figura 1- Demonstrativo do gráfico gerado durante avaliação das amostras do experimento “B” - grupo T6 (Aves desafiadas e tratadas com 400ppm de AO via água dos 34 aos 35 dias de idade) por qPCR.....63

Figura 2- Demonstrativo do gráfico gerado durante avaliação das amostras do experimento “A” - grupo T1 (Controle positivo) por qPCR.....63

LISTA DE TABELAS

Capítulo I

Tabela 1 - Teste Qui-quadrado (X^2) comparando o percentual de aves positivas para <i>Salmonella</i> Enteritidis nos diferentes tratamentos.....	34
--	----

Capítulo II

Tabela 1 - Teste de Qui- quadrado (X^2) comparando a quantidade de aves positivas nos testes microbiológico qualitativo e o qPCR com os caldo seletivos rappaport-vassiliadis (RV) no experimento com infecção natural por <i>Salmonella</i> spp. por tratamento, levando em consideração a 1ª coleta de amostras por swab cloacal.....	58
Tabela 2 - Teste de Qui- quadrado (X^2) comparando a quantidade de aves positivas nos testes microbiológico quantitativo e o qPCR com os caldo seletivos rappaport-vassiliadis (RV) e tetrionato (TT) no experimento com infecção natural por <i>Salmonella</i> spp. por tratamento, levando em consideração a 2ª coleta de amostras por swab cloacal.....	58
Tabela 3 - Resultados obtidos pelo teste de Qui-quadrado (X^2) na quantificação de <i>Salmonella</i> spp. em aves naturalmente infectadas pelos protocolos A, B, C, D durante a 2ª coleta de amostras por swab cloacal.....	59
Tabela 4 - Teste de Qui - quadrado (X^2) comparando a quantidade de aves positivas nos testes microbiológicos qualitativo e o qPCR com os caldo seletivos rappaport-vassiliadis (RV) e tetrionato (TT) no experimento com infecção artificial por <i>Salmonella</i> Enteritidis por tratamento.....	59
Tabela 5 - Resultado de quantificação pelo protocolo “C” aplicado em 47 amostras do experimento com infecção artificial de <i>Salmonella</i> Enteritidis pelo teste de Qui-quadrado (X^2).....	60
Tabela 6 -Resultados das análises microbiológicas versus o qPCR em aves infectadas naturalmente com <i>Salmonella</i> Enteritidis e <i>Salmonella</i> Senftenberg, incluindo amostras positivas em pelo menos dois métodos.....	60
Tabela 7 - Sensibilidade, especificidade e acurácia para o ensaio de qPCR em aves infectadas naturalmente com <i>Salmonella</i> Enteritidis e <i>Salmonella</i> Senftenberg.....	61
Tabela 8 -Resultados das análises microbiológicas versus o qPCR em aves infectadas artificialmente com <i>Salmonella</i> Enteritidis, incluindo amostras positivas em pelo menos dois métodos.	61
Tabela 9 - Sensibilidade, especificidade e acurácia para o ensaio de qPCR em aves infectadas artificialmente com <i>Salmonella</i> Enteritidis.....	62

Tabela 10 - Perfil de resistência da <i>Salmonella</i> Enteritidis (SE) e <i>Salmonella</i> Senftenberg (SS) isoladas em granja de frango de corte.....	62
---	----

LISTA DE QUADROS

Capítulo I

Quadro 1 - Anticorpos usados para detectar os antígenos de superfície celular de leucócitos e especificidade antigênica de cada anticorpo ^{1*}	31
---	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. CAPÍTULO I - Comportamento de células do sistema imune frente ao desafio com <i>Salmonella</i> Enteritidis em aves tratadas e não tratadas com ácidos orgânicos	15
Resumo.....	15
Introdução	16
Materiais e Métodos.....	18
Resultados e Discussão.....	21
Conclusões	26
Referências.....	27
3. CAPÍTULO II - Detecção fenotípica e genotípica de <i>Salmonella</i> spp. em aves infectadas natural e experimentalmente	35
Resumo.....	35
Introdução	36
Materiais e Métodos.....	38
Resultados	43
Discussão.....	45
Conclusões	52
Referências.....	53
4. CONCLUSÕES	64
5. REFERÊNCIAS	65

1. INTRODUÇÃO

As doenças entéricas se tornaram nos últimos anos um dos maiores desafios para a avicultura industrial mundial, acarretando perdas de produtividade, aumento de mortalidade entre as aves e a contaminação de alimentos para o consumo humano. Os produtos avícolas são relacionados com diversas toxinfecções alimentares em humanos em vários países, dentre elas, as infecções causadas, principalmente, por *Salmonella* spp. sugerindo que os produtos elaborados com carne de aves, ovos e derivados possam ser fontes de infecção e também constituindo uma importante barreira sanitária para exportação, na qual cerca de 8% do total de reclamações internacionais nos últimos cinco anos, sobre produtos brasileiros, se refere à presença de salmonelas (NASCIMENTO 2010).

A ocorrência de surtos de Salmonelose humana, relacionada aos produtos avícolas pode ser causada por vários sorotipos. No entanto, o isolamento de *Salmonella* Enteritidis, seja em humanos ou em aves, aumentou sensivelmente atingindo índices superiores a 50% das ocorrências em muitos países (ANDREATTI FILHO 2006). A carne de aves pode ser contaminada com *Salmonella* spp. quando essa é transferida do conteúdo intestinal à carcaça durante seu processamento.

As aves domésticas são os maiores reservatórios de *Salmonella* spp. existentes na natureza. As salmonelas são frequentemente relatadas em aves e seus subprodutos, particularmente devido ao sistema de produção em confinamento ao qual são submetidas e aos programas nacionais para isolamento e identificação de *Salmonella* spp. (YAO et al. 2011).

A Salmonelose é causada por micro-organismos do gênero *Salmonella*, pertencentes à família Enterobacteriaceae, que possuem a capacidade de infectar diversas espécies, inclusive o homem. Este gênero, composto por mais de 2500 sorotipos, pertencem a duas espécies: *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*, que podem ser diferenciados com base em séries bioquímicas e sorológicas e possui nomenclatura diferenciada. A *S. enterica* é dividida em seis subespécies que possui um número variável de sorovares ou sorotipos (BACK 2002). Dentro da espécie *S. enterica* subespécie *enterica* se destacam os sorotipos Gallinarum, Pullorum, Enteritidis e Typhimurium (FLORES 2010). Estes sorotipos são monitorados pelo Plano Nacional de Sanidade Avícola - PNSA (BRASIL, 2003) sendo que os sorotipos Enteritidis e Typhimurium, são os isolados relacionados com maior frequência em produtos avícolas e em casos de infecções alimentares.

Por definição, os micro-organismos do gênero *Salmonella* são bastonetes curtos, gram-negativos, móveis ou imóveis, aeróbios ou facultativamente anaeróbios, catalase positiva, oxidase negativa, fermentam açúcares produzindo gases como H₂S e possuem uma complexa constituição antigênica (antígeno somático “O”, flagelar “H”, capsular “K”) e mais de 2500 sorotipos. Resistem a temperaturas de 5°C a 47°C, pH de 4,5 a 9,5 e podem sobreviver de 89 dias a 30 meses em condições ambientais favoráveis. No entanto é sensível à pasteurização, peletização, cozimento, compostagem, fermentação, ao uso de alguns desinfetantes e a radiação (FLORES 2010).

As aves quando infectadas, podem desenvolver três enfermidades distintas: a pulorose, causada pela *S. Pullorum*; o tifo aviário, causado pela *S. Gallinarum*; e o paratifo aviário, causado por qualquer outra subespécie de *S. enterica* que não tem um hospedeiro específico e que estão relacionados à infecção em humanos (LOVATO et al. 2009).

Na produção em confinamento existem inúmeros fatores de risco que podem contribuir para maior prevalência de *Salmonella* spp. tais como: a falta de higiene na granja, a presença de pragas nos locais de criação, a contaminação dos alimentos e da água, o uso indiscriminado de promotores de crescimento e a presença de animais portadores.

A etapa de criação pode ser epidemiologicamente muito importante na disseminação das *Salmonelas* spp. e, conseqüentemente, originar um produto contaminado. Trabalhos realizados no Brasil e em vários países desenvolvidos e em desenvolvimento permitem indicar a *Salmonella* spp. como um dos principais micro-organismos presentes nas contaminações.

No Rio Grande do Sul, desde 1993, a Salmonelose tem sido a Doença Transmitida por Alimentos (DTA) de maior prevalência, assim como em outros estados brasileiros e países da Europa e América Latina. As mudanças nos sistemas de produção de alimentos e a pressão social têm levado ao aumento da incidência de DTA's. Dos surtos de Salmonelose investigados, 78,8% possuíram matéria prima sem inspeção e/ou manipulação incorreta dos alimentos como fatores determinantes, além de que 30 a 50% das carcaças de frangos congelados ou resfriados estão contaminados com *Salmonella* spp. (NADVORNY 2004, CDC 2010).

OLIVEIRA et al. (2006) ao analisarem 51 amostras de material excretado por aves e 63 amostras de carcaças submetidas à análise bacteriológica e ao teste de sensibilidade a antimicrobianos, observaram que não foram isoladas salmonelas do material excretado, contudo, nas amostras de carcaças se observa a taxa de 11,8% e destes 100% obtiveram resistência aos antimicrobianos.

Por muito tempo o controle de salmonelas foi realizado através de antimicrobianos promotores de crescimento, os quais foram banidos pela possível transmissão de resistência antibiótica a patógeno causadores de doenças humanas.

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. Qualquer fator que leve ao desequilíbrio da microbiota intestinal, como o uso indevido de antimicrobianos, estresse, mudanças bruscas na alimentação e fatores imunossupressores entre outros, poderá permitir a instalação e a multiplicação de micro-organismos patogênicos. Assim, fica evidente que o equilíbrio da microbiota intestinal reflete diretamente em um bom estado imunológico do hospedeiro (PICKLER 2011).

A avaliação do sistema imune de aves criadas comercialmente é necessária para a proteção contra doenças associadas ao manejo intenso e para garantir a aplicação segura de agentes terapêuticos ou imunização profilática (DIETERT 1994). A avaliação atualmente feita sobre o sistema imune em situações comerciais, como sorologia e aferição do tamanho de órgãos linfóides podem não ser tão sensíveis quanto o desejado, ou tampouco ter a capacidade de elucidar a patogenia causada (MENDONÇA et al 2009). Hoje se utiliza a citometria de fluxo para avaliar as subpopulações de linfócitos de aves, esse método é tido como altamente sensível, e os anticorpos disponíveis comercialmente são bastante específicos; a precisão da avaliação da imunocompetência é superior a métodos convencionais (BEIRÃO 2011).

Os métodos convencionais para o diagnóstico das salmonelas tiveram grande consolidação com o desenvolvimento de novos meios de cultura na década de 80, mas ainda demandam muito tempo de execução até a divulgação do resultado (FLÔRES 2001). No entanto algumas vezes não é possível isolar este micro-organismo com os métodos microbiológicos convencionais, pois esta bactéria, quando comparada às demais enterobactérias, é pouco competitiva em meios de cultivos convencionais, ocorrendo falsos diagnósticos de sua presença ou ausência, constituindo assim um problema maior em saúde coletiva.

Em nossos experimentos precedentes ao realizarmos diluições seriadas e sementeiras conforme o protocolo indicado pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) (BRASIL 1995) uma amostra anteriormente considerada negativa para presença de *Salmonella* spp. se tornou positiva nas maiores diluições devido a menor competição entre as enterobactérias, possibilitando desta forma o aparecimento de colônias características de *Salmonella* spp.

Com o desenvolvimento de técnicas moleculares ganhamos rapidez e precisão (FLÔRES 2001). A reação de polimerase em cadeia em tempo real (Real-time PCR) monitora a fluorescência emitida durante a reação como um indicador da produção de amplificado em cada ciclo da PCR. É uma técnica mais rápida, não é influenciada por amplificação não específica, a amplificação pode ser monitorada em tempo real, não ocorre processamento após a reação, mais específico, sensível (CHEN et al. 2010). Desta forma o diagnóstico se torna rápido, preciso e determinante para o controle desta enfermidade.

As alternativas no controle da Salmonelose aviária incluem os produtos compostos de ácidos orgânicos biodegradáveis, capazes de eliminar micro-organismos patogênicos sem afetar a microflora intestinal benéfica. Estes produtos não se encaixam na classificação de probiótico porque não contém micro-organismos vivos, ou dentro da classificação de prebiótico porque não há um alimento ou substrato para as bactérias que fazem parte da microflora benéfica. Apesar de ser constituído de ácidos orgânicos não entram na classificação de produtos acidificantes porque os volumes utilizados são muito baixos e seu mecanismo de ação não é somente a redução do pH intestinal. Eles são constituídos de um complexo orgânico, produto da reação dos ácidos: ascórbico, cítrico e láctico, com a glicerina, que potencializarão a capacidade antimicrobiana dos ingredientes individuais do produto (CONTRERAS 2007).

Dentro desta abordagem, o presente trabalho procurou estabelecer parâmetros imunitários de linfócitos circulantes, através da técnica de citometria de fluxo, em aves contaminadas com *Salmonella* Enteritidis e tratadas com ácidos orgânicos, bem como avaliar a eficiência do diagnóstico pelo método microbiológico convencional comparado com métodos quantitativos e com a Real-time PCR, em amostras de aves infectadas com *Salmonella* spp. de forma natural e experimental.

2. CAPÍTULO I

COMPORTAMENTO DE CÉLULAS DO SISTEMA IMUNE FRENTE AO DESAFIO COM *SALMONELLA* ENTERITIDIS EM AVES TRATADAS E NÃO TRATADAS COM ÁCIDOS ORGÂNICOS.

F. Flores¹, C. G. Wilsmann¹, F. L. Gazoni¹, M. Lovato¹, L. F. Caron², B. C. B.
Beirão²

Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil¹,

Universidade Federal do Paraná, PR, Brasil²

RESUMO

A Salmonelose é uma importante zoonose, considerada a principal causa de infecções bacterianas, sendo associada ao consumo de produtos avícolas. Como alternativa de controle, ácidos orgânicos têm sido amplamente usados. No entanto, pouco se conhece sobre o estado imunológico de aves de produção, e uma avaliação deste *status* é necessária para proteger frente a enfermidades e para garantir à aplicação segura de agentes terapêuticos ou imunização profilática. Este trabalho teve como objetivo verificar o comportamento do sistema imunológico das aves previamente infectadas com *Salmonella* Enteritidis (SE) tratadas com um composto de ácidos orgânicos em diferentes concentrações administrado via água e ração comparando com as aves infectadas e não tratadas. Foram inoculados com 1mL via oral de SE na concentração de $1,0 \times 10^8$ UFC/mL em 120 frangos de corte, no 1º e 2º dia de idade, divididos em seis tratamentos com duas repetições utilizando 200, 400, 500 e 1000ppm do ácido orgânico. Aos 35 dias de vida das aves, foram coletados, de todos os grupos, alíquotas de sangue de 3mL em tubo contendo EDTA para a avaliação das células imunes através de citometria de fluxo. Foram analisadas as porcentagens circulantes de células CD4⁺, CD8β⁺, MHC I⁺, MHC II⁺, TCRVβ1⁺, TCRVβ2⁺ e CD28⁺. Para análise microbiológica foram coletadas tonsilas cecais destas aves. Observou-se com esse estudo que os ácidos orgânicos nas dosagens 1000ppm na água e 500ppm na ração durante, dois e sete dias respectivamente antes do abate, foram eficazes na redução da infecção por SE em frangos de corte, comprovadas pelo método microbiológico e demonstradas através do comportamento das células do sistema imune. No presente estudo as aves infectadas apresentaram uma proporção menor de células T auxiliares circulantes quando comparadas às aves infectadas, mas tratadas com o AO ou com o grupo não infectado. A mesma tendência pode ser observada para as células CD28⁺, TCRVβ1⁺ e MHC II^{bright+}, e, com menor resolução, para CD8β⁺.

Palavras Chave: Salmonelose, controle, sistema imunológico, citometria de fluxo.

INTRODUÇÃO

A Salmonelose é uma das principais causas de infecções bacterianas de origem alimentar em humanos e está associada a diversas fontes, no entanto o consumo de produtos avícolas, como ovos e carnes são amplamente correlacionados (OLDFIELD 2001). No período de 2000 a 2005, a *Salmonella* Enteritidis (SE) foi o sorotipo mais isolado em abatedouros de aves nos Estados Unidos (ALTEKRUSE et al. 2006). No sul do Brasil a SE foi o sorotipo predominante em infecções alimentares em humanos (VAZ et al. 2007, OLIVEIRA et al. 2009, 2010). Este patógeno pode infectar as aves por várias formas, nas quais as mais relacionadas à infecção do plantel são a água, alimento e ambiente contaminado (FLÔRES 2001).

Nas últimas décadas a principal forma de controle de enfermidades bacterianas em granjas avícolas foi os antimicrobianos. No entanto, o uso destas drogas como medida preventiva tem sido questionada uma vez que extensos relatos surgiram sobre a resistência aos antimicrobianos entre bactérias patogênicas (PARRY 2003). Cox & Pavic (2010) mostraram que alguns antibióticos podem facilitar a colonização, aumentar a excreção e prolongar a disseminação de *Salmonella* spp. Desta forma, a proibição de diversos antibióticos na avicultura tem gerado a necessidade do desenvolvimento de novas formas de controle das infecções bacterianas.

Neste contexto, probióticos e ácidos orgânicos, dentre outros, têm sido propostos como candidatos a preencher esta lacuna (KABIR 2009). Probióticos foram definidos como aditivos compostos por micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefício à saúde do hospedeiro modulando o sistema imune (GAGGIÀ 2010). No entanto, alguns estudos demonstraram que eles não são efetivos no tratamento de aves infectadas com *Salmonella* spp. (MEAD 2000). Os ácidos orgânicos têm sido amplamente usados na avicultura e quando administrados na água ou alimento tem capacidade de eliminar bactérias através da redução do pH e pela diminuição da capacidade de aderência da fímbria bacteriana à parede intestinal (WALES 2010). Entretanto, assim como os antibacterianos, os acidificantes têm induzido o desenvolvimento de cepas de *Salmonella* spp resistentes (HERES et al. 2004, DUNKLEY et al. 2009).

O produto utilizado neste trabalho tem em sua composição ácido cítrico, ascórbico e láctico e vem sendo empregado como alternativa ao controle bacteriano em avicultura. O seu mecanismo de ação é pela interação através do contato com a membrana celular bacteriana

promovendo alterações na permeabilidade seletiva causando a morte da bactéria por lise osmótica (OSTERMANN et al 2005).

O sistema imune pode ser separado em inato e adaptativo, que trabalham juntos no combate e eliminação dos possíveis agentes patogênicos. Geralmente a ativação do sistema imune diminui o desempenho das aves modernas e para maximizar a eficiência produtiva ele deve ser mantido vigilante e ativado apenas quando requerido. Uma vez ativado, a resolução rápida ou transição rápida do inato para o adaptativo é desejável para minimizar as perdas de produtividade (BUEHLER 2008)

Contudo, pouco se conhece sobre o estado imunológico de aves de produção, aparentemente saudáveis, e que são constantemente imunizadas e passam por intensos processos de seleção de características zootécnicas desejáveis (BRIDLE et al. 2006). As populações de linfócitos do sangue periférico parecem ser bons marcadores para avaliar a imunocompetência dos animais, incluindo aves. Sabe-se, por exemplo, que a proporção CD4:CD8 é reduzida em aves criadas comercialmente quando comparadas com aves “Specific Pathogen Free” (SPF), parâmetro que indica menor imunocompetência, como aumento na suscetibilidade as diversas enfermidades (EWALD et al.1996, BRIDLE et al. 2006).

Em situações de desafio, as subpopulações de linfócitos circulantes ajudam a compreender a patogenia e evolução das infecções, e como controlá-las. Assim, por exemplo, a subpopulação de linfócitos T citotóxicos no baço de galinhas é maior em aves criadas em granjas avícolas do que em aves que cresceram em laboratório (ERF 1998), bem como em aves estimuladas por diferentes antígenos (PARMENTIER et al. 1995).

A avaliação dos padrões imunológicos de aves criadas comercialmente é necessária para proteger contra doenças associadas com manejo intenso e para garantir a aplicação segura de agentes terapêuticos visando à imunização profilática (DIETERT 1994). Esta é atualmente realizada, sobre o sistema imune em situações comerciais, como sorologia e aferição do tamanho de órgãos linfóides e possa não ser tão sensíveis quanto o desejado, ou tampouco ter a capacidade de elucidar o mecanismo das alterações ocasionadas pelos agentes patogênicos (HECKERT et al. 2002, BOLIS et al. 2003, MENDONÇA et al. 2009). As avaliações realizadas na maior parte dos estudos voltados à imunofenotipagem de linfócitos aviários estão focadas em amostras do baço e timo, havendo alguns poucos estudos sobre as populações celulares circulantes, de mais fácil avaliação (BRIDLE et al. 2006, FAIR et al. 2008).

A citometria de fluxo é uma técnica que permite analisar o fenótipo celular. Eles são capazes de ler ao menos os parâmetros de tamanho e granulosidade celular e alguns comprimentos de onda.

O citômetro avalia cada célula individualmente, gravando vários parâmetros sobre a mesma célula. Assim, é permitido identificar uma população homogênea dentro de uma população heterogênea, ao contrário de espectrofluorímetros, por exemplo, que avaliam a população como um todo (BEIRÃO 2011).

Acredita-se que uma importante ferramenta utilizada para reduzir *Salmonellas* em aves é aumentar a resistência da ave para o organismo através da estimulação do sistema imunológico. A vacinação e a administração de citocinas/quimiocinas e imunomoduladores têm sido os métodos utilizados para aumentar a resistência à infecção por *Salmonella* nas aves. Estudos mais aprofundados sobre o sistema imunológico aviário auxiliarão no desenvolvimento de métodos mais eficazes para estimular a imunidade efetiva e melhorar as chances para uma criação de aves livres de salmonelas. Este micro-organismo é considerado patógeno intracelular, sendo que a imunidade celular desempenha um papel importante na imunidade protetora contra infecções (HOLT et al. 2010).

O objetivo deste estudo foi verificar o comportamento do sistema imunológico das aves infectadas com *Salmonella* Enteritidis (SE) que receberam tratamento com ácidos orgânicos (AO) em diferentes concentrações administrado via água e ração comparando com as aves infectadas e não tratadas com este composto.

MATERIAIS E MÉTODOS

Avaliação in vivo

O experimento foi conduzido no bloco experimental do Laboratório Central de Diagnóstico de Patologias Aviárias (LCDPA) situado no Biotério Central da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Brasil. Foram alojados em baterias 120 fêmeas de corte, com um dia de idade, da linhagem Cobb divididas em seis tratamentos com duas repetições. A dieta utilizada foi à base de milho e farelo de soja sem a adição de substâncias antimicrobianas. Os frangos foram inoculados com 1mL via oral de SE contendo $1,0 \times 10^8$ UFC/mL no 1º e 2º dia de idade.

O desenho experimental foi composto pelos seguintes tratamentos: (T1) aves não desafiadas; (T2) aves desafiadas e não tratadas; (T3) aves desafiadas e tratadas com 200ppm de AO via ração dos 29 aos 35 dias e 1000ppm de AO via água dos 34 aos 35 dias de idade;

(T4) aves desafiadas e tratadas com 1000ppm de AO via água dos 34 aos 35 dias de idade; (T5) aves desafiadas e tratadas com 500ppm na ração dos 29 aos 35 dias de idade; e (T6) aves desafiadas e tratadas com 400ppm de AO via água dos 34 aos 35 dias de idade.

Coleta de Sangue e Necropsia

A coleta de sangue dos frangos foi realizada aos 35 dias de vida das aves com seringa e agulha estéreis, utilizando-se dos protocolos-padrão de contenção dos animais e assepsia (FAO 2002) através de punção cardíaca. Após a coleta, alíquotas do sangue de 3mL foram então colocadas em tubo de ensaio de 10cm sem vácuo contendo anticoagulante (EDTA).

Após a coleta as aves foram eutanasiadas, necropsiadas e tonsilas cecais foram coletadas assepticamente para análises microbiológicas.

O projeto foi registrado e aprovado pelo Comitê de Ética e Bem-Estar Animal da UFSM sob o número 016/2010.

Avaliação dos componentes do sistema imune

A avaliação das células imunes foi realizada pela técnica de citometria de fluxo, na Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba. Foram analisadas as porcentagens circulantes de células CD4⁺, CD8β⁺, MHC I⁺, MHC II⁺, TCRVβ1⁺, TCRVβ2⁺ e CD28⁺. Precedendo-se as análises pelo citômetro de fluxo, as células mononucleares são separadas dos demais componentes do sangue, e em seguida são marcadas por anticorpos específicos. Segue-se uma breve descrição da metodologia.

Isolamento das células mononucleares e marcação para análise por citometria de fluxo

Células mononucleares foram separadas do sangue total através de separação por gradiente de densidade utilizando Ficoll (Histopaque-1077[®], *Sigma-Aldrich*), baseado em protocolo previamente estabelecido por Fair et al.(2008). Em síntese, o sangue foi diluído 1:1 em PBS (solução salina tamponada e fosfatada com pH 7,4) para um volume final de 2mL. Essa diluição é adicionada acima do 1mL de Ficoll em um tubo estéril de 15mL (de plástico graduado tipo Falcon). As amostras foram centrifugadas em centrífuga (5804 R Eppendorf) a 400xg, por 30 minutos a temperatura ambiente.

A capa flogística resultante foi então coletada e transferido para outro tubo de 15mL. As células foram lavadas duas vezes com 4mL de PBS e centrifugadas a 400xg por 7 minutos.

O sedimento final foi ressuspenso em 1mL de solução de paraformaldeído em PBS 1% para a fixação das células. Trinta minutos após a ressuspenso, as células foram centrifugadas a 400xg por 7 minutos, o sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas duas vezes com PBS e centrifugadas nas mesmas condições anteriormente descritas. O sedimento final foi ressuspenso em PBS com BSA (albumina de soro bovino - *Sigma-Aldrich*) 1%. As células foram contadas utilizando uma câmara de Neubauer (NewOptics).

Marcação única foi realizada para todos os anticorpos usando anticorpo primário diluído 1:10 em PBS (pH 7,4) (anticorpos nas seguintes concentrações: 0,5 mg/mL para os anticorpos conjugados com isotiocianato de fluoresceína (FITC). A diluição foi homogeneizada com 10^6 células mononucleares e mantida à temperatura ambiente em local escuro por 20 minutos. Após a incubação, as células foram lavadas com 2mL de PBS, centrifugadas a 400xg por 7 minutos. O sobrenadante foi descartado. As células receberam o anticorpo secundário (1 μ L de diluição de 1:1000) ou Estreptavidina FITC (concentração de 0,5 mg/mL) (diluído 1:10), de acordo com a especificação de cada anticorpo. As células foram mantidas por 20 minutos em temperatura ambiente em local escuro, e em seguida lavadas com 2mL de PBS e centrifugadas. O sedimento final foi ressuspenso em 250 μ L de PBS com BSA 1%.

Anticorpos

Os anticorpos monoclonais primários anti-proteínas de superfície celular de frangos foram adquiridos da Southern Biotechnology Associates, Inc. USA. O Anticorpo secundário (usado para MHC classe II e para anticorpo controle isotópico) foi Fluoresceína (FITC) AffiniPure fragmento F(ab')₂ de cabra anti-camundongo IgG+IgM (H+L) (Accurate Chemical & Scientific Corp.) Conjugado de Streptavidina FITC (para anticorpos primários biotinizados) (Southern Biotech), específico para d-Biotina, de *Streptomyces avidinii* (quadro 1).

Citometria de fluxo

Todas as amostras passaram por citometria dentro de 4 horas após a marcação. A citometria de fluxo foi realizada em um citômetro de fluxo FACSCalibur[®] (Becton Dickinson). Fluorescência verde (FITC) foi detectada no canal FL1 (nm 530/30) (Figura 1). As células foram analisadas em pelo menos 10.000 eventos no *gate* de linfócitos (com base na dispersão frontal (FSC) e lateral (SSC), o que inclui trombócitos contaminantes, de

morfologia muito semelhante aos linfócitos (BOHLS et al. 2006). Os dados foram analisados com o software FlowJo[®] (TreeStar) ou WinMDI 2.9 (Joseph Trotter).

Análise microbiológica

As amostras de tonsilas cecais coletadas foram submetidas à fenotipagem para *Salmonella* spp. conforme o protocolo recomendado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (BRASIL 2003), o qual consiste dos seguintes procedimentos: pré-enriquecimento em água peptonada¹ 1% (37°C/24h), enriquecimento seletivo nos caldos rappaport-vassiliadis¹ (42°C/24h) e tetracionato¹ acrescido de solução verde brilhante e iodo-iodeto (37°C/24h), semeadura em ágar verde brilhante¹ e ágar xilose lisina desoxicolato¹ (37°C/24h). Após foi observada a presença ou ausência de colônias com características fenotípicas de *Salmonella* spp., e submetidas à análise bioquímica em ágar tríplice de açúcar e ferro¹, ágar lisina-ferro¹, meio sim¹ (*sulphide indol motility*), caldo uréia¹ e citrato de Simmons¹.

Análise estatística

A porcentagem média, desvio padrão, teste ANOVA e o teste de Tukey/Kramer foram utilizados para averiguar as diferenças estatísticas entre os tratamentos na avaliação por citometria de fluxo ($P \leq 0.05$) utilizando o programa StatView (SAS Institute Inc.).

Os resultados da presença/ausência de SE foram comparados utilizando o teste Qui-quadrado (χ^2) para determinar a diferença entre os tratamentos ($P \leq 0,05$). O teste foi realizado utilizando-se o programa estatístico SAS Versão 9.2 (SAS 2010).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em frangos de corte experimentalmente infectados com SE foi constatado que aos 35 dias de idade houve uma redução na presença de SE em cecos das aves tratados com AO tanto via água como ração quando utilizados nas concentrações de 1000ppm e 500ppm respectivamente (tabela 1). Concordando com muitos trabalhos que relataram melhor resposta dos AO no controle de infecções por *SE*, *Campylobacter* e outros agentes (HERES et al. 2004, OSTERMANN et al. 2005, BASSAN et al. 2008).

1 - Himedia Laboratories Pvt. Ltd. 23, Vadhani ind. Est., LBS Marg, Mumbai -400 086, India. E-mail: ccare@himedialabs.com.

Segundo a literatura, o uso de ácidos orgânicos na água antes do abate dos animais (BYRD et al. 2001) e administrado via ração (PICKLER 2011) pode ser uma alternativa viável para redução de micro-organismos patogênicos e também apresentar resultados satisfatórios de ganho de peso médio (GPM) e conversão alimentar (CA). Além disso, o último autor sugere que a via de administração dos AO (água ou ração) foi eficaz, mas pode ter respostas diferentes dependendo da interação do micro-organismo estudado com o hospedeiro e a microbiota intestinal. Nava et al. (2009) utilizando técnicas moleculares indicaram que o uso de AO na água de frangos por 22 dias consecutivos, afeta a população microbiana no íleo e que, animais tratados com AO apresentaram maior número de *Lactobacillus* e de bactérias totais.

Os AO associados com atividade antimicrobiana são os ácidos graxos de cadeia curta, tanto monocarboxílicos, como fórmico, acético, propiônico e o butírico ou carboxilados com o grupo hidroxila como láctico, málico, tartárico e o cítrico. Acredita-se que os AO exercem atividade antimicrobiana devido a redução do pH no interior da célula microbiana. No ambiente celular, o ácido se dissocia alterando o pH citoplasmático, afetando o metabolismo e levando a morte da bactéria (OSTERMANN et al. 2005).

Alguns AO não necessitam reduzir o pH no citoplasma para exercer sua atividade antimicrobiana. Por exemplo, no caso do ácido sórbico, que não reduz o pH citoplasmático e acredita-se que a membrana citoplasmática seja o primeiro sítio de ação deste ácido (STRATFORD et al. 2009). A lesão da membrana, a perda da sua integridade e o aumento a permeabilidade a prótons, levam a morte do micro-organismo. Neste sentido, AO são utilizados na alimentação animal para melhorar o desempenho e para controlar a população de micro-organismos patogênicos no intestino, em sistemas de manejo intensivo. Suas vantagens além da produção de ácidos graxos de cadeia curta, vitaminas e aminoácidos também irão atuar como mecanismo de exclusão competitiva, desenvolvimento de defesas intestinais como o muco, estimulação e proliferação de células epiteliais intestinais (enterócitos). Assim, são empregados para melhorar o desempenho zootécnico das aves e como moduladores da microbiota intestinal (PICKLER 2011).

O uso de citometria de fluxo para avaliar as subpopulações de linfócitos de aves é considerado como altamente sensível, e os anticorpos disponíveis comercialmente são bastante específicos sendo que a precisão da avaliação da imunocompetência é superior a outros métodos, como, por exemplo, o leucograma comum, a medida do tamanho de barbela após injeção de um agente de desafio ou a aferição do tamanho da bursa (BRIDLE et al. 2006, FAIR et al. 2008, BEIRÃO 2011).

Os resultados da avaliação do sistema imune através da citometria de fluxo encontrados neste estudo (Figura 2) concordam com as observações microbiológicas da ação do produto encontradas no presente trabalho. O grupo controle negativo (T1) teve a maior quantidade média de linfócitos T $CD4^+$, $CD8\beta^+$, MHC II^{bright+} e, juntamente com o T4 $TCRV\beta1^+$ que reduziu em 95 % a presença de *SE*. Concordando com os achados de Pickler (2011) que encontrou esta proporção em aves com 21 dias de idade, após 7 dias de inoculação com *SE* e tratados com AO via ração e aos de Beirão (2011) que comparou aves comuns de diferentes linhagens *versus* aves “Specific Pathogen Free” entre 1 dia e 60 semanas frente ao desafio com *SE*.

A imunidade contra Salmonelas aviárias envolve o deslocamento de subpopulações de linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$ para o local da infecção (VAN IMMENSEEL et al. 2002, BARUA e YOSHIMURA, 2004) e consequente redução na quantidade circulante dessas células (ASHEG et al. 2003). A defesa imunológica das aves envolve linfócitos T dos três tipos de receptor TCR ($\gamma\delta$, $\alpha\beta V\beta1$ e $\alpha\beta V\beta2$). As células $TCRV\beta1$ expressam menores quantidades de CD28 do que as células $TCRV\beta2$, indicando menor grau de ativação destas. Ambos os $TCR\alpha\beta$ podem expressar em sua superfície CD4 simultaneamente com $CD8\alpha\alpha$. Após a imunização, um aumento na quantidade circulante de TCR está associado à montagem de resposta protetora e efetiva proteção quando submetido ao desafio. Todavia, respostas distintas podem ser observadas entre a imunização e o desafio (BERNDT 2006).

Cada anticorpo primário utilizado define um grupo de células de acordo com a respectiva função. O CD4 reconhece linfócitos T auxiliares ($CD4^+$) (CHAN, 1988), e, especialmente em aves, uma população relativamente grande de células $CD4^+/CD8^+$ (duplo-positivas) (LUHTALA et al. 1997).

Receptores CD8 são compostos de um dímero de moléculas α e β (CHAN, 1988), portanto, são $CD8\alpha\alpha$ ou $CD8\alpha\beta$ (TREGASKES 1995). Isso é relevante porque células citotóxicas têm os receptores $CD8\alpha\beta$, que são capazes de interagir com o MHC I, enquanto que as células duplo-positivas expressam a molécula $CD8\alpha\alpha$ (LUHTALA et al. 1997). Asheg e colaboradores (2003) demonstraram haver uma redução no número de células $CD4^+$ e $CD8^+$ no sangue periférico de galinhas infectadas com *SE* em comparação com o grupo controle não-infectado. No presente estudo as aves infectadas apresentaram uma proporção menor de células T auxiliares circulantes quando comparadas às aves infectadas, mas tratadas com o AO ou com o grupo não infectado. A mesma tendência pode ser observada para as células $CD28^+$, $TCRV\beta1^+$ e MHC II^{bright+}, e, com menor resolução, para $CD8\beta^+$. Nas marcações citadas, pode ser observada uma diminuição na quantidade dessas células quando na presença

da infecção e um retorno gradual à condição do grupo controle entre o grupo T2 e T4, quando o tratamento tornou-se efetivo em reduzir a carga bacteriana. O grupo T6 não obteve sucesso em eliminar as bactérias apresentando resultados similares à T2, como observado na análise microbiológica e imunológica. Embora o T5 tenha sido capaz de reduzir a quantidade de SE isoladas, a avaliação imunológica não demonstrou relação referente a essa diminuição, aparecendo T5 com níveis de células similares ao grupo infectado para as marcações já discutidas, embora haja sinais de recuperação em $CD8\beta^+$, $TCRV\beta1^+$ e altos índices em $MHC II^{bright+}$. Em aves vacinadas e submetidas à infecção com SE houve aumento na quantidade de células citotóxicas no ceco das aves (BERNDT 2006), indicando que pode haver saída de células da circulação com destino ao tecido desafiado.

Segundo Berndt (2006) a capacidade dos sorotipos de *Salmonella* de entrar na mucosa cecal e a invasão de camadas inferiores afeta tanto o nível quanto a natureza da resposta imune no tecido. A SE possui alta capacidade invasiva e pode facilmente ser encontrada nas células da lâmina própria, aumentando o recrutamento de granulócitos, células $CD8^+$ e interleucinas.

Galinhas têm três diferentes receptores de linfócito T (TCR), TCR $\gamma\delta$ (TCR1), TCR $\alpha\beta V\beta1$ (TCR2) e TCR $\alpha\beta V\beta2$ (TCR3). Neste trabalho, os dois últimos marcadores foram utilizados. Cada célula individual expressa apenas um tipo de TCR em sua superfície, e os três tipos são capazes de estarem presentes tanto em células CD4 quanto CD8 (DAVIDSON 2008, BERNDT 2006). Acredita-se que o TCR2 esteja envolvido na imunidade de mucosa, ao estimular a produção de IgA (CIHAK et al. 1993, ZEKARIAS et al. 2002). Supõe-se que um grande estímulo infeccioso poderia ter provocado a saída de células TCR2 da circulação.

O CD28 é um receptor de coestimulação da ativação de células T quando esta entra em contato com células apresentadoras de antígeno (APCs). A interação entre CD28 e B7 (nas APCs) é essencial para a montagem da resposta imune (LINSLEY and LEDBETTER, 1993). Uma redução na proporção de CD28 circulante é visto na fase aguda de processos infecciosos devido ao destinamento dessas células para os órgãos linfóides secundários, em um processo conhecido como *homing*, ou devido à excessiva ativação e consequente senescência das células, em um processo em que a molécula CD28 é perdida (PAPAGNO et al. 2004). Pode-se supor que este tenha sido o que ocorreu no presente estudo. A quantidade circulante de CD28 foi reduzida quando os animais foram desafiados e não foram submetidos a qualquer tratamento (T2), o que poderia significar, portanto, *homing* ou ativação dessas células. Porém quando os animais foram submetidos a tratamento com AO (T3 e T4), parece ter havido recuperação dos níveis sanguíneos dessas células.

Cerca de 10% dos linfócitos são positivos para MHC II, e desses, aparentemente cerca de 90% são linfócitos B (HÁLA 1981). A marcação para MHC II também demonstra uma subpopulação que tem alta expressão dessas moléculas (denominada de MHC II^{bright+}). Acredita-se que a população MHC II^{bright+} seja composta principalmente por células dendríticas, a principal APC, mas também por monócitos que já foram ativados, ou seja, estão expressando antígenos estranhos acoplados ao MHC (DAVISON 2008). Pode-se supor que o processo de *homing* possa também ter algum papel na redução da quantidade circulante dessas células ativadas.

Muitos estudos em camundongos e humanos têm demonstrado um declínio na função do sistema imunológico com a idade resultando em um aumento da incidência de doenças infecciosas, não infecciosas e mortalidade. A quantidade e proporção de subpopulações de células T têm sido relacionadas com a susceptibilidade à doença. Portanto, a compreensão relacionada à imunocompetência com a idade através da avaliação de populações de linfócitos T circulantes em frangos, aparentemente saudáveis, criados comercialmente é de fato relevante para o desenvolvimento de estratégias de melhoramento, bem como promover medidas de saúde para o plantel (BRIDLE et al. 2006). Neste estudo foram utilizadas aves com 35 dias de idade, consideradas jovens. Analisando-se o papel de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ no fornecimento de resposta imunológica contra infecções percebe-se que quando existe uma diminuição por diversos fatores, a suscetibilidade para a Salmonelose aumenta (KAMALAVENKATESH et al. 2005).

Notavelmente, as reações de células T e as respostas da imunidade celular parecem ser de importância central para a defesa contra infecções por *Salmonella* em frangos (BERNDT 2006).

Portanto, conhecer o funcionamento imunológico é de fundamental importância já que o estado imune tem um papel crítico na defesa da ave contra patógenos. Como nos mamíferos, o sistema imune das aves é complexo e compreende uma série de células e fatores solúveis que devem trabalhar juntos para produzir uma resposta imune protetora. Ainda deve se levar em consideração que a indução da resposta imune é diferente entre os diversos patógenos, incluindo diferenças significativas também entre os sorotipos, como é o caso das *Salmonellas* que possuem habilidade de induzir respostas diferentes dependendo do sorotipo em questão (CHAPPELL et al. 2009).

Diversos patógenos são endêmicos em regiões de produção avícola e a exposição a estes pode prejudicar as funções do sistema imune. Por isso manter o plantel em condições de sanidade adequadas utilizando-se produtos que reduzem a carga bacteriana e que mantêm

níveis imunológicos adequados contribui para o melhor desempenho das aves e para a qualidade de produtos avícolas.

CONCLUSÕES

- As dosagens de AO de 1000ppm na água e 500ppm na ração durante, dois e sete dias respectivamente antes do abate, foram eficazes na redução da infecção por SE em frangos de corte, comprovadas pelo método microbiológico e demonstradas através do comportamento das células do sistema imune.

- O grupo T1 (controle não infectado) e o T4 (aves desafiadas e tratadas com 1000ppm de AO via água dos 34 aos 35 dias de idade) tiveram a maior quantidade média de linfócitos T CD4⁺, CD8β⁺, MHC II^{bright+} e TCRVβ1⁺

- O T5 (aves desafiadas e tratadas com 500ppm de AO na ração dos 29 aos 35 dias de idade) foi capaz de reduzir a quantidade de SE isoladas, porém a avaliação imunológica não demonstrou correspondência constante a essa melhora, aparecendo T5 com níveis de células similares ao T2 (grupo infectado não tratado) embora com sinais de recuperação em CD8β⁺, TCRVβ1⁺ e altos índices em MHC II^{bright+}, indicando que pode haver saída de células da circulação com destino ao tecido desafiado.

-Ocorrência do efeito *homing* para redução de células CD28 e MHC II^{bright+} circulantes;

- Os grupos infectados têm maior proporção de células circulantes e um retorno gradual é observado quanto o tratamento torna-se efetivo na redução da carga bacteriana.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTEKRUSE, S. F., et al., *Salmonella* Enteritidis in Broiler Chickens, United States, 2000 – 2005. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, p. 1848-1852, 2006.
- ASHEG, A. A., et al., Dynamics of lymphocyte subpopulations in immune organs of chickens infected with *Salmonella* Enteritidis. **Acta Veterinaria Brunensis**, v.72, p.359-364, 2003.
- BARUA, A., YOSHIMURA, Y., Ovarian cell-mediated immune response to *Salmonella* Enteritidis infection in laying hens (*Gallus domesticus*). **Poultry Science**, v.83, n.6, p.997-1002, 2004.
- BASSAN, J.D., et al., Controle da infecção por *Salmonella* Enteritidis em frangos de corte com ácidos orgânicos e mananoligossacarídeo. **Ciencia Rural**, v.38, n.7, p. 1961 – 1965, 2008.
- BEIRÃO, B.C.B., Avaliação do perfil imune de aves empregando citometria de fluxo. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal do Paraná, p. 131, 2011.
- BERNDT, A., PIEPER, J. and METHNER, U., Circulating gamma delta t cells in response to *Salmonella enterica* serovar Enteritidis exposure in chickens. **Infection and Immunity**, v.74, n.7, p.3967-3978, 2006.
- BOHLS, R.L., et al., The use of flow cytometry to discriminate avian lymphocytes from contaminating thrombocytes. **Developmental & Comparative Immunology**, v 30, p.843-850, 2006.
- BOLIS, D., et al., Gumboro disease: Evaluation of serological and anatomopathological responses in vaccinated broiler chickens challenged with very virulent virus strain. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v.5, n.2, p.137 - 146, 2003.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria da defesa Agropecuária. **Instrução Normativa SDA N.62, de 26 de agosto de 2003**. Métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. P.76, 2003.
- BRIDLE, B. W., et al., T lymphocyte subpopulations diverge in commercially raised chickens. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v.70, n.3, p.183-190, 2006.
- BUEHLER, D. M., Bottlenecks, budgets and immunity: The costs and benefits of immune function over the annual cycle of red knots (*calidris canutus*), **Tese de Doutorado** - Faculty of Mathematics and Natural Sciences, University of Groningen, Groningen, p. 248, 2008.
- 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**, n. 80, p.278–283, 2001.

- CHAN, M.M., et al., Identification of the avian homologues of mammalian CD4 and CD8 antigens. **The Journal of Immunology**, n. 140, p.2133-2138, 1988.
- CHAPPELL, L., et al., The immunology of avian systemic salmonellosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 128, p.53-59, 2009.
- CIHAK, J., et al., In vivo depletion of chicken t-cell subsets. **Scandinavian Journal of Immunology**, v.38, n.2, p.123-129, 1993.
- COX J.M. and PAVIC, A., Advances in enteropathogen control in poultry production. **Journal of Applied Microbiology**, v. 108, p.745–755, 2010.
- DAVISON, F., KASPERS, B. and SCHAT, K., **Avian Immunology**, 1 Edition. Academic Press, London, p. 496, 2008.
- DIETERT, R. R., GOLEMBOSKI, K. A. and AUSTIC, R., E., Environment-immune interactions. **Poultry Science**, v.73, n.7, p.1062-1076, 1994.
- DUNKLEY, K.D., et al., Foodborne *Salmonella* ecology in the avian gastrointestinal tract. **Anaerobe**, v.15, p. 26-35, 2009.
- ERF, G. F., BOTTJE, W. G. and BERSI, T. K. CD4, CD8 and TCR defined t-cell subsets in thymus and spleen of 2- and 7-week old commercial broiler chickens. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.62, n.4, p.339-348, 1998.
- EWALD, S. J., et al., B-haplotype control of cd4/cd8 subsets and TCRV β usage in chicken t lymphocytes. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.53, n.3-4, p.285-301, 1996.
- FAIR, J.M., et al., Immunophenotyping of chicken peripheral blood lymphocyte subpopulations: individual variability and repeatability. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 125, p. 268-273, 2008.
- FAO - A basic laboratory manual for the small scale production and testing of i-2 Newcastle disease vaccine. **FAO**, 2002.
- FLÔRES, M. L.; Avaliação da técnica em cadeia pela polimerase na detecção de *Salmonella* sp em ovos de galinhas artificialmente contaminados, em ovos comerciais do tipo colonial e em alimentos a base de ovos, envolvidos em surtos de infecções alimentares. **Tese de Doutorado**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001.
- GAGGIÀ, F., MATTARELLI, P. and BIAVATI, B., Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. **International Journal of Food Microbiology**, v.141, p. 515–528, 2010.
- HALA, K., BOYD, R. and WICK, G., Chicken major histocompatibility complex and disease. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 14, p. 607-616, 1981.
- HECKERT, R., et al., Effects of density and perch availability on the immune status of broilers. **Poultry Science**, v.81, n.4, p.451-457, 2002.

- HERES, L., B. et al., Effect of acidified feed on susceptibility of broiler chickens to intestinal infection by *Campylobacter* and *Salmonella*. **Veterinary Microbiology**, v.99, p. 259–267, 2004.
- HOLT, P.S., et al., Flow cytometric characterization of Peyer's patch and cecal tonsil T lymphocytes in laying hens following challenge with *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 133 p.276–281, 2010.
- KABIR, S. M. L., The Role of Probiotics in the Poultry Industry. **International Journal of Molecular Sciences**, v.10, p. 3531-3546, 2009.
- KAMALAVENKATESH ,P., et al., Immunopathological effect of the mycotoxins cyclopiazonic acid and T-2 toxin on broiler chicken. **Mycopathologia**, v. 159, p. 273–279, 2005.
- LAHTI, J. M., et al., Two distinct alpha beta t-cell lineages can be distinguished by the differential usage of t-cell receptor v beta gene segments. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v.88, n.23, p.10956-10960, 1991.
- LINSLEY, P.S. and LEDBETTER, J. A., The role of the CD28 receptor during T cell responses to antigen. **Annual Review of Immunology**, v. 11, p. 191-212, 1993.
- LUHTALA, M., et al., A novel peripheral CD4+ CD8+ T cell population: inheritance of CD8alpha expression on CD4+ T cells. **European Journal of Immunology**, v. 27, p.189-193, 1997.
- MEAD, G. C., Prospects for 'competitive exclusion' treatment to control salmonellas and other foodborne pathogens in poultry. **Veterinary Journal**, v. 159, p.111–123, 2000.
- MENDONÇA, J. F. P., et al. Bronquite infecciosa das galinhas: Conhecimentos atuais, cepas e vacinas no brasil. **Ciência Rural**, v.39, n.8, p.2559-2566, 2009.
- NAVA, M. G., et al., Molecular analysis of microbial community structure in the chicken ileum following organic acid supplementation. **Veterinary Microbiology**, n.137, p.345–353, 2009.
- OLDFIELD, E. C., Emerging foodborne pathogens: Keeping your patients and your families safe. **Reviews in Gastroenterological Disorders**, v. 1, p.177–186, 2001.
- OLIVEIRA, F. A., et al., Clonal relationship among *Salmonella enterica* serovar Enteritidis involved in foodborne outbreaks in Southern Brazil. **Food Control**, v. 20, p. 606–610, 2009.
- OLIVEIRA, F. A., et al Characterization of *Salmonella* Enteritidis isolated from human samples. **Food Research International**, (Article in press), (2010).
- OSTERMANN, P., et al., Metabolismo e bases conceituais para a ação benéfica de ácidos orgânicos para frangos de corte. **Ave World: A Revista do Agricultor Moderno**, ano 3, n.15, p.28-31, 2005.

PAPAGNO, L., et al., Immune activation and cd8+ t-cell differentiation towards senescence in hiv-1 infection. **Public Library of Science Biology**, v.2, n.2, p.E20, 2004.

PARMENTIER, H. K., et al., Differences in distribution of lymphocyte antigens in chicken lines divergently selected for antibody responses to sheep red blood cells. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.48, n.1-2, p.155-168, 1995.

PARRY, C. M. Antimicrobial drug resistance in *Salmonella enterica*. **Opinion in Infectious Diseases**, v. 16, p. 467–472, 2003.

PICKLER, L., Ácidos orgânicos via água e via ração para controlar *Salmonella enterica enterica* sorovares Enteritidis e Minnesota em frangos. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal do Paraná. p. 67, 2011.

SAS Institute Inc. Version 9.2. **SAS**, Cary, NC. 2010.

STRATFORD, M., et al., 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.

TREGASKES, C., et al., Identification and analysis of the expression of CD8 alpha beta and CD8 alpha alpha isoforms in chickens reveals a major TCR-gamma delta CD8 alpha beta subset of intestinal intraepithelial lymphocytes. **The Journal of Immunology**, v.154, p. 4485-4494, 1995.

VAN IMMERSEEL, F., et al., Dynamics of immune cell infiltration in the caecal lamina propria of chickens after neonatal infection with a *Salmonella* Enteritidis strains. **Developmental & Comparative Immunology**, v.26, n.4, p.355-364, 2002.

VAZ, C. S. L., et al., Use of a modified AFLP protocol to discriminate *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis isolates. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.35, p.41–48, 2007.

WALES, A. D., ALLEN V. M. and DAVIES R. H., Chemical Treatment of Animal Feed and Water for the Control of *Salmonella*. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.7, p.1-15, 2010.

ZEKARIAS, B., et al., Immunological basis of differences in disease resistance in the chicken. **Veterinary Research**, v.33, n.2, p.109-125, 2002.

Antígeno de superfície celular²	Animal de origem, Clone, Isotipo	Especificidade¹	Conjugação ou fluoróforo³
CD4	Camundongo, CT-4, IgG _{1k}	Linfócitos T auxiliares	Biotina
		Duplo-positivas (CD4 ⁺ /CD8 ⁺)	
CD8 β	Camundongo, EP42, IgG2 _{ak}	Linfócitos T citotóxicos	Biotina
CD28	Camundongo, AV7, IgG _{1k}	Linfócitos T de memória ou virgens	Biotina
TCR αβ Vβ1 (TCR2)	Camundongo, TCR2, IgG _{1k}	Linfócitos T	FITC
TCR αβ Vβ2 (TCR3)	Camundongo, TCR3, IgG _{1k}	Linfócitos T	FITC
MHC I	Camundongo, F21-2, IgG _{1k}	Todas as células nucleadas	Biotina
MHC II	Camundongo, 2G11, IgG _{1k}	Células apresentadoras de antígeno	Anticorpo primário

Quadro 1 - Anticorpos usados para detectar os antígenos de superfície celular de leucócitos e especificidade antigênica de cada anticorpo^{1*}.

¹Referências: (Chan et al., 1988; Hala et al., 1981; Lahti et al., 1991; Linsley and Ledbetter, 1993; Luhtala et al., 1997; Tregaskes et al., 1995)

²Todos os anticorpos primários por Southern Biotech

³Fitc – Isotiocianato de fluoresceína

*Anticorpos utilizados neste trabalho, e o subgrupo celular respectivo reconhecido e a conjugação ou fluoróforo. Anticorpos marcados com biotina receberam estreptavidina-FITC como marcação secundária.

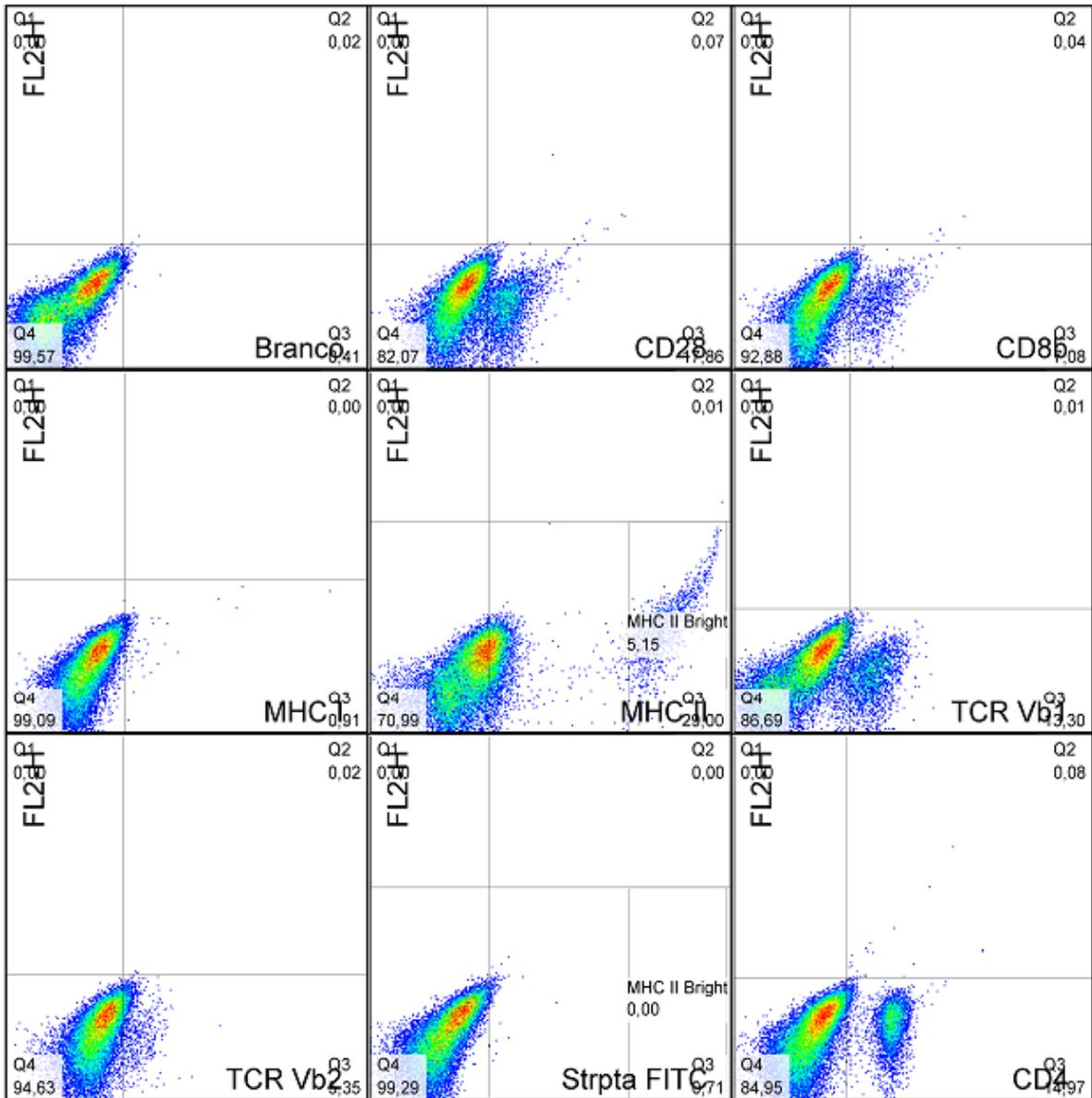


Figura 1 – Gráficos representativos da avaliação citométrica dos parâmetros imunes. Todas as amostras eram lidas no canal FL1H (nm530/30).

*FL2H – Canal de leitura (nm585/42); Strepta FITC – Conjugado de estreptavidina FITC para anticorpos primários biotilados; Células circulantes analisadas: CD4⁺, CD8 β ⁺, MHC I⁺, MHC II⁺, TCRV β 1⁺, TCRV β 2⁺ e CD28⁺.

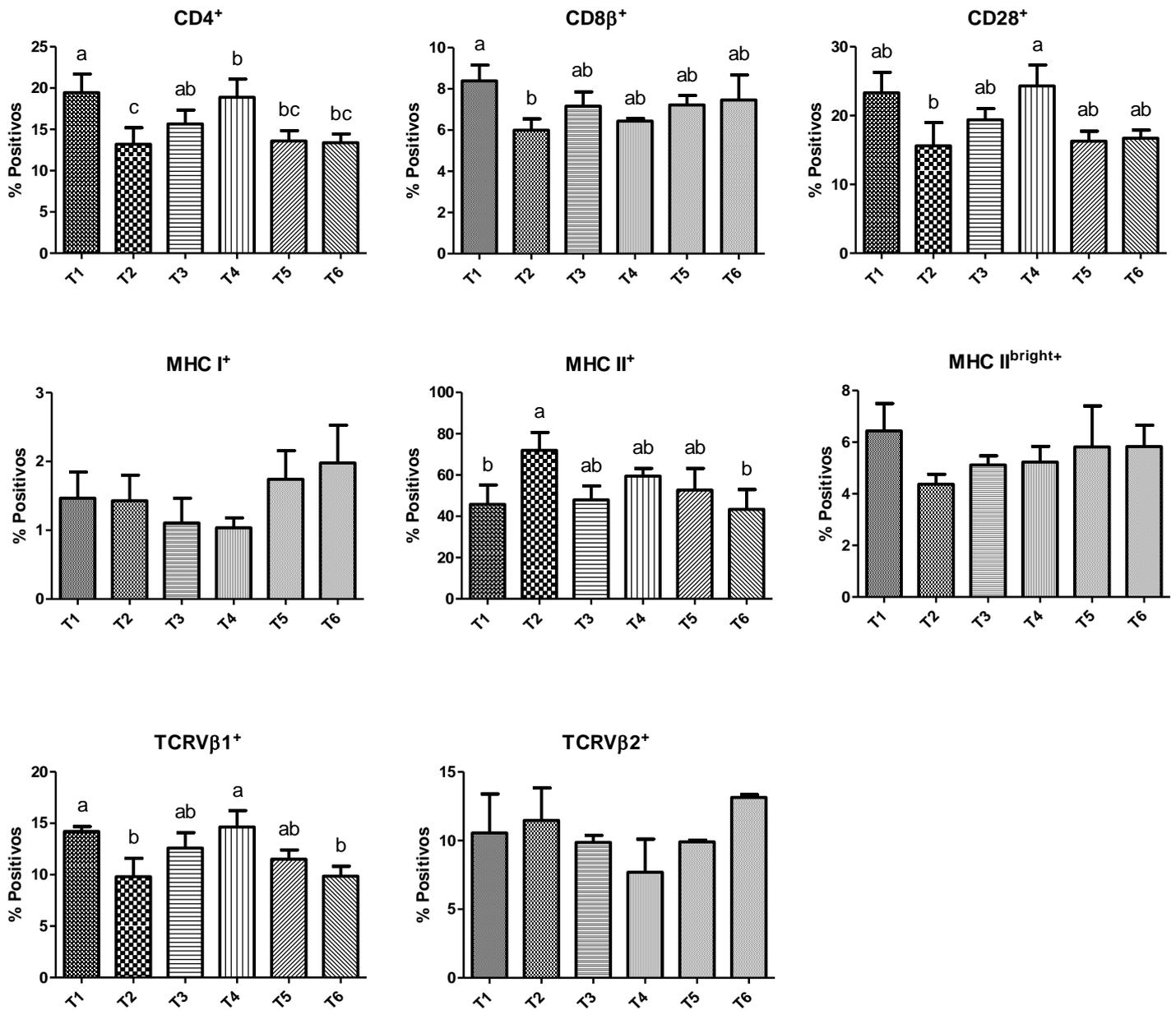


Figura 2 – Quantidade circulante dos diversos subtipos celulares estudadas neste trabalho em aves infectadas experimentalmente com *Salmonella* Enteritidis de acordo com os tratamentos.

Legenda:

(T1) Aves não desafiadas; (T2) Aves desafiadas e não tratadas; (T3) Aves desafiadas e tratadas com 200ppm de AO via ração dos 29 aos 35 dias e 1000ppm de AO via água dos 34 aos 35 dias de idade; (T4) Aves desafiadas e tratadas com 1000ppm de AO via água dos 34 aos 35 dias de idade; (T5) Aves desafiadas e tratadas com 500ppm na ração dos 29 aos 35 dias de idade; (T6) Aves desafiadas e tratadas com 400ppm de AO via água dos 34 aos 35 dias de idade. “a”, “b” e “c” indicam diferenças estatísticas entre os grupos. “ab” e “bc” indicam grupos não estatisticamente diferentes de “a”, “b” e “c”. Teste de Tukey/Kramer.

Tabela 1 - Teste Qui-quadrado (X^2) comparando o percentual de aves positivas para *Salmonella* Enteritidis nos diferentes tratamentos.

Tratamentos	Positivos/N	% de positivos
T1 - Aves não desafiadas;	0/20	0% ^b
T2 - Aves desafiadas e não tratadas;	10/20	50% ^a
T3 - Aves desafiadas e tratadas com 200ppm de AO via ração dos 29 aos 35 dias e 1000ppm de AO via água dos 34 aos 35 dias de idade;	5/20	25% ^{b, c}
T4 - Aves desafiadas e tratadas com 1000ppm de AO via água dos 34 aos 35 dias de idade;	1/20	5% ^b
T5 - Aves desafiadas e tratadas com 500ppm na ração dos 29 aos 35 dias de idade;	1/20	5% ^b
T6 - Aves desafiadas e tratadas com 400ppm de AO via água dos 34 aos 35 dias de idade;	12/20	60% ^a

^{a, b, c} Médias seguidas por letras diferentes na coluna, diferem pelo teste do X^2 . (P= 0, 0001);

N: 20 aves por tratamento, total: 120 aves.

3. CAPÍTULO II

DETECÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE *SALMONELLA* spp. EM AVES INFECTADAS NATURAL E EXPERIMENTALMENTE.

F. Flores¹, M. Lovato¹, C. G. Wilsmann¹, F. L. Gazoni¹, F. Silveira¹, G. Werle¹

Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil¹

RESUMO

As aves domésticas são os maiores reservatórios de *Salmonella* spp. existentes na natureza sendo frequentemente relatadas em produtos de origem aviária e estão amplamente relacionadas com infecções alimentares em humanos. O método de diagnóstico padrão leva em torno de sete dias para ser elaborado, dificultando ações que visem seu controle, além da dificuldade de trabalhar níveis de tolerância zero para esse patógeno. Por isso a implementação de técnicas microbiológicas de quantificação e técnicas moleculares que ajudem a avaliar o risco e acelerar o processo têm sido estudadas. Este trabalho teve como objetivo avaliar o comportamento de amostras de aves naturalmente infectadas com *Salmonella* spp. e artificialmente infectadas com *Salmonella* Enteritidis frente aos métodos de diagnósticos microbiológico padrão qualitativo, quantitativo e pela Real-time PCR (qPCR) utilizando caldos seletivos como veículo. Esta pesquisa foi desenvolvida em dois experimentos: A e B. O experimento “A” foi realizado em granja comercial na qual foram avaliadas aves infectadas com *Salmonella* spp. Os sorovares existentes foram sorotipificados e submetidos a testes de suscetibilidade frente a antimicrobianos. Os resultados foram *Salmonella enterica* subesp Enterica sorovar Enteritidis (SE) e *Salmonella enterica* subesp Enterica sorovar Senftenberg (SS). A SE e SS apresentaram múltipla resistência antibiótica à penicilina, eritromicina, lincomicina e oxaciclina. A SE foi inoculada em 120 aves para a realização do experimento “B”. Para os dois testes as amostras foram submetidas ao diagnóstico padrão qualitativo e quantitativo, bem como a Real-time PCR a partir do caldo Rappaport-Vassiliadis (RV) e Tetrionato (TT), sendo estabelecido um teste quantitativo padrão. Os resultados de qPCR demonstraram não haver diferença na utilização dos caldos para o diagnóstico molecular. A técnica de qPCR para estas condições de experimento manteve índices de detecção satisfatória porém apresentou menor sensibilidade quando comparada ao teste padrão recomendado para isolamento de *Salmonella* spp.

Palavras Chave: microbiologia, biologia molecular, quantificação de *Salmonella* spp.

INTRODUÇÃO

As doenças entéricas se tornaram nos últimos anos um dos maiores desafios para a avicultura industrial mundial, acarretando perdas de produtividade, aumento de mortalidade entre as aves e a contaminação de alimentos para o consumo humano.

As aves domésticas são os maiores reservatórios de *Salmonella* spp. existentes na natureza. Elas são frequentemente relatadas em aves e produtos de origem aviária, particularmente devido ao sistema de produção em confinamento ao qual são submetidas e aos programas nacionais para isolamento e identificação de *Salmonella* spp. (YAO et al. 2011).

A carne de aves pode ser contaminada com *Salmonella* spp. quando o conteúdo gastrointestinal entra em contato com a carcaça durante seu processamento. O maior enfoque do controle desta bactéria está voltado à saúde coletiva. Os surtos de infecção alimentar em humanos por *Salmonella* podem ser causados por vários sorotipos. No entanto, o isolamento de *Salmonella* Enteritidis, seja em humanos ou aves, aumentou sensivelmente, atingindo índices superiores a 50% das ocorrências em muitos países (ANDREATTI FILHO 2006). Hoje diversos sorotipos estão presentes na cadeia avícola, no entanto SE ainda se mantém em altos índices (BORGES 2011).

Na cadeia de produção avícola a detecção de *Salmonella* spp. deve ser realizada a partir de amostras de fezes, órgãos internos, ovos, embriões de aves doentes ou portadoras sem sintomas, *swabs* de superfície e de arrasto, rações e matérias primas. O monitoramento do ambiente em que as aves vivem serve para detectar precocemente a infecção do lote (CHARLTON et al. 2005).

A legislação para *Salmonella* possui normas diferentes para os países que levam em consideração os sorotipos existentes e sua importância na região, bem como ao impacto na saúde coletiva. A norma em vigência no Brasil (BRASIL 2002), e na União Européia no que se refere à qualidade microbiológica de alimentos preconiza a ausência do *Salmonella* spp. em 25g de produto. No entanto já foi demonstrado que este patógeno possui várias fontes de entrada e que está continuamente presente na produção, mesmo com todos os programas de controle sendo executados, na qual não é possível se estabelecer tolerância zero, tornando razoável o estabelecimento de objetivos para redução dos níveis de contaminação em toda cadeia produtiva e, assim, ser possível reduzir os casos de contaminações em humanos, como ocorreu em outros países a exemplo da Dinamarca (NASCIMENTO 2010). Desde 2009 o

método de quantificação para controle de *Salmonella* e *Campylobacter* em carne de frangos vem sendo trabalhado em diversos segmentos e em órgãos responsáveis como a FAO e a OMS, para estabelecer o diagnóstico, a fim de reduzir riscos à saúde do consumidor e atribuir melhores programas de controle deste patógeno (UYTTENDAELE et al. 1998, DUFRENNE et al. 2001, FAO/WHO, 2009, BORSOI et al. 2010).

O processo de detecção convencional da salmonela envolve as etapas de pré-enriquecimento, enriquecimento seletivo, plaqueamento seletivo, tipificação bioquímica, identificação de sorogrupo e sorotipos. A inclusão ou omissão de alguma destas etapas durante o processo de isolamento devem ser testadas (CHARLTON et al. 2005), no entanto podem acarretar prejuízos na detecção. Para o processo completo são necessários pelo menos sete dias para confirmar um resultado positivo e três a quatro dias para fornecer um resultado negativo (MACIOROWSKI et al. 2005). Existem meios de cultura auxiliares que visam acelerar algumas etapas como a utilização do Semi-Sólido Modificado Rapaport-Vassiliadis (MRSV) e métodos que aumentam a capacidade de isolamento como o duplo enriquecimento (DSE) (VOOGT et al. 2001).

A necessidade de medidas imediatas no controle de enfermidades tornou a reação em cadeia da polimerase (PCR) uma poderosa ferramenta no diagnóstico microbiológico. A padronização dos métodos de detecção de agentes de importância para a cadeia produtiva pela PCR deverá cumprir vários critérios desde a acurácia analítica e de diagnóstico, probabilidade de alta detecção, robustez, baixa contaminação, e aceitação por protocolos de fácil aplicação e interpretação (MALORNY 2005).

Contudo, com o passar do tempo as técnicas moleculares avançaram e existe disponível a técnica denominada PCR em Tempo Real (qPCR) que combina os processos de amplificação e detecção num mesmo equipamento, além da capacidade de quantificação dos micro-organismos presentes na amostra. Toda a análise consiste em aproximadamente 24h-48h, em contraste com os sete dias de cultura pelo método tradicional (CHEN et al. 2010).

Segundo Seo et al. (2004) a qPCR se mostrou rápida e muito sensível para ensaios de detecção e quantificação em amostras de 15 *pools* de ovos com baixas concentrações de *Salmonella* Enteritidis, quando comparados aos meios de isolamento tradicionais. Em contrapartida, há poucos estudos sobre o diagnóstico por qPCR para detecção de salmonela em espécimes biológicas utilizadas para o controle da cadeia produtiva avícola. De acordo com Koerich (2007), resultados utilizando a qPCR foram obtidos em dois dias, demonstrando ser uma técnica mais rápida e mais fácil de realizar quando comparadas com o MSRV e DSE que levam quatro a seis dias, além disso, apresentando sensibilidade e acurácia superior aos

demais testes em amostras de propés, órgãos, fundos de caixas sujos com mecônio e pó dos aviários.

Este trabalho teve como objetivo comparar os métodos de diagnósticos microbiológico padrão qualitativo, quantitativo e qPCR em amostras de aves naturalmente infectadas com *Salmonella* spp. e artificialmente infectadas com *Salmonella* Enteritidis.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta das amostras

Experimento A:

Foi selecionada uma granja de frangos de corte, com *swab* de arrasto positivo para *Salmonella* spp. segundo metodologia empregada pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) (BRASIL 1995b), na qual foram coletadas amostras através de *swabs* cloacais aos 22 dias de idade. A identificação das aves positivas foi realizada com laque colocado na perna da ave.

As aves foram divididas em três grupos para a avaliação da eficácia de ácidos orgânicos (AO) via água na redução de *Salmonella* spp., porém neste trabalho foi abordado apenas os métodos de diagnóstico empregado para detecção, não levando em consideração os resultados dos AO. O tratamento 1 (T1) foi o controle positivo de frangos infectados com *Salmonella* spp. O tratamento 2 (T2) foi de frangos infectados e tratados dos 32 aos 42 dias de idade com 400ppm de AO via água e o tratamento 3 (T3) foi de frangos tratados dos 35 aos 42 dias com 450ppm de AO via água.

As análises qualitativas e quantitativas de *Salmonella* spp. para este estudo foram realizadas a partir de amostras coletadas aos 22 e 32 dias de idade das aves através de *swab* cloacal.

Experimento B:

O experimento foi conduzido no bloco experimental do Laboratório Central de Diagnóstico de Patologias Aviárias (LCDPA) localizado no Biotério Central da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Brasil, em que 120 fêmeas de corte, de um dia de idade da linhagem cobb foram alojadas em baterias.

O desenho experimental foi composto pelos seguintes tratamentos: (T1) aves não desafiadas; (T2) aves desafiadas e não tratadas; (T3) aves desafiadas e tratadas com 200ppm de AO via ração dos 29 aos 35 dias e 1000ppm de AO via água dos 34 aos 35 dias de idade; (T4) aves desafiadas e tratadas com 1000ppm de AO via água dos 34 aos 35 dias de idade; (T5) aves desafiadas e tratadas com 500ppm na ração dos 29 aos 35 dias de idade e (T6) aves desafiadas e tratadas com 400ppm de AO via água dos 34 aos 35 dias de idade e tratamento.

A dieta utilizada foi à base de milho e farelo de soja ausente de drogas antimicrobianas. Os frangos foram inoculados com um 1mL na concentração de $1,0 \times 10^8$ UFC/mL via oral no 1º e 2º dia de idade com *Salmonella* Enteritidis (SE) isolada do experimento “A”.. As aves foram eutanasiadas e necropsiadas aos 35 dias de idade e as tonsilas cecais foram coletadas assepticamente para análises microbiológicas.

Comitê de ética e bem estar animal

O projeto foi registrado e aprovado pelo Comitê de Ética e Bem-Estar Animal da UFSM sob o número 016/2010.

Análise bacteriológica

A análise de *Salmonella* spp. para ambos os experimentos foi qualitativa segundo a metodologia para *Salmonella* spp. (BRASIL 1995b, BRASIL 2003) e quantitativa, utilizando as técnicas encontradas na literatura (BORSOI et al. 2010) com modificações que visaram seu aperfeiçoamento, sempre em triplicatas.

Para este experimento utilizamos os caldos seletivos citados pela portaria número 126 do MAPA (BRASIL 1995) incubados a 41°C. A partir deles retirou-se alíquotas para posterior análise de qPCR.

Método qualitativo

O *swab* cloacal e/ou 2g das tonsilas cecais foram colocadas em caldo de pré-enriquecimento não seletivo água peptonada¹ 1% (37°C/24h) na proporção 1:10 e após incubação 1mL foram transferidos aos tubos contendo 9mL de caldo seletivo Tetrionato¹ (TT) acrescido de solução verde brilhante e iodo-iodeto (37°C/24h), e mais 100µL aos tubos contendo 9mL caldo seletivo Rappaport- Vassiliadis¹ (RV) (42°C/24h) seguida de semeadura em ágar verde brilhante¹(VB) e ágar xilose lisina desoxicolato (XLD)¹ (37°C/24h). Após foi observada a presença ou ausência de colônias com características fenotípicas de *Salmonella* spp., e submetidas à análise bioquímica em ágar tríplice de açúcar e ferro¹, ágar lisina-ferro¹, meio sim¹ (*sulphide indol motility*), caldo uréia¹ e citrato de Simmons¹.

Método quantitativo

Foram utilizadas as amostras dos experimentos “A” para a realização de testes laboratoriais para quantificação de *Salmonella* spp. visando estimar as UFC/g através das diluições pelos seguintes protocolos: “A” a amostra foi colocada em água peptonada tamponada¹ 1% (AP 1%) (37°C/24h). Foram preparados cinco tubos com 9mL de solução salina 0.85% para cada amostra e realizadas sucessivas diluições de 1mL a partir da AP, plaqueando 100µL em meio XLD¹ pelo método de semeadura em bastão (*spread plate*) e incubadas por 24 horas a 37°C e depois realizada a leitura das placas, estimando a formação de colônias características para *Salmonella* spp. Para o protocolo “B” foram preparados cinco tubos com 9mL de AP 1% para cada amostra, diluindo 1mL de cada amostra para tubos e incubados por 24 horas. Depois de incubado, foi pipetado 1mL dos tubos de diluição para caldo RV¹ e estes foram incubados a 42°C por 24 horas. O plaqueamento foi realizado em XLD por estria e foram incubados a 37°C por 24 horas. O protocolo “C” seguiu o descrito em “B”, porém foram acrescentados cinco tubos com 9mL de caldo TT¹ com 10% de solução Verde Brilhante¹ (VB) e duas gotas de iodo cada, seguindo metodologia utilizada para presença e ausência descrita em pelo MAPA (BRASIL 1995b) que se baseia em dois caldos de enriquecimento e dois meios sólidos. Pipetou-se 1mL de AP 1% para os caldos de enriquecimento e incubadas a 42°C por 24 horas. Após, foram plaqueadas as amostras por estria em ágar XLD e VB respectivamente, incubados a 37°C por 24 horas. No protocolo “D” foram realizadas cinco diluições de 1mL em AP 1% e incubados por 24 horas a 37°C. Foi transferido 100µl das diluições para o caldo RV¹ e incubados por 24 horas a 42°C sendo plaqueados em XLD¹ por três diferentes métodos: Profundidade (*pour plate*) e bastão (*spread*

plate) testados nas concentrações 20, 50, 100µL e 1mL e em estria com alça de platina. Todos os testes foram acompanhados com um controle positivo utilizando a ATCC 13076.

Após os resultados de quantificação obtidos nas amostras de *swab* de arrasto e cloacal do experimento “A” foi avaliado o protocolo que apresentou melhor resultado e este foi aplicado nas amostras de tonsilas cecais do experimento “B”.

Tipificação e análise da suscetibilidade a antimicrobianos

A sorologia foi realizada como anticorpo polivalente “O” (Difco) e posteriormente as amostras foram enviadas ao laboratório de Enterobactérias da Fundação Oswaldo Cruz para tipificação final.

Os sorotipos tipificados foram submetidos ao teste de sensibilidade a antimicrobianos através do método de difusão de discos em ágar Mueller - Hinton, preconizado pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2007).

As zonas de inibição foram medidas em milímetros e o biotipo foi classificado como resistente, intermediário ou sensível ao antimicrobiano testado. Foi considerado múltiplo resistente quando o sorotipo apresentou resistência em dois ou mais agentes. Os antimicrobianos avaliados foram: ampicilina (10µg), ácido nalidíxico (30µg), colistina (10µg), gentamicina (10µg), cloranfenicol (30µg), enrofloxacina (5µg), penicilina (10U), eritromicina (15µg), lincomicina (2µg), oxaciclina (1µg) e tetraciclina (30µg).

Análise por Biologia Molecular

PCR em tempo real - qPCR

Em todas as etapas de enriquecimento seletivo as amostras foram alíquotadas em criotubos de 2,0mL e congeladas a -20°C até o momento da extração do DNA. As amostras de DNA bacteriano foram extraídas pelo *Kit* NewGene prep^{TM(2)} e posteriormente purificado com o *kit* NewGene preamp^{TM(2)}. A amplificação para reação de qPCR foi realizada pelo *kit* Newgene SALamp^{TM(2)}, todos produzidos pela Simbios Biotecnologia⁽²⁾.

Para a detecção de *Salmonella* spp. os oligonucleotídeos e sonda foram sintetizados a partir da sequência do gene *invA*. O mastermix contém além dos oligonucleotídeos a sonda TaqMan. Os corantes utilizados foram FAM como *Reporter* e MGB como *Quencher*. Todos os componentes citados fazem parte do kit comercial utilizado.

Para a reação de Real-Time PCR foi adicionado nos poços aproximadamente 28µL de reação, contendo Taq polimerase tampão, dNTP's, água, *primers* e sonda. Na placa de amplificação foi aplicado 2µL de amostra.

A reação de Real-time PCR foi realizada no equipamento específico (Applied Biosystems Step one Plus thermo 7300) nas seguintes temperaturas e ciclos: desnaturação inicial por 95°C por 3 min. seguidos por 40 ciclos de desnaturação de 95 °C por 15 segundos e anelamento de 60 °C por 1 minuto. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com indicações do fabricante². Foram testadas amostras de presença e ausência nos caldos seletivos RV e TT oriundas de *swab* cloacal (experimento A) e de tonsilas cecais (experimento B), bem como as amostras resultantes do método microbiológico quantitativo, diluídas em caldo RV do experimento A.

O DNA de todas as amostras analisadas incluindo os controles da técnica foram quantificados através do NanoDrop™ 1000 *spectrophotometer* (Thermo Scientific) em ng/μL, levando em consideração também o grau de pureza das amostras.

Análise estatística

A proporção de amostras positivas e negativas para cada tratamento nos experimentos A e B para os diferentes métodos foi calculada através do teste de Qui-quadrado (X^2) com diferença significativa de 5% ($P < 0,05$) utilizando o programa SAS 9.2 de 2010.

Procedimentos padrões foram utilizados para calcular a sensibilidade e especificidade do qPCR. A precisão foi calculada através da soma de positivos - positivos e negativos - negativos, expresso em porcentagem (MYINT et al. 2006).

Nas tabelas de número 6 e 8 estão descritos os resultados do teste microbiológico considerado como padrão-ouro. As amostras foram classificadas como positivas em pelo menos dois tipos de testes conforme os seguintes critérios: A) Microbiológico: identificação de qualquer colônia compatível com *Salmonella* spp. seja presença e ausência ou no método quantitativo; B) Real-time PCR: amplificação em qualquer uma das três análises (caldo RV, TT e quantitativo em caldo RV).

RESULTADOS

Os resultados dos protocolos utilizados para estimar a UFC/g foram os seguintes: protocolo “A” apresentou dificuldades para leitura, pois houve muito crescimento de *Escherichia coli*, inibindo o crescimento de colônias de *Salmonella* spp. assim obteve-se 20% de amostras positivas com UFC/g estimadas.

O protocolo “B” conseguiu diminuir o crescimento de *E. Coli*, havendo um aumento no número de amostras que foram positivas para *Salmonella* spp., sendo possível quantificar aproximadamente 36.6% de amostras positivas.

O protocolo “C” onde foi observado colônias de *Salmonella* spp. em 100% das amostras positivas, ou seja, 45%, sendo possível realizar a contagem facilmente, chegando a um resultado confiável. As colônias cresceram preferencialmente em ágar XLD, porém concordando com as amostras semeadas em ágar VB.

O protocolo “D” obteve resultados semelhantes ao “B” quando plaqueado em estria. Observa-se que nas placas onde se utilizou o método de semeadura *pour plate* e *spread plate* a melhor quantidade de amostra nos testes foi 20µL. No entanto apresentando colônias estimáveis apenas nas placas com cultura pura (ATCC 13076), utilizada como controle positivo. Nas demais placas houve grande crescimento de *E. coli*, o que inibiu o crescimento de *Salmonella* spp. Estes dados estão expressos na tabela 3.

O protocolo “C” para o método quantitativo foi aplicado em 47 amostras do experimento “B”, dentre elas todo o grupo controle positivo e o tratamento (T6) que por sua vez apresentou maior índice de positividade, mais sete amostras suspeitas representantes de outros tratamentos escolhidas aleatoriamente. Destas 44,69% (21/47) foram positivas e 8,51% (4/47) só foram positivas no método microbiológico quantitativo apresentando crescimento até nas diluições 10^{-4} e 10^{-5} . Quanto aos resultados comparativos entre o método microbiológico de presença e ausência e o método microbiológico quantitativo não houve diferença significativa (tabela 5).

Na análise pelo teste de Qui-quadrado (X^2) dos experimentos A e B por tratamentos observou-se que para o experimento “A” só houve diferença significativa entre o método microbiológico padrão e o qPCR-RV no T3 para a primeira coleta (tabela 1). Já na segunda coleta quando se avaliou o método quantitativo microbiológico com o qPCR-RV e qPCR-TT obteve-se diferença significativa no grupo T1 e T3 entre microbiológico e qPCR-TT e para o grupo T2 entre o microbiológico e o qPCR-RV. Entre o método de qPCR-RV e qPCR-TT só

houve diferença nos grupos T2 e T3 (tabela 2). No experimento “B” só se obteve diferença significativa no grupo T2 entre microbiológico e qPCR, mas não houve diferença entre o qPCR-RV e o qPCR-TT (tabela 4).

Os resultados quanto à detecção de *Salmonella* spp. levando em consideração amostras positivas em pelo menos dois testes foram os seguintes: Experimento “A” (tabela 6) houve concordância em 32 amostras (57,14%) entre o microbiológico e o qPCR, sendo 17 casos (30,36%) positivos e 15 negativos (26,78%), indicando uma relação satisfatória, porém baixa entre as metodologias. Através do teste microbiológico tradicional detectou-se *Salmonella* spp. em 33 amostras (58,92%), sendo 17 (30,36%) confirmadas pelo qPCR. A qPCR evidenciou DNA de *Salmonella* spp. em 8 amostras (14,28%) caracterizadas como negativas pelo procedimento tradicional, sugerindo maior sensibilidade desta metodologia.

No experimento “B” (tabela 8) houve concordância em 96 amostras (80%) entre o microbiológico e o qPCR, sendo 20 casos (16,66%) positivos e 76 negativos (63,33%), indicando uma boa relação entre as metodologias. Através do teste microbiológico tradicional detectou-se *Salmonella* em 31 amostras (25,83%), sendo 20 (16,66%) confirmadas pelo qPCR. A qPCR evidenciou DNA de *Salmonella* spp. em 13 amostras (10,83%) caracterizadas como negativas pelo procedimento tradicional, sugerindo maior sensibilidade desta metodologia.

A acurácia do teste foi avaliada calculando a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VP+) e valor preditivo negativo (VP-) segundo MYINT et al. (2006). Os dados estão expressos nas tabelas 7 e 9 respectivamente.

Os resultados para a quantificação de DNA do experimento “A” foram de 10,03ng/μL em média em amostras com caldo RV e 2,26 de pureza e para o caldo TT 10,02ng/μL e 2,24. No experimento “B” obteve-se em média 23,4ng/μL para as amostras em caldo RV e 1,79 de pureza e para o caldo TT 9,15ng/μL e 2,25 de pureza.

As *Salmonella* spp. encontradas nos *swabs* cloacais coletados na granja comercial (experimento A) foram tipificadas em *Salmonella enterica* subesp Enterica sorotipo Enteritidis (SE) e *Salmonella enterica* subesp Enterica sorotipo Senftenberg (SS). Os resultados do teste de sensibilidade a antimicrobianos estão descritos na Tabela 10. A SE e SS apresentaram múltipla resistência antibiótica à penicilina, eritromicina, lincomicina e oxaciclina.

DISCUSSÃO

Existem diversas metodologias de quantificação de *Salmonella* spp. e muitas delas com resultados conflitantes o que reforça a necessidade de padronização. Sabe-se que a *Salmonella* spp. não é boa competidora e é frequentemente acompanhada por diversos micro-organismos tornando-se essencial o uso de meios de enriquecimento para seu isolamento e quantificação (BOROWSKY et al. 2007). Observou-se nestes testes que 30% e 8,51% das amostras testadas para quantificação nos experimentos A e B, respectivamente, só se desenvolveram quando tiveram mais condições de crescimento, conseqüentemente, quando se diminuiu a competição com outros micro-organismos, crescendo basicamente na diluição 10^{-4} e 10^{-5} . Esses dados evidenciam um dos grandes problemas encontrados na quantificação de *Salmonellas* oriundas de flora mista como foi observado e enfatizado quando usamos como controle da técnica uma amostra pura.

Para o presente estudo o protocolo “C” mostrou-se mais eficiente para contagem de *Salmonella* spp. com maior confiabilidade de resultados, no entanto é muito oneroso. Protocolo “B” e “D” apresentaram bons resultados e com menor custo. O melhor método de plaqueamento neste experimento foi por estriamento. O nível de Salmonelas nos alimentos geralmente é baixo (2 a 4 UFC/100g de alimento) e sua distribuição no alimento não é uniforme. Isso frequentemente pode sugerir ao produtor que os alimentos não a contêm, estando realmente contaminada (FLORES 2010). Portanto necessitamos de mais estudos para a padronização dos testes de quantificação de *Salmonella* spp. devido a sua grande importância nos métodos de diagnóstico e controle, refletindo no cenário econômico e na saúde coletiva, sempre visando as novas regras para não atribuir mais a tolerância zero e sim avaliar o risco apresentado por este micro-organismo atribuindo ao número de células bacterianas no produto em questão.

A bacteriologia convencional continua sendo a base para os protocolos de detecção de *Salmonella* (DAVIS et al. 2000) na qual os métodos mais utilizados envolvem as etapas de pré-enriquecimento, onde a amostra é incubada em um meio não seletivo para recuperar células injuriadas para uma condição fisiológica estável (MALORNY et al. 2004), geralmente utiliza-se como meio de escolha a água peptonada. Neste trabalho todas as amostras foram incubadas em água peptonada, porém no final do experimento na tentativa de recuperar algumas colônias, amostras foram submetidas também a incubação com caldo de cérebro e coração (BHI), conforme descrito na portaria nº 126 de 3 de novembro de 1995 que

recomenda o pré-enriquecimento através BHI (BRASIL 1995b) não apresentando diferenças no resultado.

O enriquecimento seletivo é necessário para o isolamento de *Salmonella* spp. a partir de amostras que contenham flora bacteriana mista, como alimentos, amostras de fezes e de necropsias. A etapa de enriquecimento seletivo visa aumentar o número de Salmonelas em relação aos outros micro-organismos presentes nas amostras (REBOLT, 2005). Este procedimento é feito após o pré-enriquecimento ou diretamente da amostra quando se suspeita que a amostra contenha um número considerável de bactérias (BACK 2002). A portaria nº 126 de, 03 de novembro de 1995 recomenda o uso dos caldos TT e RV (BRASIL 1995b).

Os primeiros testes da PCR foram desenvolvidos para detecção de salmonela a partir de bactérias isoladas. Hoje existem muitas publicações que utilizaram a PCR em material de diversas fontes. Os resultados obtidos indicam que o método é seguro e eficaz, tanto no diagnóstico quanto na avaliação do tratamento, mostrando maior sensibilidade (92%-97,4%) e especificidade (100%) do que os outros métodos de diagnóstico (ALMEIDA et al. 2009). A presença de inibidores para a técnica de PCR dificultou a aplicação direta a partir das diferentes amostras biológicas sendo necessárias algumas etapas de pré-enriquecimento e/ou enriquecimento seletivo (MYINT et al. 2006, PARKER 2011).

A obtenção da amostra de DNA genômico de boa qualidade e de quantidade adequada para a amplificação é um fator crucial para a realização da pesquisa e do diagnóstico laboratorial. É necessário considerar uma possível diminuição na sensibilidade da PCR, pois se sabe que as amostras destinadas a análise, geralmente já sofreram algum tipo de interferência externa que pode modificar a integridade e a quantidade do DNA. A temperatura mais indicada para o armazenamento do DNA deve ser aquela que proporciona maior conservação dos mesmos, devido a isso se recomenda que as amostras de DNA sejam armazenadas em temperaturas inferiores a -20°C (ALMEIDA et al. 2009) outro fator que deve ser levado em consideração é a qualidade do tampão utilizado durante a técnica.

Mesmo estando o material em freezer à -20°C e tratando-se de DNA, oscilações de temperatura (por falta de luz, utilização e manutenção do mesmo) podem resultar em ciclos de descongelamento e congelamento com conseqüente perda de material genético. O DNA das amostras submetidas ao qPCR foi quantificado após a execução do teste apresentando quantidade de DNA suficiente e um adequado grau de pureza, não interferindo nos resultados.

A qPCR têm sido utilizada nos últimos anos para a detecção de *Salmonella* spp. devido à sua rapidez, sensibilidade e precisão (TATAVARTHY 2010). Ela é baseada em um aumento da fluorescência emitida indicando a presença do alvo, monitorada em tempo

real, não requer nenhum tratamento da amostra pós-PCR reduzindo riscos de um resultado falso positivo devido à contaminação no laboratório (CHEN et al. 2010).

A acurácia do teste da qPCR avaliada neste ensaio foi relativamente menor do que a obtida em outros trabalhos utilizando outros espécimes biológicos (BOHAYCHUK et al. 2007, KOERICH 2007, MAINAR-JAIME et al. 2008, WILKINS et al. 2010a). Mas, deve-se considerar as limitações obtidas para a execução desta avaliação comparativa que foram as realizações das análises moleculares um ano e meio depois do teste microbiológico, estando às amostras congeladas nos caldos seletivos e não havendo reativação destas antes da extração, e também ao fato de que as amostras naturalmente infectadas coletadas através de *swab* cloacal poderiam ter um baixo nível de contaminação, o que foi comprovado com as diferenças de resultados entre o experimento “A” e “B”.

Amostragens com baixa concentração de salmonelas, características principalmente de amostras ambientais tais como: *swab* de arrasto e cloacal, que já estão próximos ao limite mínimo de detecção, podem apresentar resultados negativos. Observou-se que vários resultados, principalmente no experimento “A”, tinham *ciclo threshold* (C_T) elevado (>30), ou seja, com pouca quantidade de ácido nucléico. Já para o experimento “B” na qual as aves foram infectadas artificialmente com uma dose conhecida e as análises foram realizadas diretamente das tonsilas cecais a acurácia do qPCR foi próxima dos resultados encontrados na literatura (BOHAYCHUK et al. 2007, KOERICH 2007, MAINAR-JAIME et al. 2008, WILKINS et al. 2010a).

Inibidores podem interferir em diferentes níveis na técnica de PCR: lise celular, degradação ou captura de ácidos nucléicos e inativação da polimerase termoestável (AL-SOUD & RADSTRÖM 1998). A remoção de substâncias inibitórias da PCR mostrou-se essencial em materiais como sangue e fezes. Foram demonstradas que moléculas como a hemoglobina, a bilirrubina e os sais biliares, são importantes inibidores da PCR (WIDJOAMODJO 1992, FLUIT et al. 1993, LOU 1997). A alternativa para diminuir a ação dos inibidores da PCR foi à utilização de etapas de enriquecimento prévias à amplificação pela PCR. As vantagens do uso desta etapa são as diluições dos inibidores e concentração da bactéria. Atualmente, a maioria dos trabalhos desenvolvidos para pesquisa de *Salmonella* spp., considera uma ou mais etapas de enriquecimento. A água peptonada tamponada (BPW – Buffered-Peptone-Water) é um dos meios mais usados (LÖFSTRÖM et al. 2004, PARKER et al. 2011).

No entanto Myint e colaboradores (2006) relatam diminuição significativa na sensibilidade do teste de PCR convencional, quando pré-enriquecido somente com água

peptonada (85%) utilizada em comparação com a sensibilidade alcançada após um pré-enriquecimento com água peptonada e enriquecimento seletivo com RV e TT (100%). A PCR não foi capaz de detectar nenhuma amostra positiva quando o pré-enriquecimento não foi realizado. Por isso estabelece que um mínimo de 12h pré-enriquecimento e 8h de enriquecimento seletivo com TT são necessários para obter sensibilidade máxima para a detecção de *Salmonella* spp. pela PCR convencional em um limite de 100 UFC/1mL de amostra.

O trabalho de Hyeon (2010) demonstrou que tanto os caldos seletivos RV como o TT podem inibir a amplificação. Estudos que avaliaram o procedimento de isolamento de *Salmonella* spp. a partir de um *kit* comercial próprio para detecção em qPCR em caldos de enriquecimento e afirmam que a diluição na proporção de 1:10 é necessária para que não ocorra a inibição das bactérias devido as características dos meios (HEIN et al. 2006). Neste estudo acredita-se que as amostras congeladas durante 18 meses em caldos seletivos de enriquecimento RV e TT podem ter interferido nos resultados, sendo necessária uma reativação dos meios seletivos antes da extração.

Segundo Soumet (1996) a PCR realizada a partir do caldo TT não apresentou resultados satisfatórios. Em nosso estudo não houve diferença significativa na utilização do caldo RV ou do caldo TT para qPCR, porém eles apresentaram comportamentos diferentes dentro dos grupos avaliados indicando que existe uma interação do caldo com o agente e com as condições de acondicionamento, mas mais estudos devem ser realizados.

Estudos anteriores resultaram em protocolos que se tornaram padrão para a realização de um ensaio de PCR incluindo pré-enriquecimento, enriquecimento e uso de um controle interno de amplificação para indicar resultados falso-negativos, contudo pesquisas devem ser realizadas (HEIN et al. 2006, DAY 2009, PARKER et al. 2011)

No experimento “A” qPCR não detectou seis de nove amostras positivas no método microbiológico para o sorotipo Senftenberg, enquanto que todos os casos do sorotipo Enteritidis apresentaram resultado positivo pelo PCR. Uma das hipóteses para esse resultado é a ausência do gene *invA* para o sorotipo Senftenberg. Vários estudos têm utilizado com sucesso o gene *invA* para a detecção de espécies de *Salmonella* pelo qPCR (CHENG et al. 2008, GALLEGOS-ROBLES et al. 2009). No entanto, este gene de virulência é localizado na ilha de patogenicidade 1 (SPI 1) adquiridas por transferência horizontal de genes, que podem ser geneticamente instáveis ou ausentes em alguns sorotipos de *Salmonella* incluindo o sorotipo Senftenberg (GINOCCHIO et al. 1997, YAO et al. 2011).

O gene *invA* foi detectado em 630 amostras de salmonelas pertencentes a 100 sorovares diferentes, porém os sorotipos Litchfield, Saintpaul e Senftenberg foram negativos para a presença de este gene (RAHN et al. 1992). Segundo Tatavarthy (2010), é prudente incluir outros genes, além de *invA* para detecção por qPCR. E reforça que uma série de estudos têm testado outras opções incluindo *iroB*, *hilA*, *pipA*, *sopE*, *sopB* e *mgtC*. No entanto, alguns desses genes (*iroB* e *hilA*) não conseguiram detectar cepas de *Salmonella bongori* ou sorotipos de certas *Salm. enterica* subespécie I (*pipA*, *sopE*, *SopB*, *mgtC*) portanto, os genes devem ser associados quando se trata de obtenção de diagnóstico mais confiável.

Contudo, três casos do sorotipo Senftenberg foram detectáveis. Desta forma outra hipótese é que a expressão do gene seja diferente para os diversos sorotipos frente aos meios de cultivo que se encontram (YAO et al. 2011). Além disso, estudo realizado em 84 amostras de *Salmonella* Enteritidis oriundas de diferentes origens avícolas permitiu caracterizar as amostras em quatro diferentes perfis genéticos de acordo com a presença dos genes de virulência. Demonstrando que apesar de todas as cepas pertencerem ao mesmo sorotipo, houve variação na presença dos genes (BORGES 2011).

Observa-se que para o Experimento "A" 14,28% (08/60) amostras foram positivas na qPCR e negativas pelo método microbiológico e no experimento "B" 10,83% (13/120) amostras somente foram positivas pelo método molecular. Existem casos em que a bactéria não consegue ser recuperada pelo procedimento microbiológico, mas está com o DNA presente na amostra.

Muitos patógenos bacterianos são capazes de entrar em estado de dormência, onde as células não são cultiváveis, mas permanecem viáveis. Esse fenômeno foi demonstrado em *Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* e *Vibrio cholerae*. Por conseguinte, patógenos bacterianos viáveis, mas não cultivável (VNC) representam um perigo potencial à saúde e são de interesse considerável em microbiologia de alimentos, já que um lote de alimento pode ser liberado devido a não detecção de patógenos. O estado viável, mas não cultivável pode ser induzido devido a fatores extrínsecos como mudanças de temperatura, nível baixo de nutrientes, pressão osmótica, atividade de água e pH. Destes, o mais importante é a variação de temperatura. Portanto, métodos alternativos como o teste de imunoenzimático por Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA), e PCR têm sido desenvolvidos, (FORSYTHE 2002).

O conceito de micro-organismos VNC não é aceito por todos os microbiologistas. Alguns argumentam que é uma questão de tempo até que projetemos o meio de recuperação mais apropriado. Outros consideram que as células tenham se autodestruído devido a

processos oxidativos causados pelo DNA (FORSYTHE 2002). Após término das análises moleculares tentou-se recuperar através do método microbiológico, sendo 23 amostras do experimento “A” e 10 amostras do experimento “B”, mais o controle positivo de ambos os experimentos com enriquecimentos diferentes. O procedimento foi realizado tanto para o caldo RV quanto para o TT. Para o caldo RV nenhuma placa apresentou crescimento, já para o caldo TT 63,63% (21/33) amostras apresentaram colônias pequenas e transparentes em meio XLD. Estas colônias foram repicadas em Agar sangue, Agar MacConkey e XLD em aerobiose e anaerobiose e submetidas à coloração de gram. Porém não foi possível a identificação, acredita-se que possa ser um caso de micro-organismos VNC.

Segundo Dickel et al. (2005) o ELISA e a PCR foram superiores na detecção de *Salmonella* nas amostras de carne de frango contaminadas artificialmente quando comparado com o microbiológico convencional. Wilkins et al. (2010b) demonstrou em seu estudo que a qPCR foi quase comparável ao método de cultivo microbiológico, mas ambos os autores concluem que essas metodologias servem como teste de triagem para a detecção de *Salmonella*, visto que auxilia para uma determinação mais rápida das amostras negativas em grande número de amostras, principalmente quando a prevalência for baixa. No entanto como já foi discutido deve se pensar em associar mais genes e passar por um processo de enriquecimento antes da extração, independente da sua origem e do meio de cultivo onde estão acondicionados.

Entretanto, deve-se considerar que o isolamento do agente, no caso a *Salmonella*, se faz de grande importância, uma vez que a partir do mesmo realiza-se a sorotipificação dos isolados, aspecto esse de grande importância quando se considera o valor epidemiológico da determinação dos sorotipos, além da sua considerável influência na rastreabilidade dos produtos de origem animal.

Foi observada neste estudo, uma variabilidade no número de aves positivas na primeira semana de 13,33% e na segunda semana de 10% no experimento B, evidenciando o que já foi descrito por Van Immerseel et al.(2004) sobre excreção intermitente de *Salmonella* nas fezes de galinhas. Esse fato também deve ser levado em consideração no momento do diagnóstico.

A excreção fecal pode ser influenciada por fatores do hospedeiros como a imunidade individual das aves e a presença de receptores de mucosa. Fatores bacterianos como flagelos, fímbrias, lipopolissacarídeo, bem como a capacidade de aderir ao epitélio intestinal estão envolvidos (GAST 2005, DUNKLEY et al. 2009).

Há um consenso geral em que um método *standard* de tipificação de *Salmonella* é difícil de ser adaptado e a combinação de métodos de diagnóstico torna-se útil para a análise epidemiológica dos isolados (BETANCOR et al. 2004).

Análises fenotípicas e genotípicas utilizadas em conjunto são ferramentas que permitem a evolução nos estudos de fatores de virulência de cepas. A importância da *Salmonella* na saúde coletiva determina a necessidade de estudos que promovam o conhecimento da biologia, quando da infecção *in vivo* (fatores como colonização, persistência, tempo de excreção, mecanismos de evasão do sistema imune) para podermos avançar em diagnóstico e tratamento correto, mantendo pelo menos a situação controlada para este patógeno.

A resistência antimicrobiana é amplamente estudada em todos os gêneros de bactérias principalmente entre os zoonóticos como a *Salmonella*. A SE e SS foram resistentes aos fármacos representantes dos grupos β -lactâmicos, macrolídeos, lincosamidas e das tetraciclina com 44% e 55% de múltipla resistência.

Oliveira et al. (2006) encontraram 100% de resistência a ampicilina e tetraciclina nos sorotipos de *Salmonella* spp. em carcaças de frangos no estado do Ceará e sensibilidade destes a gentamicina e cloranfenicol. Duarte et al. (2009) avaliaram o perfil de resistência de 19 isolados de *Salmonella* e os resultados indicaram que 94,7% dos isolados eram resistentes à pelo menos um agente antimicrobiano e enfatiza a necessidade de testes de suscetibilidade antes do uso destes agentes.

Desde o início dos anos de 1990, tem ocorrido um aumento drástico na resistência da *Salmonella enterica* aos antimicrobianos (CDC 2010). A SE emergiu como um grande problema avícola e de saúde coletiva no Brasil a partir de 1993 quando o uso indiscriminado de antibióticos, utilizados de forma profilática, metafilática e terapêutica em aves promoveram o surgimento de variantes ou linhagens com múltipla resistência antibiótica (SILVA e DUARTE, 2002), como observado neste trabalho. Entretanto, o uso destas drogas como medida preventiva tem sido questionada devido aos extensos relatos surgiram sobre a resistência e alternativas vem sendo estudadas (PARRY 2003). A tendência atual é que esses índices de resistência diminuam, pois já existe uma maior conscientização da utilização racional na produção avícola a fim de atender o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes.

A SE em produtos avícolas é o principal sorotipo responsável pelas infecções humanas e tem mostrado sensibilidade à maioria dos antibióticos de uso comum em avicultura, incluindo as quinolonas. Entretanto, o aumento da resistência antimicrobiana e a múltipla

resistência também têm sido observados em cepas de origem humana (CLSI 2007, CDC, 2010).

CONCLUSÕES

- Para o presente estudo o protocolo de quantificação utilizando diluições nos caldos RV e TT com posterior plaqueamento em XLD e VB mostrou-se mais eficiente para contagem de *Salmonella* spp. com maior confiabilidade de resultados, no entanto é bastante oneroso;

- Os resultados demonstraram não haver diferença na utilização dos caldos seletivos Rappaport-Vassiliadis e Tetracionato para o diagnóstico molecular, porém evidenciaram um comportamento diferente dependendo da amostra;

- Para o qPCR mesmo as amostras estando em caldo seletivos um processo antes da extração deverá ser adicionado para recuperar as células inviáveis;

- O qPCR com o gene *invA* não detectou todas as amostras positivas do sorotipo Senftenberg;

- A técnica de qPCR para estas condições de experimento manteve índices de detecção satisfatória mesmo quando as amostras foram submetidas ao congelamento durante um ano e meio, porém apresentou menor sensibilidade quando comparada ao teste padrão.

- Para a detecção de bactérias VNC a qPCR foi a melhor opção.

- As técnicas para diagnóstico de *Salmonella* spp. devem ser associadas para obtenção de resultados satisfatórios, levando em consideração cada amostra em particular;

- As *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Senftenberg isoladas apresentaram resistência de 44% e 55% respectivamente frente aos 11 agentes antimicrobianos testados. Ambos os sorotipos apresentaram múltipla resistência à penicilina, eritromicina, lincomicina e oxaciclina

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, G.C., et al., Detecção da degradação do DNA genômico extraído através da espectrofotometria e da reação de PCR. **7ª Amostra Acadêmica Unimep**, Piracicaba Nov. 2009.
- AL-SOUD, W. A., RADSTROM, P. Capacity of nine thermostable DNA polymerases to mediate DNA amplification in the presence of PCR-inhibiting samples. **Applied Environmental Microbiology**, v. 64 p. 3748-3753, 1998.
- ANDREATTI FILHO, R. L. Alimentos funcionais na produção avícola. **Saúde aviária e doenças**. São Paulo: Rocca Cap.6, p. 41-51, 2006.
- BACK, A. **Manual de doenças das aves**. Cascavel, p. 61-76, 2002.
- BETANCOR, L., et al., Random amplified polymorphic DNA and phenotyping analysis of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis isolates collected from humans and poultry in Uruguay from 1995 to 2002. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42(3), p.1155-1162, 2004.
- BOHAYCHUK, V.M., et al., A real-time PCR assay for the detection of *Salmonella* in a wide variety of food and food-animal matrices. **Journal of Food Protection**, v. 70(5), p.1080-1087, 2007.
- BORGES, K. A., Pesquisa de genes associados á virulência em cepas de *Salmonella* Enteritidis através da técnica da Reação em cadeia de polimerase. UFRGS, Porto Alegre, 2011. **Dissertação de Mestrado** - Faculdade de Veterinária. Programa de pós –Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, RS- BR, 2011.
- BOROWSKY, et al., Estimation of most probable number of *Salmonella* in minced pork samples. **Brasilian Journal of Microbiology**, v38, p. 544-546 ,2007.
- BORSOI, A., et al., Número mais provável de *Salmonella* isoladas de carcaças de frango resfriadas. **Ciência Rural**, v.40, n.11, p. 2338-2342, 2010.
- BRASIL, Ministério da Agricultura e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Instrução Normativa 08 de 23 de janeiro de 1995**. Método analítico de carcaça de aves e pesquisa de *Salmonella*. In: Diário da República Federativa do Brasil. Brasília, 1995a.
- BRASIL, Ministério da Agricultura e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Instrução Normativa 126 de 03 de novembro de 1995**. Normas de credenciamento e monitoramento de laboratórios de diagnóstico das Salmoneloses aviárias (*S. Enteritidis*, *S. Gallinarum*, *S. Pullorum* e *S. Typhimurium*). In: Diário da República Federativa do Brasil. Brasília, 1995b.
- BRASIL, Ministério da Agricultura e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Instrução Normativa número 03, de 9 de janeiro de 2002**. Normas Técnicas para Controle e Certificação de Núcleos e Estabelecimentos Avícolas, como Livres de *S. Gallinarum* e de *S. Pullorum* e Livres ou Controlados para *S. Enteritidis* e para *S. Typhimurium*. In:Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 2002.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria da defesa Agropecuária. **Instrução Normativa SDA N.62, de 26 de agosto de 2003**. Métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. In: Diário da República Federativa do Brasil. Brasília, 2003.

CDC, Preliminary Food Net Data on the Incidence of Infection with Pathogens Transmitted Commonly Through Food – 10 States, 2009. United States of America, v.59, n.14, p.418-422, 2010. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/mmwr/pdf/wk/mm5914.pdf>>. Acesso em: dez. 2010.

CHARLTON, B.R., et al., Comparison of *Salmonella* Enteritidis-specific polymerase chain reaction assay to delayed secondary enrichment culture for the detection of *Salmonella* Enteritidis in environmental drag swab samples. **Avian Diseases**, v. 49, p. 418-422, 2005.

CHEN, J., et al., A real-time PCR method for the detection of *Salmonella enterica* from food using a target sequence identified by comparative genomic analysis. **International Journal of Food Microbiology**, v.137 p.168–174, 2010.

CHENG, C.M., et al., and FARMER, D. Rapid detection of *Salmonella* in foods using real-time PCR. **Journal of Food Protection**, v. 71,p. 2436–2441, 2008.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility testing**; 16th informational supplement. National Committee for Clinical Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 2007.

DAVIS, P.R., et al., Comparison of methods for isolating *Salmonella* bacteria from faeces of naturally infected pigs. **Journal of Applied Microbiology**, v. 89, p.:169-177, 2000.

DAY, J.B., BASAVANA, U. and SHARMA S. K., Development of a cell culture method to isolate and enrich *Salmonella enteric* serovar Enteritidis from shell eggs for subsequent detection by Real- time PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v.75, p.5321-5327, 2009.

DICKEL, E. L. et al., Análise comparativa entre microbiologia convencional, ELISA e PCR para detecção de *Salmonella* Enteritidis, *S. Typhimurium*, *S. Gallinarum* e *S. Pullorum* em carne de frango contaminada artificialmente. **Revista brasileira Ciências Veterinárias**, v. 12, n. 1/3, p. 5-10, 2005.

DUARTE, A.M.D., et al., Occurrence of *salmonella* spp. in broiler chicken carcasses and their susceptibility to antimicrobial agents. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 569-573, 2009.

DUFRENNE, J., et al., Quantification of the contamination of chicken and chicken products in The Netherlands with *Salmonella* and *Campylobacter*. **Journal of Food Protection**, v.64, n.4, p.538-541, 2001.

DUNKLEY, K. D., et al., Foodborne *Salmonella* ecology in the avian gastrointestinal tract. **Anaerobe**, v. 15, p. 26-35, 2009.

FAO/WHO. Technical Meeting on *Salmonella* and *Campylobacter* in chicken meat. Rome, 2009. Disponível em: <<http://www.worldvet.org/node/5236>>. Acesso em: jul. 2011.

FLORES, F., VIVIAN, L.R., LOVATO, M., Os desafios da salmonelose na saúde pública – **Boletim Informativo** Ano 4 - Número 4. Centro de Ciências Rurais/DMPV, Universidade Federal de Santa Maria, 2010.

FLUIT, A.D.C., et al. Rapid detection of *Salmonellae* in poultry with the magnetic immunopolymerase chain reaction assay. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59(5), p.1342–1346, 1993.

FORSYTHE, S.J., **Microbiologia da Segurança Alimentar**. In: Porto Alegre: (Ed). Artmed, 2002.

GALLEGOS-ROBLES, M.A., et al., PCR detection and microbiological isolation of *Salmonella* spp. from fresh beef and cantaloupes **Journal of Food Science**, 74, M37–M40, 2009.

GAST, R. K., GUARD-BOULDIN, J., and 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 Diseases**, v. 49, p.382-386, 2005.

GINOCCHIO, C.C., et al., Naturally occurring deletions in the centisome 63 pathogenicity island of environmental isolates of *Salmonella* spp. **Infection and Immunity**, v. 65, p.1267–1272, 1997.

HYEON, J.Y., et al., Evaluation of PCR inhibitory effect of enrichment broths and comparison of DNA extraction methods for detection of *Salmonella* Enteritidis using real-time PCR assay. **Journal of Veterinary Science**, v.11(2), p.143-149, 2010.

HEIN, I., et al., Real-time PCR for the detection of *Salmonella* spp. in food: An alternative approach to a conventional PCR system suggested by the FOOD-PCR project **Journal of Microbiological Methods**, v. 66 (3), p. 538-547, 2006.

KOERICH, P.K.V. Detecção de *Salmonella* em reprodutoras de frango : comparação entre Real Time PCR e dois métodos microbiológicos (semi-sólido Rappaport-Vassiliadis e duplo enriquecimento). **Dissertação de Mestrado**. Programa de Pós-Graduação em diagnóstico Genético e Molecular – ULBRA. Canoas, 2007.

LÖFSTRÖM, C., et al., Rapid and Specific Detection of *Salmonella* spp. in Animal Feed Samples by PCR after Culture Enrichment. **Applied Environmental Microbiology**, v. 70(1), p. 69–75, 2004.

LOU, Q., CHONG, S. K., and FITZGERALDI, J. F. Rapid and effective method for preparation of fecal specimes for PCR assays. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35 (1), p. 281-283, 1997.

MAINAR-JAIME, R.C., et al., Estimation of the diagnostic accuracy of the invA-gene-based PCR technique and a bacteriological culture for the detection of *Salmonella* spp. in caecal

content from slaughtered pigs using Bayesian analysis. **Zoonoses Public Health**, v. 55(2), p.112-118, 2008.

MACIOROWSKI, K. G., et al., Polymerase chain reaction detection of foodborne *Salmonella* spp. in animal feeds. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 31, p.45-53, 2005.

MALORNY, B., et al., Diagnostic Real-time PCR for Detection of *Salmonella* in food. **Applied Environmental Microbiology**, v. 70(12), p.7046-7052, 2004.

MARLONY, B., HOOFFAR, J. Rapid toward standardization of diagnostic PCR testing of fecal samples: Lessons from the detection of *Salmonellae* in pigs. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p.3033-3037, 2005.

MYINT, M.S., et al., The effect of pre-enrichment protocol on the sensitivity and specificity of PCR for detection of naturally contaminated *Salmonella* in raw poultry compared to conventional culture. **Food Microbiology**, v. 23, p.599–604, 2006.

NASCIMENTO, V.P., A legislação internacional para *Salmonella* em carne de frango e suas implicações na exportação brasileira. XI Simpósio Brasil Sul de Avicultura e II Brasil Sul Poultry Fair, 6 a 8 de abril de 2010. Chapecó, SC, **Anais**, p-17-27, 2010.

OLIVEIRA, W.F., et al., Initial identification and sensitivity to antimicrobial agents of *Salmonella* sp. Isolated from poultry products in state of Ceará, Brazil. **Poultry Science**, v.8, n.3, p.193-199, 2006.

PARKER, D. W. et al., Comparison of Real- time PCR with Conventional PCR and Culture to Assess the Efficacy of a Live Attenuated *Salmonella enteric* Serovar Typhimurium Vaccine against *Salmonella enteric* Serovar Enteritidis in commercial Leghorn Chicks Vaccinated Under Field and Laboratory conditions. **Avian Diseases**, v. 55(2), p.248, 254, 2011.

PARRY, C. M. Antimicrobial drug resistance in *Salmonella enterica*. **Opinion in Infectious Diseases**, v. 16, p. 467–472, 2003.

RAHN, K., et al., Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella* Typhimurium by polymerase chain reaction as a specific method of detection *Salmonella*. **Molecular and Cellular Probes**, v. 6, p. 271 -279. 1992.

REBOLT, M. L., WILLS R. W. and BAILEY R. H., Use of secondary enrichment for isolation of *Salmonella* from naturally contaminated environmental samples. **Poultry Science**, v. 84(7), p. 992-997, 2005.

SAS Institute Inc. Version 9.2. **SAS**, Cary, NC. 2010.

SEO, K. H., et al., Rapid, specific detection of *Salmonella* Enteritidis in pooled eggs by real-time PCR. **Journal of Food Protection**, v. 67 p.864-869, 2004.

SILVA, E.N, e DUARTE, A., **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v.4 / n.2/ p. 85 – 100, 2002.

SOUMET, C., et al., Evaluation of Different DNA Extraction Procedures for the Detection of *Salmonella* from Chicken Product by Polymerase Chain Reaction. **Applied Microbiology**, n. 19, p. 294-298, 1996.

TATAVARTHY, A., Cannons A. Real-time PCR detection of *Salmonella* species using a novel target: the outer membrane porin F gene (ompF) **Applied Microbiology**, v.50, p.645-652, 2010.

UYTTENDAELE, M.R., et al., Prevalence of *Salmonella* in poultry carcasses and their products in Belgium. **International Journal of Food Microbiology**, v.40, p.1-8, 1998.

VAN IMMERSEEL, F., et al., Intermittent long-term shedding and induction of carrier birds after infection of chickens early posthatch with a low or high dose of *Salmonella* Enteritidis. **Poultry Science**, v.83, p.:1911-1916, 2004.

VOOGT, N., et al., Comparison of selective enrichment media for the detection of *Salmonella* in poultry faeces. **Applied Microbiology**, v. 32, p.89-92, 2001.

WIDJOJADMODJO, M.N., FLUIT, A.C. and TORESMA, R. The magnetic immunopolymerase chain reaction assay for direct detection of *Salmonellae* in fecal samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30(12), p.3195-3199, 1992.

WILKINS, W., et al., Examining heterogeneity in the diagnostic accuracy of culture and PCR for *Salmonella* spp. in swine: a systematic review/meta-regression approach. **Zoonoses Public Health**, v. 57 Suppl 1, p.121-134, 2010a.

WILKINS, W., et al., Comparison of bacterial culture and real-time PCR for the detection of *Salmonella* in grow-finish pigs in Western Canada using a Bayesian approach. **Zoonoses Public Health**, v. 57 Suppl 1, p.115-120, 2010b.

YAO, CHI. SU., et al., Emergence of *Salmonella enteric* Serovar Potsdam as a Major Serovar in Waterfowl Hatcheries and chicken eggs. **Avian diseases**, v. 55(2), p. 217 - 222, 2011.

Tabela 1 - Teste de Qui- quadrado (X^2) comparando a quantidade de aves positivas nos testes microbiológico qualitativo e o qPCR com os caldo seletivos rappaport-vassiliadis (RV) no experimento com infecção natural por *Salmonella* spp. por tratamento, levando em consideração a 1ª coleta de amostras por *swab* cloacal.

Tratamento	1ª coleta Presença/ ausência/N	1ª coleta qPCR-RV/N	P
T1 - Controle positivo;	9/20 ^a	4/20 ^a	0,0914
T2 - Aves infectadas e tratadas com 400ppm de AO dos 32 aos 42dias;	10/20 ^a	8/20 ^a	0,5250
T3 - Aves infectadas e tratadas com 450ppm de AO dos 35 aos 42 dias;	10/20 ^a	0/20 ^b	0,0003

^{ab} Médias seguidas por letras diferentes na linha, diferem pelo teste de X^2 ;
N: 20 aves por tratamento, total: 60 aves.

Tabela 2 - Teste de Qui- quadrado (X^2) comparando a quantidade de aves positivas nos testes microbiológico quantitativo e o qPCR com os caldo seletivos rappaport-vassiliadis (RV) e tetrionato (TT) no experimento com infecção natural por *Salmonella* spp. por tratamento, levando em consideração a 2ª coleta de amostras por *swab* cloacal.

Tratamento	2ª coleta Quantificação- Micro/N	2ª coleta qPCR RV/N	2ª coleta qPCR TT/N	P
T1 - Controle positivo;	9/20 ^a	4/20 ^{ab}	2/20 ^b	0,0312
T2 - Aves infectadas e tratadas com 400ppm de AO dos 32 aos 42dias;	9/20 ^a	3/20 ^b	9/20 ^a	0,0715
T3 - Aves infectadas e tratadas com 450ppmde AO dos 35 aos 42 dias;	9/20 ^a	5/20 ^a	0/20 ^b	0,0034

^{ab} Médias seguidas por letras diferentes na linha, diferem pelo teste de X^2 ;
N: 20 aves por tratamento, total: 60 aves.

Tabela 3 - Resultados obtidos pelo teste de Qui-quadrado (X^2) na quantificação de *Salmonella* spp. em aves naturalmente infectadas pelos protocolos A, B, C, D durante a 2ª coleta de amostras por *swab* cloacal.

	Protocolos			
	A (N=60)	B (N=60)	C (N=60)	D (N=60)
Positivos	12 ^b	22 ^a	27 ^a	20 ^a
Porcentagem %	20	36,6	45	33,33

^{a,b} Médias seguidas por letras diferentes na linha, diferem pelo teste de X^2 . P= 0,0335 **A:** AP-Solução Salina-XLD; **B:** AP- RV- XLD; **C:** AP- RV e TT - XLD e VB; **D:** AP - RV- XLD – *Pour plate, spread plate* e estria. N: 60 amostras.

Tabela 4- Teste de Qui - quadrado (X^2) comparando a quantidade de aves positivas nos testes microbiológico qualitativo e o qPCR com os caldo seletivos rappaport- vassiliadis (RV e tetrionato (TT) no experimento com infecção artificial por *Salmonella* Enteritidis por tratamento.

Tratamentos	Positivos/N Presença-ausência	Positivos/N qPCR RV	Positivos/N qPCR TT	P
T1 - Aves não desafiadas;	0/20	0/20	0/20	-
T2 - Aves desafiadas e não tratadas;	8/20 ^a	1/20 ^b	5/20 ^{ab}	0,0318
T3 - Aves desafiadas e tratadas com 200ppm de AO via ração dos 29 aos 35 dias e 1000ppm de AO via água dos 34 aos 35 dias de idade;	6/20	8/20	7/20	0,8027
T4 - Aves desafiadas e tratadas com 1000ppm de AO via água dos 34 aos 35 dias de idade;	1/20	0/20	0/20	0,3617
T5 - Aves desafiadas e tratadas; com 500ppm na ração dos 29 aos 35 dias de idade;	0/20	1/20*	0/20	0,3617
T6 - Aves desafiadas e tratadas com 400ppm de AO via água dos 34 aos 35 dias de idade;	13/20	17/20	18/20	0,1122

^{a, b} Médias seguidas por letras diferentes na coluna, diferem pelo teste do X^2 . *Amostra positiva no método microbiológico quantitativo. N: 20 aves por tratamento, total: 120aves.

Tabela 5 - Resultado de quantificação pelo protocolo C aplicado em 47 amostras do experimento com infecção artificial de *Salmonella* Enteritidis pelo teste de Qui-quadrado (X^2).

	Presença e ausência/N	%	Quantificação Protocolo C/N	%	P
T2	8/20	17,02	5**/20	10,63	0,3112
T6	13/20	27,65	10/20	21,27	0,3373
Aleatórias*	04/7	8,51	6**/7	12,76	0,2367
Total	25/47	53,19	21/47	44,69	

*04 amostras positivas T3; 01 amostra suspeita T4; 02 amostras suspeitas T5.

**Apresentaram duas amostras positivas na quantificação que não foram positivas na presença e ausência.

T2 - Aves desafiadas e não tratadas; T6- Aves desafiadas e tratadas com 400ppm de AO via água dos 34 aos 35 dias de idade;

Tabela 6 – Resultados das análises microbiológicas versus o qPCR em aves infectadas naturalmente com *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Senftenberg, incluindo amostras positivas em pelo menos dois métodos.

		Microbiológico		
		Positivo	Negativo	Total
qPCR	Positivo	17	8	25
	Negativo	16	15	31
Total		33	23	56

qPCR - Real - time PCR; Microbiológico - método padrão;

Tabela 7 – Sensibilidade, especificidade e acurácia para o ensaio de qPCR em aves infectadas naturalmente com *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Senftenberg.

Parâmetros qualitativos	%
Sensibilidade	51,5%
Especificidade	65,2%
VP+	68,0%
VP-	48,4%

(VP+) - Valor Preditivo positivo; (VP) - Valor Preditivo Negativo

Tabela 8 – Resultados das análises microbiológicas *versus* o qPCR em aves infectadas artificialmente com *Salmonella* Enteritidis, incluindo amostras positivas em pelo menos dois métodos.

		Microbiológico		
		Positivo	Negativo	Total
qPCR	Positivo	20	13	33
	Negativo	11	76	87
Total		31	89	120

qPCR - Real-time PCR; Microbiológico - método padrão;

Tabela 9- Sensibilidade, especificidade e acurácia para o ensaio de qPCR em aves infectadas artificialmente com *Salmonella* Enteritidis.

Parâmetros qualitativos	%
Sensibilidade	64,5%
Especificidade	85,4%
VP+	60,6%
VP-	87,4%

(VP+) - Valor Preditivo positivo; (VP-) - Valor Preditivo Negativo

Tabela 10- Perfil de Resistência da *Salmonella* Enteritidis (SE) e *Salmonella* Senftenberg (SS) isoladas em granja de frango de corte.

Antimicrobianos	SE	SS
1-Ampicilina	S	S
2-Ácido Nalidíxico	S	S
3-Colistina	S	S
4-Gentamicina	S	S
5-Cloranfenicol	S	S
6-Enrofloxacina	S	S
7-Penicilina	R	R
8-Eritromicina	R	R
9-Lincomicina	R	R
10-Oxaciclina	R	R
11-Tetraciclina	S	R
Total de resistentes	44%	55%

R: Resistente; S: Sensível

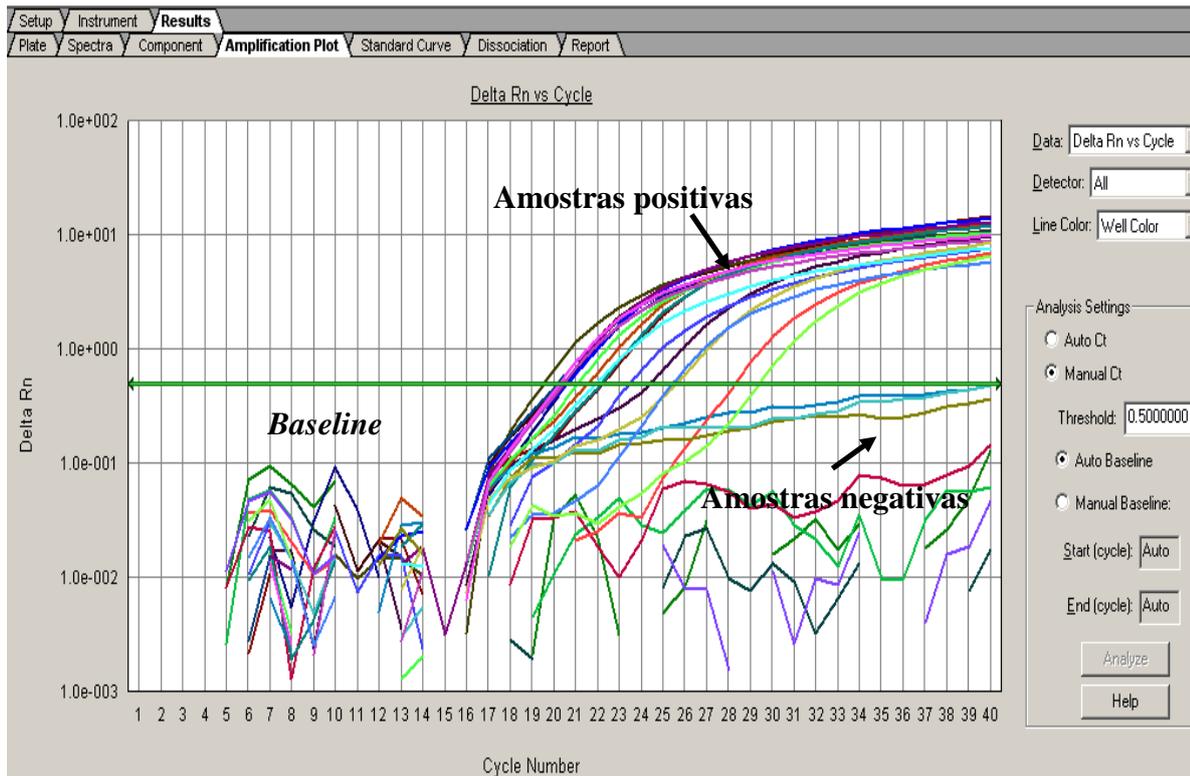


Figura 1 – Demonstrativo do gráfico gerado durante avaliação das amostras do experimento “B” - grupo T6 (Aves desafiadas e tratadas com 400ppm de AO via água dos 34 aos 35 dias de idade) por qPCR.

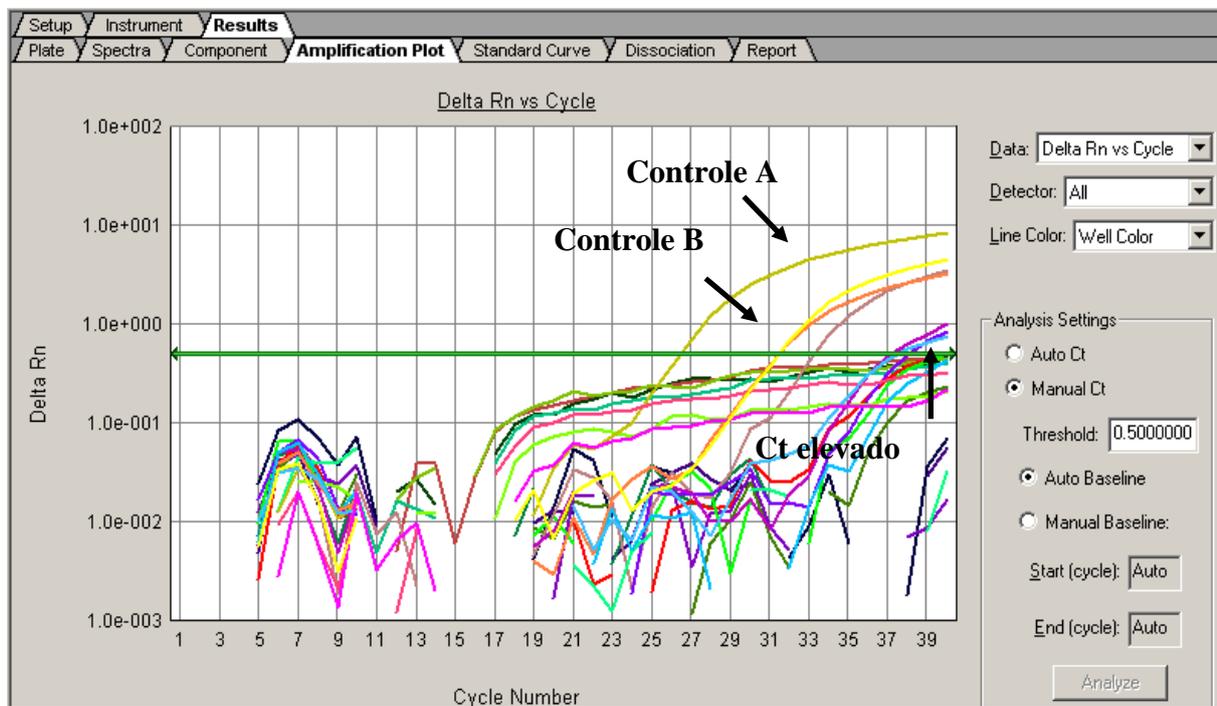


Figura 2 – Demonstrativo do gráfico gerado durante avaliação das amostras do experimento “A” - grupo T1 (Controle positivo) por qPCR.

4. CONCLUSÕES

Com este estudo conseguiu-se no primeiro capítulo demonstrar que ácidos orgânicos são eficazes na redução de *Salmonella* e elucidar parâmetros do sistema imune frente a contaminação com *Salmonella* Enteritidis. De uma forma geral o grupo não infectado T1 e grupo T4 que reduziu 95% a infecção apresentaram maior quantidade média de linfócitos T CD4⁺, CD8β⁺, MHC II^{bright+} e TCRVβ1⁺ e os grupos infectados têm maior proporção de células circulantes e um retorno gradual é observado quanto o tratamento torna-se efetivo na redução da carga bacteriana.

No segundo capítulo foi possível demonstrar a variabilidade no comportamento de amostras oriundas de infecção natural e experimental frente aos diferentes métodos de diagnóstico. Não se obteve diferença significativa entre os métodos de diagnósticos fenotípicos e genotípicos e nem entre a utilização da Real-time PCR com caldo Rappaport – Vassiliadis ou caldo Tetratonato. No entanto percebe-se que alguns cuidados devem ser tomados, com a associação de genes para o teste molecular e o enriquecimento prévio da amostra, sem falar da necessidade de utilizar métodos em associação.

5. REFERÊNCIAS

ANDREATTI FILHO, R. L., Alimentos funcionais na produção avícola. **Saúde aviária e doenças**. São Paulo: Rocca Cap.6, p. 41-51, 2006.

BACK, A. **Manual de doenças das aves**. Cascavel, p. 61-76, 2002

BEIRÃO, B.C.B., Avaliação do perfil imune de aves empregando citometria de fluxo. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal do Paraná, p. 131, 2011.

BRASIL, Ministério da Agricultura e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Instrução Normativa 126 de 03 de novembro de 1995**. Normas de credenciamento e monitoramento de laboratórios de diagnóstico das Salmoneloses aviárias (*S. Enteritidis*, *S. Gallinarum*, *S. Pullorum* e *S. Typhimurium*). In: Diário da República Federativa do Brasil. Brasília, 1995.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria da defesa Agropecuária. **Instrução Normativa SDA N.62, de 26 de agosto de 2003**. Métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. In: Diário da República Federativa do Brasil. Brasília, 2003.

CDC. Preliminary Food Net Data on the Incidence of Infection with Pathogens Transmitted Commonly Through Food – 10 States, 2009. United States of America, v.59, n.14, p.418-422, 2010. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/mmwr/pdf/wk/mm5914.pdf>>. Acesso em: dez. 2010.

CHEN, J., ZHANG, L., et al., A real-time PCR method for the detection of *Salmonella* enterica from food using a target sequence identified by comparative genomic analysis. **International Journal of Food Microbiology**, v.137 p.168–174, 2010.

CONTRERAS, M., Prevención de la salmonelosis aviar. **Albéitar Publicación para Veterinarios y Técnicos del Sector de Animales de Producción**, nº 104, p.48-49, 2007.

DIETERT, R. R.; GOLEMBOSKI, K. A.; AUSTIC, R. E. Environment-immune interactions. **Poultry Science**, v.73, n.7, p.1062-1076, 1994.

FLORES, F., VIVIAN, L.R. e LOVATO M., Os desafios da Salmonelose na saúde pública – **Boletim Informativo** Ano 4 - Número 4. Centro de Ciências Rurais/DMPV, Universidade Federal de Santa Maria, 2010.

FLÔRES, M. L., Avaliação da técnica em cadeia pela polimerase na detecção de *Salmonella* sp em ovos de galinhas artificialmente contaminados, em ovos comerciais do tipo colonial e em alimentos a base de ovos, envolvidos em surtos de infecções alimentares. **Tese de Doutorado**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001.

LOVATO, M., et al., **Doenças das Aves**, Coleção Ciências Rurais, UFSM, Santa Maria, p.167, 2009.

MENDONÇA, J. F. P., et al., Bronquite infecciosa das galinhas: Conhecimentos atuais, cepas e vacinas no brasil. **Ciência Rural**, v.39, n.8, p.2559-2566, 2009.

NADVORNY, A., FIGUEREDO, D.M.S. and SCHMIDT, V., Ocorrência de *Salmonella* sp. em surtos de doenças transmitidas por alimentos no Rio Grande do Sul em 2000. **Acta Scientiae Veterinarie**, v. 32(1), p. 47-51, 2004.

NASCIMENTO, V.P., A legislação internacional para *Salmonella* em carne de frango e suas implicações na exportação brasileira. XI Simpósio Brasil Sul de Avicultura e II Brasil Sul Poultry Fair, 6 a 8 de abril de 2010. Chapecó, SC, **Anais**, p-17-27, 2010.

OLIVEIRA, W.F., et al., Initial identification and sensitivity to antimicrobial agents of *Salmonella* sp. Isolated from poultry products in state of Ceará, Brazil. **Poultry Science**, v.8, n.3, p.193-199, 2006.

PICKLER, L., Ácidos orgânicos via água e via ração para controlar *Salmonella enterica enterica* sorovares Enteritidis e Minnesota em frangos. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal do Paraná. p. 67, 2011.

YAO, CHI, SU., et al., Emergence of *Salmonella enteric* Serovar Potsdam as a Major Serovar in Waterfowl Hatcheries and chicken eggs. **Avian diseases**, v. 55(2), p. 217 -222, 2011.