

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
DE ALIMENTOS**

**UTILIZAÇÃO DE *LACTOBACILLUS PARACASEI*
COMO PROBIÓTICO PARA O CONTROLE DE
SALMONELLA SPP EM FRANGOS DE CORTE**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Eliane Maria de Carli

Santa Maria, RS – Brasil.

2006

**UTILIZAÇÃO DE *LACTOBACILLUS PARACASEI* COMO
PROBIOTICO PARA O CONTROLE DE *SALMONELLA*
SPP EM FRANGOS DE CORTE**

Por

Eliane Maria de Carli

Dissertação apresentada no Programa de Pós-Graduação em
Ciência e Tecnologia dos Alimentos – área de concentração em
Carnes, da Universidade Federal de Santa Maria (RS), como
requisito parcial para obtenção do grau de
MESTRE em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora Leadir Lucy Martins Fries

Santa Maria, RS, Brasil.

2006

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos**

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

**UTILIZAÇÃO DE *LACTOBACILLUS PARACASEI* COMO
PROBIÓTICO PARA O CONTROLE DE *SALMONELLA*
SPP EM FRANGOS DE CORTE**

Elaborada por
Eliane M. de Carli

Como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof^a. PhD. Leadir Lucy Martins Fries – Presidente/Orientadora

Prof. Dr. Ernesto Hashime Kubota – UFSM/Santa Maria – RS

Prof^a Dr^a Maristela Lovato Flores – UFSM/Santa Maria – RS

Santa Maria, janeiro de 2006.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Eleonor e Anita, e aos amigos Arno e Gicelda por estarem sempre por perto com carinho e me incentivarem a continuar estudando e progredindo. Amo muito vocês!

Ao Rafael, pelo amor, carinho, companheirismo e apoio, que me deu força para continuar mesmo distante.

À minha orientadora Leadir Lucy Martins Fries, que foi quem me mostrou o fascinante caminho da Pesquisa, além de guiar este trabalho. Obrigada pelos ensinamentos e amizade.

Ao meu Co-orientador Nelcindo Nascimento Terra, que além de excelente professor, é um exemplo de dedicação e incentivador a pesquisa. Nunca esquecerei seus ensinamentos. Muito obrigado.

Ao Prof^o Ernesto H. Kubota que sempre esteve a disposição quando solicitado.

Aos amigos, Paulo Cezar, Ana Denise, Bibiana, Diala, Karla, Ariane, Dalvan, com quem além de trabalho dividi bons momentos de amizade.

À Prof^a Maristela Lovato Flores, obrigado pelo espaço cedido no Biotério da Medicina Veterinária. Agradeço pela recepção e simpatia com que sempre me recebia.

Aos professores e funcionários do Departamento de Tecnologia e Ciência de Alimentos, em especial à Liana Guidolin Milani pelo apoio e ensinamentos. Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, pelos ensinamentos transmitidos.

SUMÁRIO

| | | |
|---------------|--|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 10 |
| 1.1 | Objetivo geral..... | 11 |
| 1.2 | Objetivos específicos..... | 11 |
| 2 | REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 12 |
| 2.1 | Probióticos..... | 12 |
| 2.2 | Histórico dos Probióticos..... | 13 |
| 2.3 | Microflora intestinal..... | 15 |
| 2.4 | Composição dos Probióticos..... | 16 |
| 2.5 | Mecanismos de ação dos Probióticos..... | 17 |
| 2.6 | Requisitos necessários para um Probióticos..... | 17 |
| 2.7 | Estimula ao sistema imune..... | 19 |
| 2.8 | Bacterias Laticas..... | 24 |
| 2.9 | <i>SALMONELLA SPP</i>..... | 24 |
| 2.9.1 | Fatores que afetam o crescimento, a morte e/ou sobrevivência..... | 26 |
| 2.9.2 | Fontes de <i>Salmonella</i>..... | 26 |
| 2.9.3 | Dose infectante..... | 27 |
| 2.9.4 | <i>Salmonella</i> Enteritidis..... | 27 |
| 2.9.5 | <i>Salmonella</i> Enteritidis no Brasil..... | 28 |
| 2.9.6 | <i>Salmonella</i> Enteritidis em produtos avícolas..... | 29 |
| 2.9.7 | A evolução do problema <i>Salmonella</i> Enteritidis em aves no Brasil..... | 30 |
| 2.9.8 | <i>Salmonella</i> Enteritidis em rações avícolas e roedores..... | 33 |
| 2.9.9 | Dificuldades associadas a erradicação de <i>Salmonella</i> Enteritidis em aves no Brasil..... | 34 |
| 2.10 | <i>Salmonella</i> Enteritidis em alimentos e surtos de infecção alimentar no Brasil..... | 34 |
| 2.10.1 | Resistência antimicrobiana em amostras de <i>Salmonella</i> Enteritidis..... | 37 |
| 2.10.2 | Vacinação no controle de <i>Salmonella</i> Enteritidis..... | 39 |

| | | |
|------------|---|----|
| 3 | MATERIAIS E MÉTODOS..... | 41 |
| 3.1 | MATERIASI DE ESPERIMENTO..... | 42 |
| 3.1.1 | Tratamento 1..... | 42 |
| 3.1.2 | Tratamento 2..... | 42 |
| 3.1.3 | Tratamento 3..... | 42 |
| 3.2 | PROCESSAMENTO..... | 43 |
| 3.2.1 | Análises Microbiológicas..... | 45 |
| 3.2.1.1 | Contagem de bactérias lácticas..... | 46 |
| 3.2.3 | Determinação de Salmonella pelo método Tecra Salmonella imunoensaio visual (salvia)..... | 46 |
| 3.2.3.1 | Princípio do teste..... | 46 |
| 3.2.3.2 | Realização do Salvia..... | 46 |
| 3.2.3.2.1 | Tratamento térmico da amostra..... | 46 |
| 3.2.3.2.2 | Preparação das microplacas..... | 47 |
| 3.2.3.2.3 | Adição das amostras..... | 47 |
| 3.2.3.2.4 | Primeira lavagem..... | 47 |
| 3.2.3.2.5 | Adicionar o conjugado..... | 47 |
| 3.2.3.2.6 | Segunda lavagem..... | 48 |
| 3.2.3.2.7 | Adição do substrato..... | 48 |
| 3.2.3.2.8 | Adição da solução Stop..... | 48 |
| 3.2.3.2.9 | Leitura dos resultados..... | 48 |
| 3.2.3.2.10 | Confirmação dos resultados positivos presuntivos..... | 49 |
| 4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 51 |
| 4.1 | Ganho de peso dos pintos..... | 58 |
| 5 | CONCLUSÕES..... | 61 |
| | REFERÊNCIAS..... | 62 |

LISTAS DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Amostras positivas e negativas na detecção de <i>Salmonella</i> spp pelo Método Convencional em pintos com 45 dias, tratados com <i>Lactobacillus paracasei</i> na água de bebida + pulverização do ambiente e inoculação esofágica de <i>Salmonella</i> Enteritidis..... | 54 |
|--|----|

LISTAS DE ILUSTRAÇÕES

| | | |
|--------------|---|----|
| Fotografia 1 | Necropsia dos Pintos..... | 43 |
| Fotografia 2 | Retirada do Cecon..... | 44 |
| Fotografia 3 | Coleta do Cecon..... | 44 |
| Imagem 1 | Cartão de Cor..... | 49 |
| Fotografia 4 | Lesões características no fígado de presença de <i>Salmonella</i> de pintos de corte com 45 dias, tratados com <i>Lactobacillus paracasei</i> na água de bebida + pulverização do ambiente e inoculação esofágica de <i>Salmonella</i> Enteritidis. + pulverização do ambiente..... | 54 |
| Fotografia 5 | Fígado Sadio de pintos com 45 dias, tratados com <i>Lactobacillus paracasei</i> na água de bebida + pulverização do ambiente..... | 55 |
| Fotografia 6 | Cecon com hemorragia, em pintos de corte tratados com <i>Lactobacillus paracasei</i> na água de bebida + pulverização e inoculação esofágica de <i>Salmonella</i> Enteritidis. + pulverização do ambiente..... | 57 |
| Gráfico 1 | Variação de Peso de pintos com 45 dias de idade, tratados com <i>Lactobacillus paracasei</i> na água de bebida + pulverização e inoculação de <i>Salmonella</i> Enteritidis. + pulverização do ambiente..... | 58 |

RESUMO

UTILIZAÇÃO DE *LACTOBACILLUS PARACASEI* COMO PROBIÓTICO PARA O CONTROLE DE *SALMONELLA* SPP EM FRANGOS DE CORTE

AUTORA: ELIANE MARIA DE CARLI
ORIENTADORA: LEADIR LUCY MARTINS FRIES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DOS ALIMENTOS
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA, RS, BRASIL.
DATA E LOCAL DA DEFESA: SANTA MARIA, RS, 17 DE FEVEREIRO DE 2006.

A avicultura comercial tem como objetivo obter alta produtividade a baixo custo e oferecer ao consumidor produto de qualidade. Uma bactéria patogênica que tem preocupado o setor avícola nos últimos tempos é a Salmonela. Para controlar esta bactéria, foi proposto neste trabalho o *Lactobacillus paracasei*, usado como probiótico. O *Lactobacillus paracasei* poderá ser uma alternativa saudável para o uso indiscriminado de antibióticos, proibido para exportação. O presente trabalho foi realizado no Biotério da Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Federal de Santa Maria – RS. Foram utilizados pintos comerciais de corte com um dia de idade, mantidos em gaiolas de arame, sob aquecimento. Para alimentação foi fornecida ração não medicada e água. Os tratamentos foram realizados no primeiro dia de vida das aves. Administrou-se probiótico por pulverização e na água de bebida, e salmonela por inoculação endoesofágica e probiótico na água de bebida. A pulverização foi realizada com auxílio de pulverizador manual. A inoculação via endoesofágica foi realizada com auxílio de uma sonda e seringa graduada de 1ml, com 0,1ml da cultura de *Salmonella* Enteritidis para cada pintos. Para a pulverização e para a água de bebida, o inóculo continha 10^{10} UFC/ml, de *Lactobacillus paracasei* e para a via endoesofágica 10^3 UFC/ml, de *Salmonella* Enteritidis. Foram utilizados três grupos de 20 pintos, assim distribuídos: Lote 1- Controle; Lote 2 pulverização e adição de probiótico na água de bebida; Lote 3 - adição de probiótico na água de bebida e inoculação de *Salmonella* Enteritidis; A cada semana três pintos de cada lote eram retirados de cada grupo para pesagem, sacrifício e colheta do material. A presença nas fezes e a colonização dos cecos de pintos de corte por *Salmonella* Enteritidis foi acentuadamente reduzida nos grupos tratados com *Lactobacillus paracasei* (L2) por pulverização e adição na água de bebida. Com isso podemos constatar que o uso de probióticos inibe ou reduz o desenvolvimento de salmonela, no trato intestinal das aves, já que podemos constatar sua presença no Tratamento Controle (L1), em três amostras analisadas, ocorreu possivelmente devido à presença de bactérias na ração, água ou ambiente, onde as aves se encontravam. No tratamento com Adição de *Lactobacillus paracasei* na água de bebida + inoculação de *Salmonella* Enteritidis, verificamos três ausências de salmonela, no 0º, 32º, e 42º dias de tratamento. Nas amostras positivas para salmonela observamos lesões características no fígado, típica de contaminação por salmonela, esta atinge a corrente sanguínea, provavelmente de modo intracelular, e são removidas pelo fígado, baço ou medula óssea. Já no 32º e 42º ocorreram ausências de SE o que indica a capacidade inibitória do probiótico utilizado. Observamos que a inibição ocorre tardiamente. O ganho de peso do lote que recebeu *Lactobacillus paracasei* pulverizado e na água de bebida (L2) não diferiu dos demais tratamentos. Como esse mesmo tratamento não acusou a presença de SE nas fezes, enquanto nos demais grupos tratados com probiótico os índices de SE nas fezes foram detectáveis, há indicação de que a presença de *Salmonella* Enteritidis não interfere decisivamente na produtividade de frangos de corte. Embora não tenha ocorrido variação significativa entre os grupos, em relação ao peso corporal, o grupo tratado com *Lactobacillus paracasei* pulverizado e na água de bebida (L2), apresentou melhor *performance*.

Palavras-chave - *Salmonella*, Probiótico, Avicultura.

ABSTRACT

UTILIZATION OF *LACTOBACILLUS PARACASEI* AS PROBIOTIC USE TO CONTROL THE *SALMONELLA SPP* IN COMMERCIAL POULTRY

AUTHOR: ELIANE MARIA DE CARLI
 ORIENTATION: LEADIR LUCY MARTINS FRIES
 PUBLIC UNIVERSITY OF SANTA MARIA, RS, BRAZIL
 PÓST-GRADUATION COURSE IN FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY
 DATE AND PLACE OF THE DEFENSE: SANTA MARIA, RS, 17 OF FEBRUARY - 2006.

The objective of the commercial poultry keeping is getting high productivity for a low cost and offering to the consumer a product with quality. A pathogenic bacterium that has been worrying the avicola section during the last years is the *Salmonella*. To control this bacterium, it was proposed in this paper the *Lactobacillus paracasei*, used as probiotic. The *Lactobacillus paracasei* can be in the future a healthy alternative for the indiscriminate antibiotics use, forbidden for export. This assignment was carried out in the Biotery of Veterinary Preventive Medicine of the Federal University of Santa Maria – RS (Biotitic of Medicinal Preventive Veterinaries of Public University of Santa Maria – RS). Cutting commercial chicks with a day of living were used. They were remained in wire cages, with a heating system. The feeding was ration (not medicated) and water. The treatments were done in the first day of living of the chicks. It was administrated a probiotic sprayed in the water, and *salmonella* for endo-esofagic inoculation. The pulverization was done with a manual spray. The endo-esofagic inoculation was done with a probe and syringe with 1ml, with 0,1ml of *Salmonella* Enteritidis for each chick. For the pulverization and for the water, the inoculo had 10^{10} UFC/ml of *Lactobacillus paracasei* and for the endo-esofagic tract 10^3 UFC/ml of *Salmonella* Enteritidis. Three groups of twenty chicks were used, distributed as follows: Portion 1- Control; Portion 2- pulverization and addiction of probiotic in the drinking water; Portion 3 – addition of probiotic in the drinking water and inoculation of *Salmonella* Enteritidis; In each week, three chicks from each portion were withdrawn from each group to be weighed, sacrificed and for material collection. The presence in the excrements and the colonization of the cecos of cutting chicks for *Salmonella* Enteritidis was reduced significantly in the groups treated with *Lactobacillus paracasei* (P2) for pulverization and addiction in the drinking water. Therefore, we can conclude that the use of probiotics inhibits or reduce the salmonella development, in the intestinal treat of the birds, since we can constact its presence in the Treatment Control (P1) in three samples probably because of the presence of bacterium in the feed, water or environment where the birds were. In the treatment with Addiction of *Lactobacillus paracasei* in the drinking water + inoculation of *Salmonella* Enteritidis, we verified three absences of *salmonella*, in the 0; 32; and 42 days of treatment. In the positive samples for *salmonella*, we observed characteristic damages in the liver, typical of the contamination with *salmonella*, which affects the bloodstream, probably in an intracellular way, and are removed by the river, spleen or bone marrow. During the 32 and 42 days, there were absences of SE, which indicate the inhibitory capacity of the probiotic used. We observed that the inhibition occurs later. The gain of weight of the portion that received sprayed *Lactobacillus paracasei* in the drinking water (P2) did not de different of the other treatments. As this same treatment did not accused the presence of SE in the excrements, while the other groups treated with probiotic the rates of SE in the excrements were detected, there is the indication that the presence of *Salmonella* Enteritidis does not interfere decisively in the cutting chickens productivity. Although it has not occurred significant variation among the groups, related to the body weight, the group treated with *Lactobacillus paracasei* sprayed in the drinking water (P2), presented the best performance.

Keywords – Salmonella, Probiotic, poultry.

1 INTRODUÇÃO

A colonização intestinal por grande e diversificado número de bactérias é achado normal nas aves. Entre as bactérias capazes de colonizar o trato intestinal da galinha encontram-se diferentes sorovares de *Salmonella* causadores de infecções em humanos. A susceptibilidade da ave à colonização intestinal por *Salmonella* spp. é maior durante os primeiros dias de vida, reduzindo-se à medida que ocorre o crescimento da microbiota intestinal normal (NURMI & RANTALA, 1973; PIVNICK et al., 1982).

A avicultura comercial tem como objetivo obter alta produtividade a baixo custo e oferecer ao consumidor produto de qualidade. Porém, para a obtenção da alta produtividade são usados promotores de crescimento, entre eles, os antibióticos. A utilização indiscriminada tem levado ao aparecimento de populações bacterianas resistentes (FULLER, 1989), levando ao desequilíbrio na simbiose entre microrganismos patogênicos e o animal.

Torna-se evidente, portanto, a necessidade de desenvolver um produto que possa ser utilizado como substitutivo aos antibióticos, sem causar perdas de produtividade e qualidade dos produtores finais. Entre as alternativas destacam-se os probióticos, os quais são produtos constituídos por microrganismos vivos que afetam benéficamente o animal hospedeiro, promovendo o equilíbrio da microbiota intestinal (FULLER, 1989), de forma que os antibióticos possam ser utilizados quando realmente necessários.

O termo exclusão competitiva é usado para descrever a capacidade de uma microbiota impedir a colonização intestinal de outras bactérias. A administração de probióticos, compostos por microrganismos da microbiota intestinal de aves normais, pode determinar alguma proteção às aves receptoras contra a colonização por alguns patógenos, particularmente *Salmonella* spp. (ZIPRIN et al., 1993; NISBET et al., 1994; HOLLISTER ET AL., 1995; ANDREATTI FILHO et al., 1997, 1999, 2000).

São descritos vários métodos de administração da microbiota intestinal, ou seja, por meio de pulverização sobre as aves, inoculação em ovos embrionados, inoculação via cloaca, reutilização de cama, inoculação via endoesofágica e adição à ração ou à água de bebida. O inóculo pode ser obtido a partir de fezes ou de

conteúdo cecal recém-colhidos (ZIPRIN et al., 1993; NISBET et al., 1994; ANDREATTI FILHO et al., 1997, 1999, 2000).

O propósito deste estudo foi verificar o efeito do probiótico *Lactobacillus paracasei* no controle da *Salmonella* Enteritidis em frangos de corte.

1.1 Objetivo geral

- Observar o comportamento de uma cepa de *Lactobacillus paracasei* no controle da *Salmonella* Enteritidis, visando a sua utilização como probiótico.

1.2 Objetivos específicos

- Caracterizar a atividade inibitória dos *Lactobacillus paracasei* frente a *Salmonella* Enteritidis.
- Avaliar anatomicamente o cecon de frangos de corte com 45 dias de idade tratados com *Lactobacillus paracasei*, e contaminados com *Salmonella* Enteritidis.
- Verificar o comportamento do *Lactobacillus paracasei* no ganho de peso dos frangos com 45 dias de idade.
- Avaliar a eficiência do tratamento por pulverização e na água de bebida do *Lactobacillus paracasei* no controle de *Salmonella* Enteritidis em frangos com 45 dias de idade.

2 REVISÃO BIBLIOGRAFICA

A partir desta seção será discorrido o tema principal desta dissertação.

2.1 Probiótico

Lilly e Stillwell (1965) foram os primeiros a utilizar o termo probiótico, observando a ação de microrganismos como promotores de crescimento. Seguiram-se inúmeros trabalhos sobre produtos e processos com o propósito de oferecer proteção contra a infecção por patógenos intestinais e melhor desempenho zootécnico. A maioria destes produtos, compostos por culturas de microrganismos vivos, com a capacidade de se instalar e proliferar no trato intestinal do hospedeiro. Surgiram várias definições para os probióticos. Geralmente observamos a complementação das definições antecessoras, com a adequação a alguma característica peculiar. Fuller (1989) definiu probiótico como suplemento composto de microrganismos vivos que beneficiam a saúde do hospedeiro, através do equilíbrio da microbiota intestinal. Havennar et al. (1992), complementando a definição proposta por Fuller (1989), definiu probiótico como cultura pura ou composta de microrganismos vivos que, fornecidos ao homem ou aos animais, beneficiam ao hospedeiro pelo estímulo das propriedades existentes na microbiota natural. Estas definições são atualmente as mais aceitas e utilizadas no meio científico. Podemos verificar que não há espaço para antibióticos, derivados ou mesmo promotores de crescimento tradicionais no contexto destas definições.

Assim, o termo “probiótico” foi mais bem definido, inicialmente, por Füller (1983) como: organismos vivos que ingeridos exercem efeito benéfico no balanço da flora bacteriana intestinal do hospedeiro. Posteriormente, este conceito foi ampliado e, atualmente, denomina-se alimento probiótico aquele que contém microrganismos vivos que, ingeridos em determinada concentração, afetam benéficamente a saúde do consumidor, melhorando seu equilíbrio intestinal (BERNET et al. 1993).

Esses são microrganismos que, através da fermentação, transformam alguns açúcares – especialmente a lactose – em ácidos orgânicos (ácidos lático e acético). Atualmente, não subsiste qualquer dúvida acerca do papel que a microflora

colônica desempenha ao completar a digestão dos hidratos de carbono através da fermentação.

A pronta disponibilidade de antibióticos, a partir dos anos 50, resultou no uso difundido deles como agentes terapêuticos e estimulantes de crescimento para animais (FULLER, 1989). Com o tempo, percebeu-se que antibióticos, usados principalmente como promotores de crescimento, estavam causando resistência das bactérias aos antibióticos quando se fazia necessário tratamento. E mesmo aos antibióticos usados como agentes terapêuticos podiam causar transtornos intestinais, desequilibrando sua flora.

Hoje, a preocupação sobre os efeitos colaterais é clara, e tanto consumidores como fabricantes estão procurando alternativas como os produtos denominados probiótico e também os prebióticos, por não determinarem resíduos nos produtos de origem animal e não desenvolverem resistência às drogas utilizadas, por serem essencialmente naturais.

Nossos intestinos abrigam mais de 500 espécies diferentes de bactérias, que vivem em perfeito equilíbrio entre si. Muitas delas produzem enzimas que são fundamentais para a nossa saúde. Formam um sistema que é vital para o bom funcionamento do nosso organismo. Geralmente, os primeiros gêneros e espécies bacterianas que colonizam o trato intestinal persistem ao longo da vida do hospedeiro, passando a compor a microbiota intestinal. No hospedeiro, estas bactérias devem encontrar as condições propícias para a colonização e persistência, como temperatura e pH adequados e oferta de nutrientes (MILES, 1993).

2.2 Histórico dos probióticos

A história desses aditivos é conhecida há centenas de anos, mas somente no início do século passado foi estudada racionalmente e pesquisada com bases científicas. O uso de organismos probióticos surgiu no Oriente Médio, onde médicos prescreviam iogurtes e outros leites fermentados como terapêutica para afecções do trato gastrointestinal e também como estimulante do apetite.

Lilly e Stillwell (1965) foram os primeiros a utilizar o termo probiótico, verificando a ação de microrganismos como promotores de crescimento.

O marco do uso de probióticos em aves foi dado por pesquisadores finlandeses (NURNI & RANTALA, 1973). Em seus experimentos, os autores observaram que o conteúdo intestinal de aves adultas normais, administrados oralmente às aves com um dia de idade, alterava sua sensibilidade à infecção por *Salmonella* spp, prevenindo o estabelecimento desta no intestino. Esta idéia foi conceituada como "Exclusão Competitiva", tornando-se conhecida como "conceito de Nurni".

A década de 70 foi marcada pelo início do uso de um probiótico para fim animal, o *Lactobacillus acidophilus*. Este fato culminou com a preocupação, por parte das autoridades e órgãos de saúde animal internacional, com as rações animais contendo antibióticos. A preocupação resultou na interdição do uso de algumas dessas substâncias alegando que a eficácia desses componentes poderia ser diminuída quando utilizados em humanos, se administradas continuamente em animais. A União Européia, em 1997, proibiu o uso de avoparcina e, em 1998, de bacitracina de zinco, espiramicina, virginiamicina e tilosina. Os produtores europeus atualmente podem recorrer a apenas quatro promotores de crescimento: monensina, salinomina, avilamicina e flavomicina; os dois primeiros são ionóforos bastante utilizados como agentes anticoccidianos para aves, restando apenas os dois últimos como promotores de crescimento para frangos de corte e outras aves.

2.3 Microflora intestinal

As aves representam um excelente exemplo deste fenômeno, pois o ovo é retirado da mãe e eclodido em uma incubadora limpa, não havendo, portanto, o contato com a galinha. Assim, o pintinho recém eclodido adquire parcialmente sua microflora através do ambiente do incubatório, enquanto que as aves silvestres obtêm as bactérias benéficas logo após o nascimento via bico, papo ou excremento das mães. Os pintinhos provenientes de incubadoras comerciais não têm esta oportunidade e ficam susceptíveis a todo tipo de contaminação microbiana, geralmente patogênica. De acordo com Mead (2000), nas condições citadas acima, uma população bacteriana similar à do adulto está presente em duas semanas no intestino delgado e em cerca de 30 dias no ceco, em nível superior ao que ocorreria

em condições naturais. O fornecimento imediato de microrganismos vivos favorece a formação de uma microbiota saudável e equilibrada.

Gedek (1986) relatou que existe uma microflora natural no trato gastrointestinal de difícil definição e composta de aproximadamente 400 espécies em equilíbrio entre si e com o hospedeiro. A presença dessa flora intestinal normal, em equilíbrio, é tão necessária quanto benéfica para o bem estar do animal. Estima-se que 90% da microbiota seja composta por bactérias facultativas (aeróbicas/anaeróbicas) e produtoras de ácido láctico (*Lactobacillus spp*, *Bifidobacterium spp*), incluídas as bactérias exclusivamente aeróbicas como os *Bacterioides spp*, *Fusobacterium spp* e *Eubacterium spp*. Os 10% restantes desta flora são constituídos de bactérias consideradas nocivas ao hospedeiro, entre estas, a *Escherichia coli*, *Escherichia enterococci*, *Clostridium spp*, *Staphylococcus spp*, *Pseudomonas spp*, *Blastomyces spp*. O desequilíbrio, em favor das bactérias indesejáveis, resulta em infecção intestinal severa que, muitas vezes, pode ser fatal.

2.4 Composição dos probióticos

Quase todo probiótico, atualmente no mercado, é formado por lactobacilos e/ou estreptococos e, ainda, bifidobactérias, que exercem ação estritamente benéfica ao hospedeiro.

São descritos vários métodos de tratamentos utilizando-se probióticos, podendo eles ser reproduzidos na forma de cápsulas, pasta, pó ou grânulos, que podem ser usados para dosar diretamente o animal ou incluídos na sua alimentação.

A via de administração dos probióticos determina uma melhor ou pior capacidade de colonização intestinal pelas bactérias presentes no produto utilizado.

Em se tratando de animais, a administração pode ser feita diretamente na ração, adição à água de bebida, pulverização sobre os mesmos e, em se tratando de aves, inoculação via cloaca ou em ovos embrionados, através da cama usada e via intra-esofágica (ANDREOTTI FILHO et al., 1997; SCHNEITZ, 1992; ZIPRIN et al., 1993).

No trato de humanos, o mais comum é que o probiótico seja incluído a sua alimentação, suplementando os alimentos como os iogurtes, bebidas lácteas, produtos cárneos etc.

Alheia a qualquer uma das vias de administração propostas há a indicação de que os probióticos devam ser utilizados o mais precocemente possível, a fim de que as bactérias presentes no produto colonizem e se multipliquem no trato intestinal, iniciando suas atividades benéficas ao hospedeiro antes deste ser contaminado por algum patógeno. Cite-se o aleitamento materno, onde recém-nascidos amamentados com o leite da mãe possuem maiores defesas do que os não-amamentados.

Esta afirmação se confirma através da publicação de Meyer (2001), que conclui em seu trabalho que a adição de probiótico foi benéfico no desempenho de bezerros (as) aleitados (as) com sucedâneo iniciado aos 03 dias de vida. A adição de probiótico ao leite integral ou ao sucedâneo iniciado aos 15 dias de vida não apresentou efeitos, não sendo recomendada a sua prática.

Embora as bactérias lácticas tenham sido isoladas na microflora de todas as porções do trato intestinal humano, o íleo terminal e o cólon parecem ser os locais ou “nichos” preferenciais de colonização. Administrados oralmente, os organismos probióticos não podem afetar o ambiente no intestino, a menos que sua população atinja em certo número mínimo que não foi determinado exatamente, mas que se situa, provavelmente, entre 10^6 e 10^8 UFC/g do conteúdo intestinal.

2.5 Mecanismos de ação dos probióticos

O mecanismo ou mecanismos de como agem os probióticos não estão inteiramente elucidados. Especula-se que um ou mais processos, associados ou não, alterariam a atividade e a composição bacteriana intestinal. O equilíbrio entre os diferentes componentes da microbiota intestinal parece ser fundamental para o funcionamento normal e saudável da função digestiva e geral do hospedeiro. A alta incidência e o constante estresse a que estão expostas as aves em condições normais de criação, invariavelmente, podem alterar o equilíbrio intestinal e predispor as aves a diversas infecções, além de reduzir os índices de produtividade.

O meio de atuação dos probióticos no organismo se refere principalmente à inibição que estes exercem na colonização do intestino por bactérias patogênicas. Os mecanismos através dos quais os probióticos reduzem as bactérias ou bactérias patogênicas seriam: produção de substâncias bactericidas, competição por

nutrientes, alteração do metabolismo microbiano, estimulação do sistema imunológico, competição por sítios de ligação e exclusão competitiva.

2.6 Requisitos necessários para um probiótico

- Ter capacidade de se adaptar ao intestino do hospedeiro;
- Sobreviver à passagem pelo trato intestinal;
- Ter capacidade de se estabelecer no intestino delgado;
- Não deteriorar os alimentos que lhes servirão de veículo;
- Não apresentar patogenicidade;
- Ser Gram positivo;
- Ser produtor de ácido resistente;
- Deve apresentar especificidade ao hospedeiro;
- Apresentar excreção de fator anti *E coli*;
- Ser resistente a bile;
- Ser viável e estável.

Atualmente existem diversos probióticos sendo comercializados no Brasil, contemplando diversas espécies animais. Há expectativa de que este mercado se amplie, à medida que mais e mais empresas e técnicos percebam a viabilidade deste tipo de produto, especialmente na avicultura.

Há dois aspectos extremamente importante e positivo no uso dos probióticos na avicultura, ou seja, aquele que determina melhores índices zoeconômicos, como aumento no ganho de peso e melhor conversão alimentar em frangos de corte e incremento da produção de ovos em poedeiras (TORTUERO, 1973; JIN et al., 1998; ABDULRAHIM et al., 1996) e a redução da colonização intestinal por alguns patógenos, incluindo-se *Salmonella* spp. (ANDREATTI FILHO et al., 1997, 1999; CORRIER et al., 1990; NURMI e RANTALA, 1973; SCHENEITZ, 1992; STAVRICK et al., 1992; ZIPRIN et al., 1993).

Utilizando o conteúdo total de cecos provenientes de aves adultas, Corrier (1991), em um clássico trabalho sobre a ação das culturas cecais, demonstraram claramente que misturas indefinidas de bactérias cecais promoveram a redução da colonização ou invasão de órgãos por *Salmonella* Enteritidis em aves. Neste mesmo trabalho verifica-se que a adição de lactose à ração, funcionando como um

prebióticos, incrementa a redução da colonização por *Salmonella* Enteritidis, o que ocorre quando o carboidrato é administrado isoladamente.

Uma das formas mais freqüentes de disseminação das infecções paratífóides determinadas por *Salmonella* spp. e através das fezes. Devido a este aspecto é fundamental minimizar a disseminação desta bactéria através da excreção via fezes. Andreatti Filho et al. (1997, 1999) demonstraram que o uso de microbiota cecal anaeróbia reduziu a quantidade de *Salmonella* Enteritidis nas fezes de aves.

Algumas características são imprescindíveis na composição de um probiótico. Especialmente se este produto deixe de ser apenas fruto de experiências de laboratoriais e passe a ser comercializado. Fuller (1989) e Gibson e Roberfroid (1995) nos apresentam as propriedades mais desejáveis de um probiótico, ou seja, que este apresente condições de ser produzido em larga escala e de maneira viável, possa ser estocado e mantenha a sua viabilidade até o momento de uso, tenha condições de permanecer no ecossistema intestinal e, que o hospedeiro animal seja beneficiado pelo seu uso.

2.7 Estímulo ao sistema imune

As bactérias probióticas têm a capacidade de modulação de respostas imunes sistêmicas aumentando o número e a atividade de células fagocíticas do hospedeiro. Um animal simplesmente não consegue sobreviver se não desenvolver uma microbiota intestinal normal. A maior parte deste conhecimento veio de experimentos com animais desprovidos e criados em condições de esterilidade, chamados de animais axênicos ou gnotobióticos.

Alguns gêneros de bactérias intestinais, como o *Lactobacillus* e o *Bifidobacterium* estão diretamente relacionados com o estímulo da resposta imune por aumento da produção de anticorpos, ativação de macrófagos, proliferação de células T e produção de interferon (FULLER e GIBSON, 1997), entre outros. Entretanto, o verdadeiro mecanismo, pelo qual essas bactérias estimulam o sistema imune, ainda, permanece com muitos pontos a serem esclarecidos.

O trato intestinal das aves é o órgão de maior responsabilidade no desenvolvimento da imunidade geral inespecífica. Diferentemente de todas as outras espécies animais, as aves não apresentam linfonodos. Seus órgãos linfóides,

espalhados ao longo do trato intestinal, são as placas de Peyer, tonsilas cecais e Bolsa de Fabricius que é uma invaginação da parte final do trato digestivo. Estes tecidos captam antígenos disponibilizados no trato digestivo que estimulam as células B, precursoras de IgA e células T, colaboradoras das placas de Peyer, para o desenvolvimento de imunidade geral e inespecífica. Através do estímulo imunológico da mucosa, há produção de anticorpos tipo IgA que bloqueiam os receptores e reduzem o número de bactérias patogênicas na luz intestinal (JIN et al.1998).

Além disso, outras ações benéficas podem ser atribuídas ao uso de probióticos, como: auxílio na digestão e absorção de nutrientes (envolvimento na bioquímica intestinal, especialmente em relação à ação sobre os sais biliares); produção de nutrientes para células da mucosa intestinal; redução da produção de amoníaco e auxílio na eliminação de amins biogênicas tóxicas; produção de vitaminas do grupo B; melhoria da absorção de minerais; protegem os vilos e as superfícies absortivas contra toxinas irritantes produzidas pelos microrganismos patogênicos, permitindo assim, a regeneração da mucosa intestinal lesada; e restauração da microbiota intestinal após antibioticoterapia.

A avicultura comercial tem como objetivo obter alta produtividade a baixo custo e oferecer ao consumidor um produto de qualidade. Entretanto, para obtenção da alta produtividade alguns aditivos alimentares têm sido usados como promotores de crescimento, entre eles, os antibióticos. A utilização rotineira e indiscriminada dos antibióticos tem levado ao aparecimento de populações bacterianas resistentes (FULLER, 1989), levando ao desequilíbrio na simbiose entre microrganismos a patogênicos e o animal.

A pesquisa tem procurado desenvolver produtos que possam ser utilizados como substitutivos aos antibióticos promotores de crescimento. Entre as alternativas destacam-se os probióticos, os quais são produtos constituídos por microrganismos vivos que afetam benéficamente o animal hospedeiro, promovendo o equilíbrio da microbiota intestinal (FULLER, 1989), de forma que os antibióticos possam ser utilizados quando realmente necessários.

A utilização de probióticos como promotor de crescimento pode proporcionar maior ganho de peso, melhor conversão alimentar, maior rendimento de carcaça (BERTECHINI, HOSSAIN, 1993; WOLKE et al., 1996; JIN et al., 1998), porém nem sempre são observados efeitos benéficos com a sua utilização (CAVALCANTI et al., 1996; HENRIQUE et al., 1998). Fatores como, idade do animal, tipo de probióticos,

viabilidade dos microrganismos no momento de serem agregados às rações, condições de armazenamento, condições de manejo (mínimo estresse) e sanidade podem afetar a eficácia dos probióticos.

Maruta (1993) observou aumento na quantidade de carne na carcaça, aumento da musculatura peitoral, diminuição da gordura abdominal, e diminuição do odor característico da carne de frango ao utilizar probióticos, mesmo contendo apenas uma cepa bacteriana. O autor observou que as fêmeas não apresentaram resultados favoráveis quanto ao uso ou não de probióticos na dieta. Para os machos, mesmo com a aplicação do produto apenas sete dias antes do abate, seu uso foi suficiente para permitir aumento na quantidade de carne e diminuição de gordura abdominal. Citou que com a administração de probióticos no período do crescimento, ao abate observaram-se resultados favoráveis para machos e fêmeas quanto à qualidade da carcaça. Os resultados mostraram que a taxa de abate também foi superior quando se adicionaram probióticos na ração. Loddi e outros. (2000a) encontraram maior rendimento de carcaça para fêmeas (69,2%) em relação aos machos (68,6%) quando associaram probióticos com antibióticos.

A pouca diversidade da microflora intestinal de aves recém nascidas, além de ser considerada como um fator limitante para a digestão, também possibilita a colonização intestinal por patógeno entéricos. A ausência de contato com a microbiota natural logo após o nascimento pode afetar o desenvolvimento do trato gastrintestinal (TGI) e, por conseqüência, prejudicar o crescimento das aves. Assim, os efeitos negativos desse processo têm sido contornados com o uso contínuo na ração de antibióticos em doses subterapêuticas. Entretanto, no momento, o uso desses produtos está sendo questionado devido à possível relação deles com a resistência aos antibióticos usados na antibioticoterapia humana. Nesse aspecto, várias medidas têm sido estudadas para possibilitar o rápido desenvolvimento de bactérias no trato digestivo benéficas ao hospedeiro. O conceito moderno de probióticos foi definido por Fuller (1989) como sendo microrganismos (MO) vivos que, suplementados constantemente na dieta, afetam benéficamente o organismo animal, atuando no equilíbrio da microbiota intestinal. Já os prebióticos são considerados aqueles ingredientes não digestíveis que estimulam o crescimento e/ou a atividade de um limitado número de MO capazes de proporcionar um ambiente intestinal saudável ao hospedeiro (GIBSON e ROBERFROID, 1995). Carboidratos não digestíveis, como parede celular de plantas e leveduras, são

classificados nesse grupo, pois são constituídos de complexo de glicomanonoproteínas, em particular de mananoligossacarídeos, capazes de ligarem-se à fímbria das bactérias e inibir a colonização no TGI. Podem também ser utilizado como nutrientes pelas bactérias. Alguns autores atribuem aumentos na retenção de alguns minerais e a mineralização óssea a suplementação com prebióticos Bradley e Savage (1994) e Onifade e outros. (1999). A combinação de probióticos e prebióticos é denominada de simbiótico e constitui um novo conceito na utilização de aditivos em dietas para aves.

O uso de enzimas e probióticos na alimentação de animais monogástricos têm despertado o interesse de vários pesquisadores nos últimos anos. Entretanto, poucos são os estudos relacionados com o efeito do estresse térmico sobre a atividade de enzimas digestivas de frangos de corte alimentados com dietas suplementadas com probióticos e enzimas exógenas.

A ação dos probióticos está relacionada basicamente à melhoria do estado de saúde do hospedeiro, sendo considerados biorreguladores do trato intestinal, com ação preventiva e curativa. O uso de probióticos permite uma colonização rápida e eficiente de microrganismos da microbiota intestinal. Entretanto, limpeza e técnicas de desinfecção são essenciais para seu sucesso nesse processo, uma vez que qualquer fator que leve ao desequilíbrio da microbiota, seja com o uso indevido de antimicrobianos ou estresse de qualquer natureza, poderá permitir a instalação e multiplicação de microrganismos patogênicos (MILES, 1993). Desta forma, os probióticos tornam-se uma alternativa eficaz e econômica em substituição aos antibióticos, desde que não alterem negativamente o desempenho animal (VARGAS et al., 2000).

As enzimas, em geral, são utilizadas na alimentação animal com a finalidade de complementar as enzimas que são produzidas pelo próprio animal em quantidades insuficientes (amilases e proteases) e fornecer enzimas que eles não conseguem sintetizar (celulases). Com isso, se reduz o efeito negativo causado pelos polissacarídeos não-amiláceos (PNA's, principais componentes estruturais das paredes celulares dos cereais) (FISHER et al., 2002). Segundo Choct (2000), os polissacarídeos não-amiláceos na dieta de não-ruminantes, têm uma atividade antinutricional, a qual leva a uma pobre utilização de nutrientes. Além disso, a adição de enzimas reduz o impacto da variabilidade na capacidade digestiva da ave, tanto diretamente (através do aumento da capacidade digestiva com a enzima) ou

indiretamente (pela estabilização da microbiota intestinal). Isso reflete o potencial da enzima para maximizar a capacidade digestiva dos frangos de corte e, assim, utilizar forma eficaz os nutrientes (PACK et al., 1998). É de vital importância à seleção adequada de uma fonte de enzima e/ou probiótico para se obter êxito com determinados tipos de dietas. Entretanto, enzimas específicas são estritamente limitadas a sua capacidade catalítica e às condições ambientais sob as quais elas funcionam. Conseqüentemente, o sucesso na aplicação de tecnologia enzimática requer o conhecimento dos compostos químicos a serem hidrolisados e as condições sob as quais as reações ocorreram (CLASSEN, 1996).

2.8 Bactérias Láticas

O grupo das bactérias láticas inclui seis gêneros de bactérias acidúricas produtoras de ácido láctico, Gram-positivas, catalase-negativas e microaerófilas: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* e *Enterococcus*.

Tomam os açúcares dos alimentos e os transformam em ácido láctico, hidrogênio, anidrido carbônico e energia. Compreendem tanto os bacilos como os cocos, porém não tem a propriedade de formar esporos. As culturas láticas têm uma temperatura de desenvolvimento ideal de 40-42°C (MADRID et al., 1995).

Muitas bactérias patogênicas têm habilidade para aderir fortemente à parede do intestino das aves, podendo liberar toxinas ou dar início a processos inflamatórios.

Pesquisas têm demonstrado que algumas espécies de *Lactobacillus* (cultura probiótica) são capazes de competir contra uma série importante de bactérias patogênicas, como *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium*. Esses *Lactobacillus* aderem-se fortemente a parede intestinal, inibindo o crescimento de bactérias indesejáveis com substâncias produzidas durante a fermentação da lactose a ácido láctico (NESTLÉ, 2000).

2.9 *Salmonella Spp*

Na atualidade as salmoneloses ocupam uma das posições mais destacadas no campo da saúde pública em todo o mundo, exteriorizando-se pelas suas características de endemicidade, morbidade e, em particular, pela dificuldade de seu controle. Todo este corolário decorre dos múltiplos parâmetros epidemiológicos envolvidos, circunstanciados, principalmente pelas inúmeras fontes de infecção e vias de transmissão presentes no ciclo (HOFER et al 1998). Sem dúvida que neste problema, a salmonelose animal, com ênfase para as aves se destaca e, tendo como vínculo constantes, as rações e seus ingredientes (EDWARDS; GALTON 1967).

A incidência de surtos de *Salmonella* Enteritidis (SE) em humanos tem aumentado nos últimos anos em muitos países como Estados Unidos, Grã-Bretanha e outros países da Europa (SPAKMAN, 1989; BARROW, 1993; TAUXE, 1997). No Brasil, os surtos por SE no homem tem aumentado a partir de 1993 (SILVA, 1995; IRINO et al., 1996; TAUNAY et al., 1996; LIRIO et al., 1998). Grande parte deles tem sido relacionada com o consumo de ovos ou pratos preparados com ovos (SPACKMAN, 1989; BARROW, 1993; NOORHVIZEN & FRANKENA, 1994; TAUXE, 1997). No Brasil, SE foi detectada pela primeira vez em galinhas, em 1989, quando a cepa foi isolada de matrizes pesadas jovens que apresentavam sintomas clínicos e mortalidade por salmonelose (FERREIRA et al., 1990).

A contaminação dos ovos por salmonela se dá, inicialmente e na maioria das vezes, através da casca. Tempo e temperatura de armazenagem são fatores fundamentais para que as salmonelas passem da superfície da casca para as estruturas internas do ovo (STALDEMAN, 1986; SILVA, 1995). A desinfecção e o resfriamento do ovo logo após a postura são procedimentos adotados em vários países como medidas para reduzir a contaminação e a multiplicação bacteriana (HAMMACK et al., 1993). Ovos podem também se contaminar via transovariana. Nesse caso, a contaminação está localizada na gema e os processos convencionais de desinfecção dos ovos não são eficientes. A clara, em geral, apresenta-se com baixa contaminação por salmonelas, pois ela contém elementos naturais que dificultam o desenvolvimento bacteriano, como a presença de enzimas antibacterianas (lisozima) e a deficiência em ferro, elemento essencial para a

multiplicação bacteriana, p.ex. Contudo, a manipulação da clara no preparo de determinados pratos pode romper esse equilíbrio e favorecer a multiplicação de salmonelas.

No Brasil, poucos são os levantamentos sobre a presença de salmonelas em ovos comerciais (LANGONI et al., 1995). A maioria dos ovos comerciais é produzida por galinhas mantidas em gaiolas. Uma pequena parte é constituída por ovos de descarte de incubação que são produzidos por matrizes em ninhos com cama de maravalhas. Parte desses ovos, oriundos de reprodutoras, apresenta defeitos na casca que facilitam a passagem das salmonelas da superfície para suas estruturas internas aumentando o risco de contaminação.

Recentemente, a vigilância sanitária estabeleceu condutas higiênico-sanitárias que incluem cuidados de armazenamento e preparações de pratos a base de ovos. Entretanto, a legislação brasileira ainda não prevê a armazenagem, o transporte e a comercialização de ovos de consumo sob refrigeração.

De acordo com o ICMSF (1996), *Salmonella* é um gênero da família *Enterobacteriaceae*, sendo caracterizadas como bactérias Gram-negativas, anaeróbias facultativas na forma de bastonetes. As formas móveis possuem flagelos peritríquios. Produzem ácido, e às vezes gás a partir da glicose; são catalase-positivas e oxidase-negativas; reduzem os nitratos a nitritos; reação de indol negativa; utilizam o citrato como única fonte de carbono; descarboxilam a lisina, arginina e a ornitina e produzem sulfeto de hidrogênio. A prova do indol é negativa; a fenilalanina e o triptofano não são desaminados; a uréia não é hidrolizada; não produzem lipase e desoxiribonuclease. A maioria das *Salmonellas* são móveis.

2.9.1 Fatores que afetam o crescimento, a morte e/ou sobrevivência

De acordo com Adams e Moss (1997), a temperatura ótima para o crescimento deste microrganismo é de 35-37°C, onde a mínima é de 5°C podendo chegar a temperatura máxima de 45°C. O pH ótimo para seu crescimento é 7,0. Quando os valores extremos para o crescimento são ultrapassados, pode ocorrer a morte da *Salmonella*. A atividade de água afeta o crescimento deste microrganismo. A atividade de água mínima para o crescimento do microrganismo é de 0,93. São

destruídas facilmente por desinfetantes comerciais, utilizados na indústria de alimentos. As *Salmonella* são capazes de sobreviver por muito tempo nos alimentos e outros substratos (ICMSF, 1996).

2.9.2 Fontes de *Salmonella*

Conforme Frazier e Westhoff (1988) as pessoas e os animais são direta ou indiretamente a fonte de contaminação dos alimentos com *Salmonella*. Também podem proceder de gatos, suínos e dos bovinos, ainda que as fontes mais importantes das *Salmonella* nos alimentos são as aves e os ovos e os roedores. Cascas de ovos, ovos líquidos, congelados, são fontes importantes de contaminação. Rações, principalmente aquelas produzidas com subprodutos de carne e de pescado, podem transmitir *Salmonella* as aves. Albuquerque (apud VERDI et al. 2000), referencia a presença de *Salmonella* em derivados de vegetais para a nutrição animal, fato este, confirmatório do resultado obtido quanto a presença desta bactéria no farelo de soja amostrado.

2.9.3 Dose infectante

A dose infecciosa de *Salmonella* é elevada, 10^6 (UFC/g ou mL) podendo variar de acordo com a virulência do sorotipo, a sensibilidade do indivíduo e o alimento veiculado (ADAMS & MOSS, 1995). Em alguns casos, especialmente quando o veículo tem sido a água ou alimentos gordurosos ou tamponados, nos alimentos implicados pequenas quantidades de *Salmonella* tem sido encontradas. Segundo estudos, o elevado conteúdo de gordura de alguns alimentos proporciona as bactérias certa proteção frente a acidez do estômago, onde pequeno número de células poderá causar infecção a partir desses alimentos.

2.9.4 *Salmonella* Enteritidis

Em palestra apresentada e publicada nos Anais da Conferência APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas de 1991 (SILVA, 1991), foi feita a seguinte colocação

"O recente isolamento de *Salmonella* Enteritidis (SE) de pintos com sinais clínicos e mortalidade realizado por grupo de pesquisadores da Universidade de São Paulo - USP (FERREIRA et al. 1990) representa o primeiro relato do problema em aves no Brasil e não há razões para que se pense que sua ocorrência esteja restrita a este único surto". Naquele momento, salmonelose humana por SE vinha sendo descrita como um grave e crescente problema em vários países de avicultura desenvolvida, particularmente nos Estados Unidos (EUA) e União Européia (BARROW, 1993; HUMPHREY, 1990), com os quais o Brasil vinha mantendo forte intercâmbio comercial na compra de material genético. Os surtos, nesses países, estavam estreitamente relacionados com o consumo de produtos avícolas contaminados. Como a SE pode ser transmitida verticalmente da galinha a sua progênie, era previsível, portanto, que o problema pudesse chegar ao Brasil via aquisição de material contaminado. Era também possível que o problema pudesse atingir proporções maiores que as observadas nos países de primeiro mundo, caso enérgicas medidas não fossem adotadas. Entretanto, naquele momento, o problema já estava instalado no Brasil, restando, apenas, combatê-lo e evitar novas introduções.

2.9.5 ***Salmonella* Enteritidis no Brasil**

O enorme sucesso comparativo da avicultura brasileira dentro das cadeias agro-alimentares, destacada pelo correspondente especial da Revista "*Feeding Times (1998)*" como a mais eficiente do mundo, com índices de crescimento entre 5 e 10%, continua até hoje. Os dados de 2001 ratificam esta assertiva: a produção de carne de frango 2001/2000 cresceu 9,75% e o alojamento de pintos de corte 6,74% (APINCO, 2002).

As conseqüências sanitárias mais visíveis desse processo, particularmente quanto a SE, são as seguintes:

- Maior pressão para a manutenção de lotes de galinhas reprodutoras positivos para SE e não eliminação dos mesmos;
- Maior aproveitamento de ovos impróprios para incubação oriundos de lotes de reprodutoras positivos para SE, incubação de ovos sujos de cama ou de má qualidade da casca;

- Maior uso de antibióticos no controle da infecção por SE em aves, em todas as fases – de pintos no incubatório a reprodutoras em produção – com o intuito de minimizar as perdas e mascarar a infecção;
- Redução nas exigências sanitárias na compra de reprodutoras e sua progênie, aceitando-se lotes positivos para SE;
- Busca da otimização econômica dos incubatório com locação de espaço de incubação, compra e carregamento de ovos de várias procedências, sem controles sanitários satisfatórios e adequados;
- Busca da otimização dos abatedouros avícolas com extensão de turnos de trabalho, sobrecarregando graxarias, quebrando regras sanitárias e favorecendo contaminações cruzadas de matérias primas que são recicladas nas rações avícolas.

2.9.6 ***Salmonella* Enteritidis em produtos avícolas**

Uma grande incidência de surtos humanos causados pelo sorovar *Enteritidis* nos EUA, Grã-Bretanha e outros países da Europa a partir de 1980 chamou a atenção para fontes comuns da infecção (*CENTER FOR DISEASE CONTROL 1990, 1992, 1993*). As investigações epidemiológicas identificaram o consumo de ovos ou alimentos contendo ovos como responsáveis pela maioria dos surtos devido a fagotipos (FT) específicos de SE; FT-4 nos países europeus e, FT-8 e FT-13a, nos EUA (COWDEN et al., 1989; PERALES; AUDICANA, 1989; ST. LOUIS et al., 1988). As reações iniciais sobre a associação de infecções humanas por SE com o consumo de ovos e seus produtos foram de descrédito. Posteriormente, estudos epidemiológicos comprovaram a veracidade do ovo como veículo nesses países (ZEIDLER, 1996) e a informação foi divulgada com grande alarde, causando, inclusive, grandes prejuízos aos produtores de ovos. Em vários países de avicultura desenvolvida o problema foi atacado de frente e, após erros e acertos, a situação vem melhorando tanto em nível de avicultura como de saúde pública, mas sempre com programas complexos e custos elevados.

2.9.7 A evolução do problema *Salmonella* Enteritidis em aves no Brasil

Como mencionado anteriormente, o primeiro relato da ocorrência de SE em aves foi realizado por pesquisadores da USP em 1990 (FERREIRA et al., 1990).

Até então, a identificação de SE pelos dois principais centros de sorotipagem de salmonelas do país era muito baixa. Levantamento feito entre 1970 e 1990 no Instituto Adolfo Lutz (IAL) de São Paulo (TAUNAY et al., 1996) mostrou que SE foi caracterizado em apenas 0,37% das 28.658 amostras de fontes humanas e 0,85% das 14.345 amostras não-humanas. A continuidade dos estudos entre os anos de 1991 e 1995, com amostras do mesmo Instituto (TAVECHIO et al., 1996), mostrou uma completa reversão do quadro. Foram estudadas 5.490 amostras de salmonelas de origem humana e não-humana. No período entre 1991 e 1995, SE passou de 1,2% para 64,9% entre as amostras humanas e de zero para 40,7% para as amostras não-humanas, com grande aumento a partir de 1993, particularmente em ovos, aves (matrizes) e amostras do meio ambiente. Levantamento realizado no período anterior a 1991, feito em amostras isoladas de matérias primas e ração para aves entre 1976 e 1991 pelo setor de Enterobactérias do Instituto Oswaldo Cruz (FioCruz) do Rio de Janeiro (HOFER et al., 1998), mostrou a presença de apenas 0,8% de SE entre as 2.293 amostras de salmonelas identificadas pelo A fagotipagem de cepas de SE, utilizando padrões de lise obtidos com um conjunto definido de bacteriófagos, tem sido avaliada como potencial marcador epidemiológico. Estudo epidemiológico utilizando a fagotipagem feito com as cepas de SE identificadas pelo IAL mostrou que, até 1992, elas eram predominantemente pertencentes ao Fagotipo 8 (FT-8). Nos anos seguintes, 1993 a 1995, as amostras de SE passaram a ser quase que exclusivamente do FT-4, conforme (IRINO et al., 1996).

Estudos mais detalhados de 282 amostras de SE isoladas de aves entre 1995 e 1996, usando fagotipagem e epidemiologia molecular baseadas na sonda complementar ao rRNA mostraram que as cepas estudadas tiveram várias origens ou introdução em vários períodos diferentes no sistema avícola brasileiro (NUNES, 1999).

Os dados anteriores e vários outros são fortes indícios da entrada de SE no Brasil via importação de material genético avícola contaminado (IRINO et al., 1996; SILVA, 1997; TAVECHIO et al. 1996). Esse fato deve ter ocorrido no final da década de 80. Se estas informações fossem totalmente confirmadas, poderíamos afirmar que as primeiras cepas de SE foram introduzidas dos EUA, rapidamente seguidas por cepas européias.

A ocorrência de salmonelas em granjas sempre foi muito comum. Em 1993, foi realizado um vasto levantamento durante 10 semanas consecutivas, colhendo-se amostras de vários segmentos de uma integração de frangos de corte, como: farinhas da graxaria do abatedouro, água de escalda e resfriamento, carcaça de frangos, camas e rações de frangos e matrizes (SILVA; BOSQUIROLI, 1996). Foram isoladas 520 cepas de *Salmonella sp.* pertencentes a 22 diferentes sorovares, nenhum deles pertencentes ao sorovar *Enteritidis*. Os sorovares mais isolados foram *Havana* (23,7%), *Senftenberg* (9,6%), *Schwarzengrund* (7,7%), *Montivideo* (7,5%) e, *Typhimurium* o quinto mais isolado com 6,9%.

Já em 1997, SE era isolada com grande facilidade de material avícola. Zancan e outros. (2000) observou alta freqüência de salmonelas em forro de caixa de entrega de pintos, 83% e 50% para as amostras de matrizes pesadas e poedeiras, respectivamente. No período dos exames (1997), 40% das 10 amostras de caixa de poedeiras continham o sorovar *Enteritidis*.

Salmonella Enteritidis não é um sorovar novo em aves. Depois de *Pullorum* e *Gallinarum*, ele foi, ao lado de *Typhimurium*, o mais importante causador de infecções paratífóides em aves nos EUA (Gast, 1997). SE pode ser isolada em pequeno número de aves normais, em infecções extra-intestinais. Ele foi isolado de ovário e peritônio em menos que 2%, tanto de reprodutoras reagentes positivas no teste de pulorose (SNOEYENBOS et al, 1969), como de descarte de poedeiras comerciais (BARNHART et al., 1991; EBEL et al., 1992; WALTMAN et al., 1992).

As primeiras detecções de SE em matrizes no Brasil ocorreram entre 1993 e 1994 e eram feitas em aves reagentes no teste de pulorose enviadas para exames bacteriológicos laboratoriais. Normalmente, eram aves adultas após o pico de postura. Também, ou simultaneamente, compradores de pintos (matrizes e comerciais) começaram a receber diagnóstico positivo para SE de materiais enviados para monitoria bacteriológica.

Em 1995, o Ministério da Agricultura reforçou a legislação de controle de SE nas granjas avícolas, enfatizando o Programa Nacional de Sanidade Avícola (BRASIL, 1995). Entretanto, sua operacionalização tem ficado muito aquém do desejado.

Salmonella Enteritidis predominou entre todos os sorovares isolados entre 1994 e 1999 pelo Laboratório de Ornitopatologia da FMVZ de Botucatu, SP. (ANDREATTI FILHO et al., 2001). Ele correspondeu a 75,6% dos 45 sorovares isolados de aves no período.

Salmonella Enteritidis esteve, também, como o sorovar mais prevalente em todos os anos no período de 1997 a 2001, em material de galinha recebido por laboratório de diagnóstico avícola (SILVA & SAVANO, 2002). Ele correspondeu a 82,4% dos 376 isolamentos de salmonelas realizados no período. SE foi isolado, predominantemente, de ovos bicados e pintos de corte, e também de material de matriz de corte, avós de corte, postura comercial e matriz de postura. É interessante observar que o sorovar *Pullorum* foi o segundo mais isolado nesse levantamento: 22 isolamentos entre as 376 cepas identificadas. Curiosamente, todos pertenciam a uma mesma variante bioquímica (ornitina negativa), fazendo com que os laboratórios de referência reportassem como *Salmonella* imóvel O:9,12:-;- ornitina negativa e não como *Pullorum*. É provável que se trata de uma marca epidemiológica e uma única origem dessa variante.

2.9.8 *Salmonella* Enteritidis em rações avícolas e roedores

Na transmissão horizontal das salmonelas as aves se infectam pela via oral e tem sido grande a especulação de que seu alimento funcione como importante veículo de contaminação. As rações e suas matérias primas, principalmente as de origem animal, apresentam, quase sempre, altas taxas de contaminação por *Salmonella* sp. Entretanto, em praticamente todos os levantamentos realizados, não há a ocorrência dos sorovares adaptados às aves como *Pullorum*, *Gallinarum* e, nem *Enteritidis* (ANDREATTI FILHO, 2001; BERCHIERI et al., 1984, 1989, 1993; HOFER et al. 1997, 1998; MIRANDA et al., 1978; SILVA et al., 1973; SILVA; SAVANO, 2002). Quando esses sorovares aparecem nos isolamentos de rações, acreditamos estar relacionado a uma falha na identificação da origem do material. Assim,

nenhuma ligação convincente tem sido estabelecida entre a infecção de um lote de aves por SE e o consumo de ração contaminada. Mesmo assim, as matérias primas de origem animal têm sido retiradas das formulações de rações como forma de controle de SE ou as mesmas têm sofrido processos de peletização e tratamentos químicos. Convém salientar que esses processos reduzem, mas não eliminam a contaminação das rações.

Assim, na epidemiologia da SE em granjas, a compra de aves livres tem um papel preponderante e fundamental. Outro aspecto que deve ser salientado é a contaminação ambiental. Aves positivas eliminam SE pelas fezes e estas contaminam o ambiente. As salmonelas podem permanecer por longo período de tempo em um galpão despovoado, embora não apresentem formas de resistência. Ratos de granjas contaminadas podem se tornar portadores de SE e eliminar, também, o agente pelas fezes por longo período de tempo - mais de 10 meses (ECKROADE et al., 1992; HENZLER & OPITZ 1992). Quanto aos ratos, há uma proposta de que eles seriam os responsáveis pela pandemia de SE (RIEMANN et al., 2000). Esses autores acreditam que a prática de controlar ratos com rodenticidas a base de SE – prática esta extensivamente usada nos EUA em 1895 (ROSENAU, 1910) e banida em 1920 - continuou sendo usada em vários países, inclusive em Cuba, até a década de 90 (FRIEDMAN et al., 1996). Cepas de SE mais virulentas teriam se adaptado aos ratos e esses as introduziram nos ambientes avícolas. Estudos epidemiológicos mais recentes não têm confirmado esta hipótese (RABSCH et al., 2001). Portanto, limpeza, desinfecção ambiental, vazão sanitário e combate a roedores são partes importantes no controle e erradicação da SE de granjas avícolas.

2.9.9 Dificuldades associadas a erradicação de *Salmonella* Enteritidis em aves no Brasil

Podem-se apontar várias dificuldades associadas à erradicação de SE das granjas avícolas no Brasil:

- A ocorrência de SE tem pouco ou nenhum impacto na produtividade das granjas;
- Os programas de controle e erradicação são complexos e de custo elevado;

- Há pouca consciência de que a erradicação de SE das granjas causará redução nos surtos humanos;
- Grande dificuldade dos organismos oficiais na operacionalização dos programas de controle e erradicação.

2.10 *Salmonella* Enteritidis em alimentos e surtos de infecção alimentar no Brasil

O *Codex Alimentarius* recomenda a ausência de qualquer sorovar de *Salmonella* em 25 gramas da amostra analisada, incluindo carne de aves e ovos. Os alimentos de origem animal continuam a ser os principais responsáveis pela infecção humana, entre eles a carne de aves, ovos e derivados. Num esforço para conter o aumento de contaminação de produtos avícolas, o governo dos EUA estabeleceu mega-regras para implementação em quatro anos, a partir de janeiro de 1998, pelas quais se aceita a presença de até 20% das carcaças de frangos contaminadas. Acima desse índice, o abatedouro pode ser até fechado (USDA, 1998).

No passado, os alimentos contendo ovos já foram os principais causadores de salmonelose nos EUA. Alterações na legislação e na indústria avícola praticamente eliminaram as salmoneloses associadas com o consumo de ovos e derivados nas décadas de 70 e 80. Entre as medidas, estava a coleta várias vezes ao dia e o resfriamento imediato dos ovos numa temperatura abaixo de 8°C, preferencialmente a 4°C, e utilização de embalagem, permitindo espaçamento e boa ventilação para os ovos. Aparentemente, essas medidas não têm surtido efeito no controle dos surtos por SE, que segue sendo uma das principais causas de toxinfecções alimentares em todo o mundo.

Os custos médicos e as perdas de produtividade devido às infecções por salmonelas nos EUA, estimados em um bilhão de dólares em 1987 (ROBERTS, 2000), pularam para quatro bilhões em 1994, sendo a SE o principal agente causador. E, de acordo com a Organização Mundial da Saúde, os EUA têm a menor incidência de SE entre os países desenvolvidos (ZEIDLER, 1996). Na Holanda, os custos recentes das salmoneloses humanas causadas por SE foram estimados em Fl\$79,5 milhões de Florins anualmente (NOTERMANS et al., 1996).

A primeira forte evidência do envolvimento de SE com infecção originada do consumo de alimentos preparados com ovos ocorreu em um grande surto em 1986, nos EUA, envolvendo massa comercial congelada (POTTER, 1987). Esta massa foi recheada com uma mistura de queijo, condimentos esterilizados e ovos crus. O levantamento epidemiológico levou ao isolamento de SE de várias amostras oriundas de granjas que forneceram ovos, além de outras espécies de salmonela. Daí para frente, inúmeros estudos vincularam os surtos de salmonelose por SE com o ovo tipo A, consumido mal cozido ou cru (Center for Disease Control, 1990, 1991, 1993).

No Brasil, até o início de 1990, a SE era apenas mais uma salmonela raramente encontrada em infecções humanas (TAUNAY et al., 1996). Entre 1975 e 1992, o FT-8 de SE era o mais prevalente (81% das cepas de SE) nas amostras de fontes humanas e não-humanas. A partir de 1993, houve uma explosão da ocorrência de SE tanto de fontes humanas como não-humanas (TAVECHIO et al., 1996). Nos anos de 1994 e 1995, foram identificadas 467 cepas de SE com uma total predominância do FT-4, conforme (IRINO et al. 1996). A SE passou a corresponder a mais de 60% dos sorovares isolados pelo IAL. Havia uma perfeita sintonia entre os fagotipos encontrados nas infecções humanas e aqueles isolados de fontes não humanas. Aqui, também eram os produtos avícolas os mais contaminados por SE (IRINO et al., 1996; TAVECHIO et al., 1996).

Em análise dos alimentos destinados à merenda escolar comprados pela Prefeitura da cidade de São Paulo entre 1992 e 1996, 76,4% das amostras positivas para salmonelas eram obtidas de frangos. SE correspondeu a 70,6% das salmonelas isoladas. A percentagem de SE aumentou para 81,4% em 1997, segundo Lírio e outros. 1998.

A análise de 150 carcaças de frangos congeladas de quatro marcas obtidas no comércio varejista de Jaboticabal, SP, durante 1996 e 1997, revelou a presença de salmonelas em 32% das amostras analisadas. Delas, 60,4% pertenciam ao sorovar Enteritidis (SANTOS et al., 2000). No artigo publicado em 2000, Fuzihara e outros encontraram salmonelas em 42% das amostras de carcaças de frangos oriundas de 60 pequenos abatedouros da cidade de Mauá, SP, onde 30% dos sorovares identificados pertenciam ao sorovar SE. Nessa mesma época, Oliveira e Silva (2000) encontraram, praticamente, 10% das amostras de ovos de galinha

obtidos no comércio varejista de Campinas, SP, no período de janeiro a março de 1995, positivos para SE.

Embora as carcaças de frangos apresentem altas taxas de contaminação por SE, são os ovos e seus derivados os principais responsáveis pelos surtos humanos. Em praticamente todos os surtos por SE no Brasil com a caracterização da origem, ovos e derivados estavam envolvidos com os mesmos (ARAÚJO et al., 1995; JACQUELINE et al., 1998; KAKU et al., 1995).

Num extenso estudo de 115 surtos alimentares por SE ocorridos na região de Campinas, SP, que engloba 87 municípios, Simões e outros (2001) mostraram que ovos, seus derivados e pratos contendo os mesmos mal cozidos foram os principais responsáveis pelos surtos, destacando a maionese caseira, com 57% dos casos, seguido pela cobertura de bolos, com 15%. Nesse estudo, 807 pessoas ficaram doentes, com 5 óbitos. Esses são apenas os surtos atendidos pelo Sistema Único de Saúde (SUS), através de encaminhamento da Vigilância Sanitária dos respectivos municípios. Muitos desses casos correspondiam a infecções extra-intestinais e requeriam medicação antimicrobiana (antibióticos) no seu tratamento.

2.10.1 Resistência antimicrobiana em amostras de *Salmonella Enteritidis*

A infecção humana por SE através do consumo de alimentos de origem animal contaminados, particularmente ovos e seus derivados, é um grave problema de saúde pública, como já mencionado anteriormente. O problema humano se agrava quando a cepa de SE apresenta resistência às drogas de eleição para o seu tratamento. Há consenso em vários países que o uso indiscriminado de antibiótico na produção animal é uma das causas do aumento da resistência antimicrobiana. O uso de antimicrobianos pode selecionar bactérias resistentes no ecossistema de uso. Patógenos humanos e genes de resistência podem passar entre humanos, animais e outros ecossistemas, via contato com animais ou através do consumo de alimento ou água contaminada (KELLEY et al., 1998). Tem sido uma recomendação da Organização Mundial de Saúde o controle e a restrição do uso de antimicrobianos na produção animal (WHO, 2001).

Coincidentemente, houve o desenvolvimento das fluorquinolonas no mesmo período do agravamento dos surtos por SE em animais e no homem. Em vários

países, as quinolonas foram, e ainda são, extensivamente utilizadas no tratamento de lotes de aves infectadas por SE (WHO, 1998). Anteriormente, a medicação tradicional envolvia o uso, via água ou ração, de nitrofurazona, furazolidona novobiocina e as tetraciclina.

No Brasil, as tetraciclina, penicilina, cloranfenicol, sulfonamida, furazolidona, nitrofurazona e avoparcina foram banidas em 1998 como aditivos alimentares em rações animais. Contudo, várias outras drogas seguem sendo permitidas: 3-nitro, ácido arsanílico, avilamicina, sulfato de colistina, enramicina, flavomicina, lincomicina, nitrovin, olaquinox, espiramicina, sulfato de tilosina, virginiamicina e bacitracina de zinco.

O extensivo uso das quinolonas em aves tem sido facilitado por uma legislação de prescrição muito flexível, pelo aparecimento dos genéricos para uso em ração e água com custo muito mais baixo que os primeiros produtos aprovados e, sem dúvida, pela sua eficácia contra as salmonelas.

Felizmente, os dados têm demonstrado que a maioria das cepas de SE isoladas de fontes não-humanas no Brasil entre 1995 e 2000 apresentam alta sensibilidade aos antibióticos testados. O exame de 282 cepas de SE isoladas de fontes humanas, alimentos, rações, aves e suínos entre 1995-96 revelaram baixa resistência; menos que 2,1% das cepas foram resistentes a uma única droga, conforme (NUNES, 1999). Resultados similares foram encontrados em cepas de SE isoladas de amostras de carcaças de frangos de 60 abatedouros da cidade de São Paulo, dois anos mais tarde, mesmo para as tetraciclina – um dos mais antigos antimicrobianos usados para tratamento e como promotor de crescimento (FUZIHARA, 2001). Dados mais recentes já mostram um possível aumento da resistência. Na análise do perfil de resistência de 195 amostras de SE de origem humana e não-humana, isoladas entre 1996 e 1999, frente a 19 agentes antimicrobianos, verificou-se resistência em 63,5% das cepas com a maioria delas resistente a apenas um ou dois antimicrobianos. Entretanto, observou-se, também, algumas cepas multirresistentes para de três até sete antibióticos, principalmente nas amostras de origem humana (TAVECHIO et al., 1999). Entretanto, quando foram examinadas amostras de salmonelas recebidas pelo Centro de Referência Nacional do MS/MARA entre 1998-1999, provenientes de vários estados, observou-se resistência a tetraciclina em 59,6% delas. Do total de 428 amostras examinadas, 55,8% eram SE e todas de origem animal. A resistência observada estava

associada, principalmente, às SE isoladas nos estados de SC e PR (VITAL BRASIL et al., 1999).

As cinco cepas de SE envolvidas em surto alimentar no Noroeste do estado de São Paulo foram sensíveis a todos os agentes antimicrobianos testados (KAKU et al., 1995).

Quando 29 cepas de SE isoladas de carcaças de frango foram submetidas a teste frente a 12 antimicrobianos, 76% e 100% foram resistentes à cefalotina e ampicilina, respectivamente (SANTOS et al., 2000).

Na análise de resistência a drogas de SE isoladas de 30 casos de crianças de zero a cinco anos, internadas em hospitais do município de São Paulo com quadros de doenças extra-intestinais como meningite e septicemia, observou-se que todas pertenciam a um mesmo ribotipo e 83,3% delas eram resistentes de um até sete dos antimicrobianos testados (FERNANDES, et al. 1999). Estes dados, juntamente com os de Tavechio e outros (1999), sugerem que os genes de resistência a drogas podem estar associados à virulência ou, pelo menos, as cepas humanas apresentam um perfil de resistência mais elevado do que aquele encontrado nas amostras não-humanas, o que torna a situação ainda mais preocupante do ponto de vista de saúde pública.

Cepas de SE podem desenvolver resistência pelo uso indiscriminado de drogas no seu país de origem ou através da importação de alimentos contaminados com bactérias carregando genes de resistência ou de pessoas infectadas que retornam de viagens internacionais. Pesquisadores finlandeses (HAKANEN et al., 2001) observaram aumento de resistência antimicrobiana em cepas de SE isoladas de viajantes após o retorno de países asiáticos onde as quinolonas são usadas indiscriminadamente. Houve aumento de 3,9% para 23,5% na resistência as fluorquinolonas nas amostras analisadas entre 1995 e 1999.

2.10.2 Vacinação no controle de *Salmonella* Enteritidis em aves

Uma observação interessante nas infecções por SE é o fato de que, quando este sorovar está presente num lote de aves, outros normalmente encontrados, desaparecem. Podemos postular que a infecção por SE possui um excelente mecanismo de indução de resistência às outras salmonelas em aves.

Embora não dominado para efeitos práticos, sabe-se que as aves apresentam mecanismo de resistência genética às salmonelas. Linhagens resistentes à SE, também o são à *Typhimurium*, *Pullorum* e *Gallinarum*. Linhagens susceptíveis à SE, também, o são a todas as outras salmonelas (BUMSTEAD; BARROW, 1993).

Há autores que afirmam que a atual pandemia de SE em aves se deve à erradicação de *Gallinarum* dos plantéis avícolas, uma vez que esse último sorovar excluía a SE competitivamente nos lotes de aves (RABSCH et al., 2000).

A vacinação com cepas homólogas de *Salmonella* auxilia na redução da colonização intestinal e excreção fecal. Por conta disso, várias vacinas inativadas oleosas de SE têm sido licenciadas em todo o mundo. Elas previnem a transmissão transovariana, a contaminação da casca dos ovos, reduzem o isolamento de SE de aves vacinadas, inclusive de órgãos internos como o ovário (BARROW et al., 1991; ESKEKUND, 1992), mas não o elimina totalmente dos órgãos internos e ovos de galinhas desafiadas (GAST et al., 1992-1993). A vacina 9R de *Gallinarum* também confere proteção às poedeiras contra SE (BARROW et al., 1991; SILVA et al., 1981). Outras vacinas vivas produzidas com cepas mutantes de SE ou mesmo de *S. Typhimurium* induzem proteção de longa duração às aves vacinadas (BARROW et al., 1991; HASSAN; CURTISS III, 1997).

Poedeiras comerciais em integração, mostrou que a aplicação de duas doses de bacterina inativada de SE (12 e 17 semanas de idade) reduziu os níveis de positividade do mecônio da progênie de 9-10% para 0% após o primeiro ano do programa (SONCIN; BACK, 2001). Mesmas observações foram feitas por nós em uma integração de frangos de corte em país da América Latina, com o uso de duas doses de bacterina aplicadas às matrizes em recria.

Considerando que a vacinação contra SE é uma arma auxiliar de valor incontestável, somos advogados do uso de bacterina tanto para poedeiras como para matrizes, mesmo que os procedimentos de monitoria para salmonelas precisem ser alterados e adaptados à nova realidade.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado no Biotério da Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Federal de Santa Maria – RS.

A coleta do material para análise foi realizada no Laboratório Central de Diagnóstico de Patologia Aviária (LCDPA), Medicina Veterinária.

As análises microbiológicas foram realizadas no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Maria – RS.

Foram utilizados pintos comerciais de corte com um dia de idade, mantidos em gaiolas de arame, sob aquecimento. Para alimentação foi fornecida ração não medicada e água. Os tratamentos foram realizados no primeiro dia de vida das aves.

Administrou-se probiótico por pulverização e na água de bebida, e salmonela por inoculação endoesofágica e probiótico na água de bebida. A pulverização foi realizada com auxílio de pulverizador manual. A inoculação via endoesofágica foi realizada com auxílio de uma sonda e seringa graduada de 1mL, com 0,1mL da cultura de *Salmonella* Enteritidis para cada pinto. Para a pulverização e para a água de bebida, o inóculo continha 10^{10} UFC °mL⁻¹, de *Lactobacillus paracasei* e para a via endoesofágica 10^3 UFC °mL⁻¹, de *Salmonella* Enteritidis.

Foram utilizados três grupos de 20 pintos, assim distribuídos: Lote 1 – Controle; Lote 2 -- pulverização e adição de probiótico na água de bebida; Lote3 – adição de probiótico na água de bebida e inoculação de *Salmonella* Enteritidis. A cada semana três pintos de cada lote foram retirados de cada grupo para pesagem, sacrifício e coleta do material.

3.1 MATERIAIS DO EXPERIMENTO

Para a realização deste trabalho utilizou-se 3 (três) gaiolas de 1 X 1 m², onde foram colocados 20 pintos de 1 (um) dia, os tratamentos foram feitos na água de bebida. A ração foi elaborada pelo Setor de Avicultura, do Departamento de Zootecnia, sem adição de antibióticos e promotores de crescimento.

Tratamentos

3.1.1 Tratamento 1

No tratamento 1 (T1) os pintos foram alimentados com água e ração convencional sem adição de antibiótico e promotores de crescimento.

3.1.2 Tratamento 2

No tratamento 2 (T2) foi adicionado *Lactobacillus paracasei* (10^{10} UFC $^{\circ}$ mL $^{-1}$) na água de bebida e por pulverização do ambiente.

3.1.3 Tratamento 3

No tratamento 3 (T3) foi adicionado *Lactobacillus paracasei* (10^{10} UFC $^{\circ}$ mL $^{-1}$) na água de bebida e pulverização do ambiente, e feita à inoculação de (10^3 UFC $^{\circ}$ mL $^{-1}$) de cultura de *Salmonella* Enteritidis, no esôfago dos pintos.

3.2 PROCESSAMENTO

A necropsia dos pintos (Fotografias 4, 5 e 6) foi realizada no Laboratório (LCDPA), Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Federal de Santa Maria – RS, onde foi retirado o ceco das aves. Após foram levados para análise no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos – USFM.



Fotografia 4 - Necropsia dos Pintos



Fotografia 5 - Retirada do Ceco.



Fotografia 6 - Coleta do Ceco. Após a coleta o ceco foi colocado em uma placa de petry esterilizada.

3.2.1 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

Nesta seção serão expostas as análises microbiológicas deste trabalho.

3.2.2.1 Contagem de bactérias lácticas

A contagem de bactérias lácticas foi realizada para os cecos dos frangos. O meio de cultura utilizado foi o Ágar para *Lactobacillus* segundo DE Man, Rogosa e Sharpe – MRS (MERK®). Foram realizadas diluições sucessivas e alíquotas de 1 mL de cada diluição para placas de Petri esterilizadas. Adicionou-se a cada placa 15-20 mL do meio MRS, previamente fundido e resfriado à temperatura de 40-45°C. Com movimentos em oito, fez-se a homogeneização do meio com o inóculo. Após a completa solidificação do meio, adicionou-se uma sobrecamada de ágar MRS. As placas foram incubadas invertidas, em estufa a 37°C, por 3 dias. Após a incubação, fez-se a contagem das colônias para placas de mesma diluição que apresentavam de 30 a 300 colônias. As médias aritméticas das contagens, pelo respectivo fator de diluição foram transformadas em logaritmos decimais de $\text{UFC}^{\circ}\text{g}^{-1}$.

3.2.3 Determinação de Salmonella pelo método Tecra Salmonella Imunoensaio Visual (Salvia)

O método Tecra Salmonella imunoensaio visual (salvia) é uma prova de triagem rápida e específica para detecção de *Salmonella* sp. “in vitro” em alimentos e amostras ambientais, após enriquecimento, até 1 UFC de Salmonella em 25 gramas de amostra pode ser detectada.

3.2.3.1 Princípio do teste

Tecra SALVIA é um teste de ELISA (enzime-linked immunosorbent assay) no formato de configuração “sandwich”, sendo a leitura dos resultados feita visualmente.

- a) Anticorpos de alta afinidade para Salmonella estão absorvidos nas cavidades removíveis. Se houver a presença de antígenos de *Salmonella* sp. Presentes nas amostras previamente aquecidas, estes serão capturados pelos anticorpos. Todo material da amostra é eliminado na lavagem.
- b) O *sandwich* é completado com adição de enzimas ligadas a anticorpos específicos para Salmonella (conjugado).
- c) A presença de Salmonella é indicada quando o substrato converte o conjugado adicionado a uma coloração verde. Na ausência de *Salmonella*, não haverá coloração verde.

3.2.3.2 Realização do Salvia

Nesta seção será explicado o método de realização do salvia.

3.2.3.2.1 Tratamento térmico da amostra

Foi transferido 1 mL da amostra de *Salmonella* Enteritidis., enriquecida para um tubo graduado com rosca, agitou-se e aqueceu-se à 100°C, por 15 minutos. Resfriou-se a amostra a temperatura ambiente para realização do teste.

3.2.3.2.2 Preparação das microplacas

Foi removida a quantidade de cavidades móveis requeridas de acordo com o número de amostras, somadas dos controles positivo e negativo e encaixadas as mesmas firmemente na microplaca.

3.2.3.2.3 Adição das amostras

Utilizando uma ponteira estéril para cada amostra, foi transferido uma alíquota de 200 μ L dos controles e amostras nas cavidades, individualmente, anotando sua identificação no quadro de identificação de amostras. A microplaca foi coberta com um filme plástico e incubada por 30 minutos a 35-37°C.

3.2.3.2.4 Primeira lavagem

Para a primeira lavagem, esvaziaram-se as cavidades, invertendo a microplaca rapidamente várias vezes, até remoção do líquido residual, pressionando a placa em papel absorvente. Após as cavidades foram cobertas com a solução de lavagem, esvaziando-as seguidamente por 3 vezes. Evitando a formação de bolhas. Entre uma placa de lavagem e outra, deixou-se a solução de lavagem agir nas cavidades em cada fase por, no mínimo 20 segundos, para que a leitura se tornasse mais nítida.

3.2.3.2.5 Adicionar o conjugado

Verificaram-se se as cavidades estavam vazias e adicionaram-se 200 uL de conjugado a cada uma. Cobriu-se com um filme plástico e incubou-se por 30 minutos a 35-37°C.

3.2.3.2.6 Segunda lavagem

Esvaziaram-se as cavidades e lavou-se novamente por 4 vezes como descrito no item 4.

3.2.3.2.7 Adição do substrato

Verificaram-se se as cavidades estavam vazias e adicionou-se a cada uma 200 uL de substrato. Após Incubou-se a temperatura ambiente 20-25°C por mínimo 15 minutos, observando após se o controle positivo apresentava coloração equivalente a figura 4 do cartão de leitura. Movimentou-se gentilmente a placa para melhor distribuição da cor.

3.2.3.2.8 Adição da solução stop

Para estabilizar os resultados e manter a leitura, adicionou-se a 20 uL da solução stop a cada cavidade movimentando gentilmente a placa.

3.2.3.2.9 Leitura dos resultados

Para leitura dos resultados utilizou-se o cartão de cor.

Card 1 : Color comparator for TECRA[®] Salmonella Visual Immunoassays.

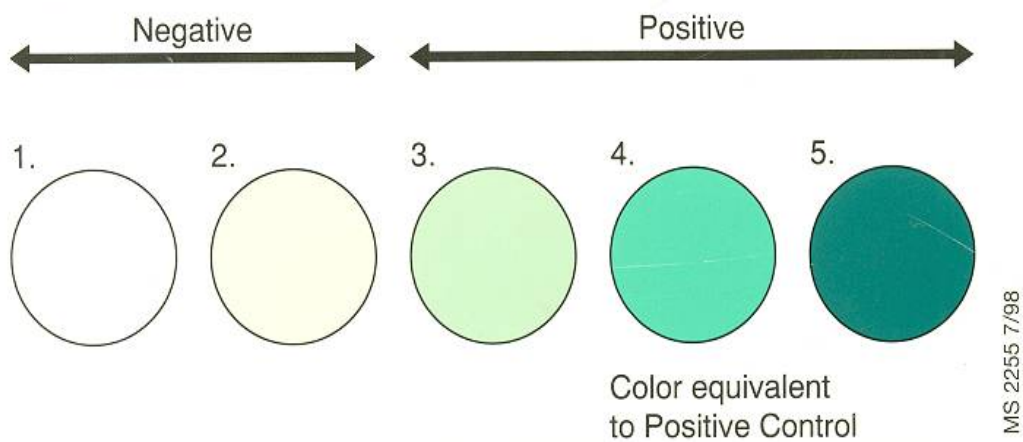


Imagem 1 - Cartão de cor.

Fonte: AOAC ([200-])..

3.2.3.3 Confirmação de resultados positivos presuntivos

As amostras positivas no SALVIA foram confirmadas estriando-se a amostra já enriquecida no M-broth e realizando-se posteriormente provas bioquímicas e sorológicas, pelo Método Convencional.

Para a pesquisa de Salmonella, a metodologia empregada foi a convencional, Brasil (1995).

a) Isolamento e Seleção: do enriquecimento seletivo de cada tubo, com auxílio de uma alça de platina, foram estriadas placas contendo ágar SS (DIFCO[®]) e ágar Rambach (MERK[®]), que foram incubadas invertidas a 37°C, por 24 horas.

b) Confirmação das colônias típicas de Salmonella: para a confirmação das colônias típicas de Salmonella, foi utilizado o sistema ENTEROKIT B[®] (PROBAC), que emprega os meios EPM, MILi e Citrato Simmons. Tocou-se o centro da colônia suspeita com uma agulha de platina e semeou-se o tubo EPM em toda a superfície e por picadura até o fundo do tubo; o tubo MILi, por picadura central em profundidade e o tubo de Citrato Simmons, com o mesmo inóculo, em toda a superfície. Todos os tubos foram incubados a 37°C com as

tampas semi-rosqueadas, por um período de 24 horas. O meio EPM permite observar: produção de gás, produção de H₂S, produção de urease, produção de L-Triptofano desaminase. Através do meio MILi, pode-se verificar a motilidade, produção de indol, lisina dexcarboxilase. O meio Citrato Simmons, permite observar a utilização de Citrato..

Após 24 horas foi realizada a leitura e interpretação dos testes e as reações consideradas típicas de *Salmonella* foram:

Para o meio EPM

- Produção de gás: aparecimento de bolhas ou deslocamento do meio do fundo do tubo.
- Produção de H₂S: enegrecimento do meio
- Hidrólise da uréia: não houve mudança de cor para azul ou verde-azulada do meio.
- Desaminação do triptofano: não houve aparecimento de cor verde-garrafa na superfície do meio

Para o meio MILi

- Motilidade: crescimento além da linha de picada.
- Descarboxilação da lisina: o meio adquiriu cor púrpura acentuada.
- Produção do indol: após adicionado ao meio, o reativo de Kovacs não alterou sua cor.

Para o meio Citrato Simmons

Houve o aparecimento de cor azul no meio.

As amostras que apresentaram as provas bioquímicas características de *Salmonella*, foram submetidas ao:

- d) Teste sorológico *Salmonella* Polivalente (PROBAC®): Utilizou-se à técnica de aglutinação em lâmina. Para cada amostra tomou-se uma lâmina de vidro e a partir da cultura de 24 horas, do meio EPM, foi feita uma suspensão e com o auxílio de uma alça de platina transferiu-se uma alçada para duas partes da lâmina. Após adicionou-se uma gota de solução salina estéril a uma das partes da lâmina e uma gota do anti-soro polivalente foi acrescentada em uma das partes. À parte sem a presença do soro, foi considerado o controle negativo, ao passo que, com a ocorrência da aglutinação, o teste foi considerado positivo para *Salmonella*.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A adição de probióticos (culturas de microorganismos vivos) à água de bebida das aves, promove a colonização e multiplicação das bactérias presentes nesses produtos, como espécies de *Lactobacillus*, no trato intestinal das aves contra a colonização por patógeno, como *Salmonella spp* (SCHNEITZ, 1992).

O trato gastrointestinal (TGI) de frangos de corte é pouco desenvolvido nos primeiros dias de vida dos pintinhos. Quando as aves são alimentadas ou tratadas incorretamente na fase inicial, maiores problemas podem aparecer nas fases seguintes.

Neste trabalho, o *Lactobacillus paracasei* foi administrado, no primeiro dia de vida, na água de bebida e com pulverização do ambiente. Nesta idade, como o TGI não está totalmente desenvolvido, a absorção do tratamento foi mais eficiente. O desenvolvimento e estabelecimento da flora intestinal ocorrem de forma prática, logo após o início da ingestão de água e alimento pelas aves. A ingestão de ração e água estimula a atividade do TGI, incluindo a produção de ácidos, a biossíntese de enzimas, bem como a absorção do *Lactobacillus paracasei*.

O grande interesse em controlar a Salmonela e outros patógenos, se deve a que eles têm uma interferência na redução da digestibilidade e de absorção dos nutrientes da ração, contribuindo com a síndrome de passagem rápida, com o aumento da excreção de fezes, em muitos casos fluídas, que levam a uma perda de carboidratos hidrossolúveis, vitaminas e aminoácidos. Com isso, produz a morte dos tecidos intestinais que acabam enriquecendo o conteúdo intestinal e se tornando meio de cultura para o crescimento bacteriano, principalmente Salmonella (MACARI et al, 2002).

TABELA 1 - Amostras positivas e negativas na detecção de *Salmonella* spp pelo Método Convencional em pintos com 45 dias, tratados com *Lactobacillus paracasei*.

| DIAS | TRATAMENTOS | | |
|------|-------------|----------|----------|
| | L1 | L2 | L3 |
| 0 | Ausência | Ausência | Ausência |
| 7 | Ausência | Ausência | Presença |
| 14 | Presença | Ausência | Presença |
| 21 | Ausência | Ausência | Presença |
| 28 | Presença | Ausência | Presença |
| 32 | Presença | Ausência | Ausência |
| 42 | Ausência | Ausência | Ausência |

L1: Controle; L2: Adição de *Lactobacilos paracasei* na água de bebida e pulverização do ambiente;

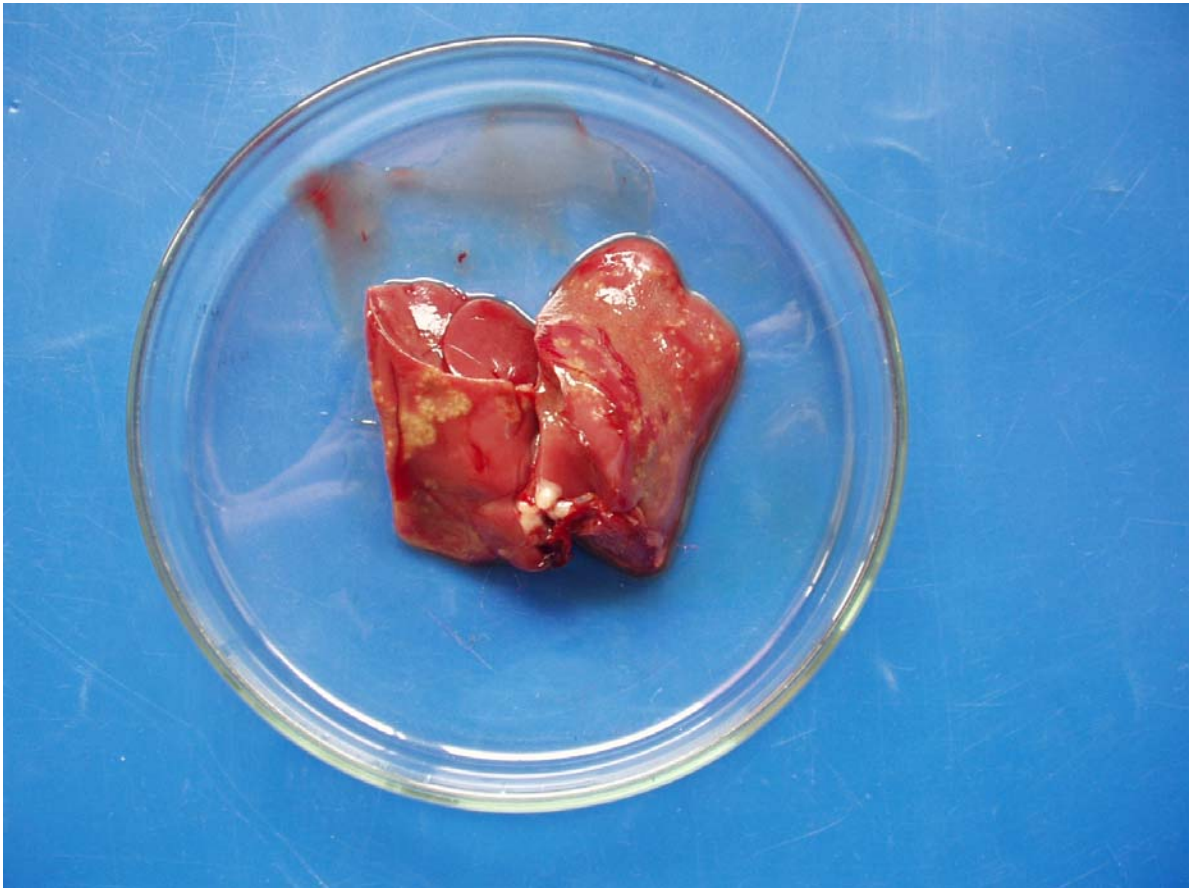
L3: Adição de *Lactobacilos Paracasei* na água de bebida e pulverização do ambiente + inoculação de *Salmonella* Enteritidis;

A presença nas fezes e a colonização dos cecos de pintos de corte por *Salmonella* Enteritidis foi acentuadamente reduzida nos grupos tratados com *Lactobacillus paracasei* (L2) por pulverização e adição na água de bebida, concordando com achados de outros autores (CORRIER et al., 1990; ZINPRIN et al., 1991; KOGUT et al., 1994; ANDREATTI FILHO et al., 1997). Com isso podemos constatar que o uso de probióticos inibe ou reduz o desenvolvimento de salmonela, no trato intestinal das aves, já que foi constatada sua presença em três amostras analisadas, do tratamento Controle (L1). Esta contaminação possivelmente ocorreu devido à presença de bactérias na ração, água ou ambiente, onde as aves se encontravam.

No tratamento com adição de *Lactobacillus paracasei* na água de bebida e pulverização do ambiente + inoculação de *Salmonella* Enteritidis (L3), verificamos três ausências de Salmonela, nos dias 0; 32; e 42. Nas amostras positivas para Salmonela observamos lesões características no fígado (Figura. 7). Estas lesões no fígado são típicas de contaminação por Salmonela, quando esta atinge a corrente sanguínea, provavelmente de modo intracelular, e são removidas pelo fígado, baço ou medula óssea (COLLINS, 1993).

Nesta fase, ocorre à multiplicação bacteriana em uma taxa que reflete a virulência da linhagem em questão, podendo resultar na morte do hospedeiro. Todas as lesões encontradas neste trabalho apareceram no fígado a partir da terceira análise, com 14 dias de vida.

No primeiro dia de tratamento considerado dia 0, observamos ausências de SE, em todos os tratamentos. A inoculação do tratamento foi realizada via esôfago, após 30 minutos ocorreu à coleta do ceco para análise, tempo considerado curto para que a SE se alojasse no intestino. Já no 32 e 42 dias ocorreram ausências de SE o que indica a capacidade inibitória do probiótico utilizado. Entretanto, foi observado que a inibição ocorre tardiamente.



Fotografia 7 - Lesões características no fígado de presença de *Salmonella* de pintos de corte com 45 dias, tratados com *Lactobacillus paracasei* na água de bebida pulverização do ambiente + inoculação esofágica de *Salmonella* Enteritidis.

aves e inibirem a fixação e a subsequente colonização de diferentes espécies de *Salmonella* spp, possivelmente pela produção de componentes antimicrobianos. Estes funcionam como bactericidas ou bacteriostáticos e que poderiam ser fatores que contribuem na redução das populações de *Salmonella* spp e outras bactérias, conforme dados comprovados no presente trabalho. Conforme Sinnel (1995), a flora cecal compete com patógenos, reduzindo infecções provocadas por *Salmonella* spp nos cecos das aves.



Fotografia 9 - Ceco com hemorragia, em pintos de corte tratados com *Lactobacillus paracasei* na água de bebida e pulverização do ambiente + inoculação esofágica de *Salmonella* Enteritidis, encontrada no tratamento (L3).

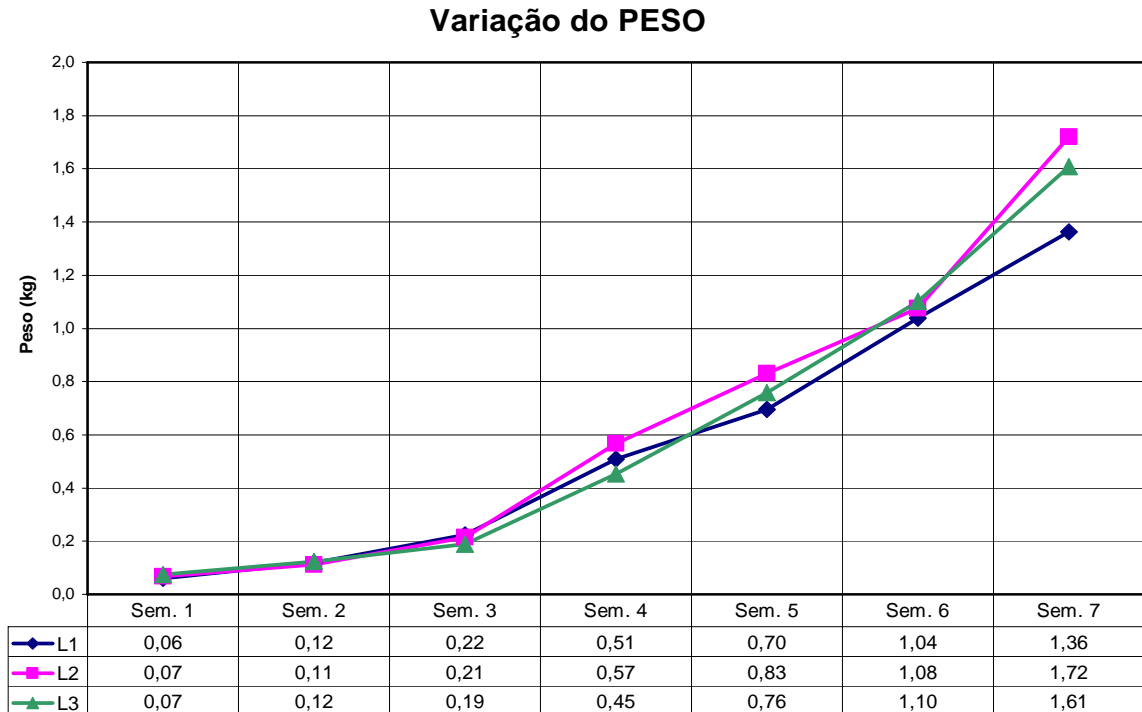
Os mecanismos envolvidos na fixação das células dos *Lactobacillus* à mucosa intestinal das aves e a possível inibição da fixação de *Salmonella* spp por esses microrganismos ainda são inteiramente desconhecidas (CRAVEN & WILLIAMS, 1998).

O cecon é o local onde a *Salmonella* mais se desenvolve, essa característica, conforme Mchan et al (1989) relaciona-se com a presença de receptores específicos no órgão e com a fisiologia do peristaltismo cecal, que determinam maior tempo de

permanência do bolo alimentar e pH, entre outros fatores. Característica esta que se comprova neste trabalho.

A infecção do trato digestivo de frangos de corte por salmonelas é mais eficaz e persistente no ceco, como demonstraram os resultados deste trabalho, local de importância na patogenia das infecções das aves (HARGIS et al., 1995). A mucosa cecal é o local de maior colonização por *Salmonella spp.* e por outras espécies patogênicas da família *Enterobacteriaceae*, quando comparado com outros locais do trato digestivo (ANDREATTI FILHO et al., 1993) e sua colonização é utilizada como parâmetro para avaliar a eficácia de tratamentos contra salmoneloses (CORRIER et al., 1990).

4.1 GANHO DE PESO DE PINTOS



L1: Controle; L2: Adição de *Lactobacillus paracasei* na água de bebida e pulverização do ambiente; L3: Adição de *Lactobacillus paracasei* na água de bebida e pulverização do ambiente + inoculação de *Salmonella Enteritidis*;

Gráfico 1 - Variação do peso de frangos de corte com 45 dias de idade, tratados com *Lactobacillus paracasei* na água de bebida e pulverização do ambiente + inoculação de *Salmonella Enteritidis*

O ganho de peso (conforme gráfico 1) do lote que recebeu *Lactobacillus paracasei* pulverizado e na água de bebida (L2) não diferiu dos demais tratamentos. Como esse mesmo tratamento não acusou a presença de SE nas fezes, enquanto nos demais grupos tratados com probiótico os índices de SE nas fezes foram detectáveis, conforme indicação do gráfico e resultados deste trabalho, à presença de *Salmonella Enteritidis* não interfere decisivamente na produtividade de frangos de corte, conforme já constatado por outro pesquisador (SILVA, 1994). Embora não tenha ocorrido variação significativa entre os grupos, em relação ao peso corporal, o grupo tratado com *Lactobacillus paracasei* pulverizado e na água de bebida (L2), apresentou melhor *performance*.

Durante a necropsia verificamos lesões características no fígado, nestas mesmas aves (L3). Foi observado grande depósito de gordura principalmente no peito das mesmas.

Este trabalho tem importância em todo o ciclo produtivo de frangos de corte, devido à redução de incidência de Salmonela na indústria avícola. O principal motivo para a adoção de programas de controle da incidência da salmonela na produção de aves, é que as empresas sofrem pressão dos consumidores e da legislação específica para que estas garantam segurança alimentar de seus produtos.

Para 2006, a União Européia já decretou a proibição total dos antibióticos promotores de crescimento nas rações, e o Brasil, como um dos maiores produtores de carnes e proteína animal do mundo, já começa a se adequar a esta restrição dos europeus.

Hoje, a preocupação sobre os efeitos colaterais é clara, e tanto consumidores como fabricantes estão procurando alternativas como os produtos denominados probióticos e também os prebióticos, por não determinarem resíduos nos produtos de origem animal e não desenvolverem resistência às drogas utilizadas, por serem essencialmente naturais.

Na indústria avícola este trabalho tem aplicação como coadjuvante microbiológico para romper o ciclo de desenvolvimento da salmonela, que entra na indústria através dos animais e retorna para o campo através da ração, fornecida na alimentação.

Desta maneira se estabelece um ciclo vicioso, mantendo um processo de recontaminação e, os animais ingerindo de forma contínua essas rações contaminadas, resultam na infecção ou num estágio de portador temporário ou de doença das aves.

Esta tecnologia proporciona benefícios e estaria substituindo os produtos químicos oferecidos no mercado, como antibióticos e ácidos orgânicos, que são altamente corrosivos.

5 CONCLUSÕES

Dos resultados obtidos no presente trabalho pode-se concluir que:

- O *Lactobacillus paracasei* possui atividade inibitória em relação a *Samonella* Enteritidis, visto que no tratamento que foi, adicionado *Lactobacillus paracasei*, 10^{10} UFC $^{\circ}$ mL $^{-1}$, na água de bebida, todas as amostras mostraram-se com ausência de Salmonela.
- Também verificamos que mesmo no tratamento em que foi adicionado de *Lactobacillus paracasei*, 10^{10} UFC $^{\circ}$ mL $^{-1}$, na água de bebida, e com à inoculação de 10^3 UFC $^{\circ}$ mL $^{-1}$ de *Salmonella* Enteritidis, no esofago dos pintos, o controle ocorreu tardiamente, possivelmente devido à competição entre as bactérias.
- Em relação ao comportamento do *Lactobacillus paracasei*, utilizado na água de bebida e pulverizado no ambiente, mostrou-se eficiente, devido a este ser um método pratico e fácil de aplicação em grandes aviários.
- O *Lactobacillus paracasei*, pode vir a ser um grande aliado das indústrias no controle das infecções por SE.

REFERÊNCIAS

- ABDULRAHIM, S.M. et al. The influence of *Lactobacillus acidophilus* and bacitracina on layer performance of chickens and cholesterol content of plasma and egg yolk. **British Poultry Science**, Edinburgh, v.37, n.2, p.341-346, 1996.
- ADAMS, M.R.; MOSS, M.O.O. Microbiología de los alimentos, **Acribia, S.A.**, p. 44., 1997.
- ANDREATTI FILHO R. L. Sorovares de *Salmonella* isolados de materiais avícolas no período de 1994 a 1999. **Revista de Educação Continuada.**, São Paulo, n. 4, p. 90-101, 2001.
- _____; SILVA, E.N.; CURI, P.R. Ácidos orgânicos e microbiota cecal anaeróbia no controle da infecção experimental de frangos por *Salmonella typhimurium* e *Salmonella enteritidis*. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.49, p.661-672, 1997.
- _____ et al. Efeito da vacina contra coccidiose sobre a colonização de *Salmonella enteritidis* em aves inoculadas com microbiota cecal anaeróbia. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.51, p.311-316, 1999.
- ANDREATTI FILHO, R.L.; SILVA, E.N.; BALEN, L. Efeito da via de inoculação na patogenicidade de amostras patogênica e apatogênica de *Escherichia coli* em galinha. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.45, p.475-486, 1993.
- _____ et al. Use of anaerobic cecal microflora, lactose and acetic acid for the protection of broiler chicks against experimental infection with *Salmonella Typhimurium* and *Salmonella Enteritidis*. **Braz. J. Microbiol.**, v.31, p.107-112, 2000.
- APINCO** - Associação Brasileira dos Produtos de Pintos de Corte 2002. Dados estatísticos. Campinas, SP.
- ARAÚJO E, PACHECO MASR, BONI RF, FONSECA YSK, GELLI DS, FERNANDES SA, TAVECHIO AT. Surtos alimentares por *Salmonella enteritidis* associados ao consumo de alimentos à base de ovos em Sorocaba, SP. **Higiene Alimentar** 1995; 9:24-26.
- BARNHART HM, DREESEN DW, BASTIEN R, PANCORBO OC. Prevalence of *Salmonella enteritidis* and other serovars in ovaries of layer hens at time of slaughter. **Journal of Food Protection**, n. 54, p. 488-491, 1991.
- BARROW PA, LOVELL MA, BERCHIERI A. The use of two live attenuated vaccines to immunize egg-laying hens against *Salmonella enteritidis* phage type 4. **Avian Pathology**, n. 20, p. 681-692, 1991.
- BARROW PA, LOVELL MA, SZMOLLENY G, MURPHY CK. Effect of enrofloxacin administration on excretion of *Salmonella enteritidis* by

experimentally infected chickens and on quinolone resistance of their *Escherichia coli* flora. **Avian Pathology**, n. 27, p. 586-590, 1998.

BARROW, P.A. *Salmonella* control - past, present and future. **Avian Pathol.**, v.22, p.651-669, 1993.

BERCHIERI JR., A. et al.. Farinha de carne como fonte de *Salmonella* em granja avícola. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 1989;

_____ et al. *Salmonella* in poultry feeds in Brazil. **Revista de Microbiologia**, n. 24, 1993.

_____ et al. Contaminação por *Salmonella* em farinhas de origem animal utilizadas no preparo de ração. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, n. 4, p. 83-88, 1984.

BERTECHINI, A.G.; HOSSAIN, S.M. Utilização de um tipo de probiótico como promotor de crescimento em rações de frangos de corte. In: CONFERÊNCIA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 1993, Santos. **Anais...** Santos: APINCO, 1993. p.1.

BERNET, M.-F., BRASSART, D., NEESER, J.-R., SERVIN, A.L. Adhesion of human bifidobacterial strains to cultured human intestinal epithelial cells and inhibition of enteropathogen–cell interactions. **Applied and Environmental Microbiology** 59, 1993.

BOYER C. I. Jr. et al. Salmonellosis in turkeys and chickens associated with contaminated feed. **Avian Dis.** n. 6, p. 43-50, 1962.

BRADLEY GT, SAVAGE TF. Enhanced utilization of dietary calcium, phosphorus, nitrogen and metabolizable energy in poults feed diet containing a yeast culture. **Poultry Science**, n. 73, p. 124, 1994. (Abstract).

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA - Portaria SDA. N.126, de 06 novembro 1995. **Diário Oficial da União, Brasília**, DF. MAA. [Normas para diagnóstico das Salmoneloses aviárias].

BUMSTEAD N, BARROW PA. Resistance to *Salmonella gallinarum*. S. pullorum and S. enteritidis in inbred lines of chickens. **Avian Diseases** 1993; 37: 189-193.

CAVALCANTI JS, AS TEIXEIRA, BL OLIVEIRA, AIG Probióticos e farinhas de carne e ossos com diversos níveis de contaminação bacteriana para ... **Anais da XXXIII reunião anual da Sociedade Brasileira de avicultura**, 1996.

CRAVEN SE, WILLIAMS DD. In vitro attachment of *Salmonella typhimurium* to chicken cecal mucus: effect of cations and pretreatment with *Lactobacillus* spp. isolated from the intestinal tracts of chickens. **J Food Prot.** 1998 Mar; 61(3):265-71.

CENTER FOR DISEASES CONTROL. Outbreak of Salmonella enteritidis associated with consumption of raw shell eggs; 1991. **MMWR** 1992.

CENTER FOR DISEASES CONTROL. SE outbreaks reported; 1992. **MMWR** 1993.

CENTER FOR DISEASES CONTROL. UPDATE: Salmonella enteritidis infections and shell eggs – United States, 1990. **MMWR**, n. 39, p. 902-912 / n. 41, p. 369-372, 1990.

CHERRINGTON CA, HUIS IN'T, VELD JH. Comparison of classical isolation protocols with a 24h screen to detect viable salmonellas in faeces. **Journal of Applied Bacteriology**, n. 75, p. 65-8, 1993.

CHOCT, M. AND KOCHER, A. Non-starch polysaccharides: Digestion and its secondary effects in monogastrics. **Proceedings of the 24th annual scientific meeting of the Nutrition Society of Australia**, 24: 31-38, 2000.

CLASSEN, H.L. Cereal grain starch and exogenous enzymes in poultry diets. **Anim. Feed Sci. Technol.**, v. 62, n. 1, p.21-27, 1996.

COLLINS FM. Cellular mediators of anti-microbial resistance. In: CABELLOF, HORMAECHE C, MASTROENI P BONINA L. The Biology of Salmonella. **NATO ASI Series, Series A. Life Sciences**. 1993.

CORRIER, D.E. Mycotoxicosis: mechanisms of immunosuppression. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.30, p.73-87, 1991.

CORRIER, D.E.; HINTON Jr., A.; ZIPRIN, R.L. et al. Effect of dietary lactose on cecal pH, bacteriostatic volatile fatty acids and *Salmonella typhimurium* colonization of broiler chicks. **Avian Dis.**, v.34, p.617-625, 1990.

COWDEN J.M. et al. Case-control study of infections with Salmonella enteritidis phage type 4 in England. **British Medical Journal**, n. 299, p. 771-773, 1989.

EBEL ED, MASON J, THOMAS LA, FERRIS KE, BECKMAN MG, CUMMINS DR, SCROEDER-TUCKER L, SUTHERLIN WD, GLASSHOFF RL, SMITHHISLER NM. Occurrence of Salmonella enteritidis in unpasteurized liquid egg in the United States. **Avian Dis.** 1992.

ECKROADE RJ. In: Proceeding of the Symposium on the Diagnostic and Control of Salmonella. **US Animal Health Association**. San Diego, CA. USA, 1992.

EDWARDS P. R. & GALTON M. M. Salmonellosis. **Adv. Vet. Sci.** 1967.

ESKELUND K. Experiencias com la bacterina de Salmonella enteritidis. **Avicultura Profesional**, 1992.

FERNANDES SA, TAVECHIO AT, GHILARD ACR, YONAMINE EK, DO VALLE GRF. Caracterização de cepas de Salmonella enteritidis isoladas de crianças

internadas em hospitais do município de São Paulo. In: Congresso Brasileiro de Microbiologia; 1999; Salvador, Bahia. Brasil. p. 8.

FERREIRA A. J. P.; ITO NMK, BENEZ S. M. Infecção natural e experimental por *Salmonella enteritidis* em pintos. In: Conferência APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas. Campinas, São Paulo: 1990.

_____. et al. Infecção natural e experimental por *Salmonella enteritidis* em pintos. In: Conferência Apinco de Ciência e Tecnologia Avícolas. **Anais...** Campinas: FACTA, 1990. p.171.

FISHER G, Maier JC, Rutz F, Bermudez VL. Desempenho de frangos de corte alimentados com dietas à base de milho e farelo de soja, com ou sem adição de enzimas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, n. 1, p. 402-10, 2002.

FRAZER, W. C. AND WESTHOFF, D. C. 1988. **Food Microbiology**. 4th edition.

FRIEDMAN CR et al. Public health risk from Salmonella-based rodenticides. **Lancet**, n. 347, p. 1705-1706, 1996.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. A review. **J. Appl. Bacteriology**, n. 66, p. 365-378, 1997.

_____. Probiotics in man and animals. **J. Appl. Bacteriol.**, v.66, p.365-375, 1989.

_____; GIBSON, G.R. Modification of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. **Scand. J. Gastroenterol.**, v.32, p.28-31, 1997.

FUZHARA TO, FERNANDES AF, FRANCO BDGM. Prevalence and dissemination of Salmonella serotypes along the slaughtering process in Brazilian small poultry slaughterhouses. **Journal of Food Protection**, n.63, p. 1749-1753, 2000.

_____. Freqüência e características de Salmonella em abatedouros de pequeno e médio portes da região do grande ABC. [Tese de Doutorado]. São Paulo (SP): **Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP**; 2001.

GAST RK. PARATYPHOID INFECTIONS. IN: CALNEK, BW, BARNES HJ, BEARD CW, MC DOUGALD LR, SAIF YM, editores. *Diseases of Poultry*. 10th ed. **Iowa State University Press**, Ames, Iowa, USA. 1997.

GEDEK, B. Kompendium der medizinischen Mykologie. Pareys Studentexte 25, Berlin, Hamburg: **Paul Parey**, 1980. p.147-182.

GIBSON, G.R.; ROBERFROID, M.B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. **J. Nutrition**, v. 125, p. 1401-12, 1995.

HAKANEN A, KOTILAINEN P, HUOVINEN P, HELENIUS H, SIITONEN A. Reduced fluorquinolone susceptibility in *Salmonella enterica* serotypes in travelers returning from southeast Asia. **Emerging Infectious Diseases** 2001.

HAMMACK, T.S., SHERROD, P.S., BRUCE, V.R. et al. Research note: Growth of *Salmonella enteritidis* in grade A eggs during prolonged storage. **Poult. Sci.**, v.72, p.373-377, 1993.

HASSAN JO, CURTISS III R. Efficacy of a live avirulent *Salmonella typhimurium* vaccine in preventing colonization and invasion of laying hens by *Salmonella typhimurium* and *Salmonella enteritidis*. **Avian Diseases** 1997.

HAVENAAR, R et al. Selection of strains for probiotics use. In: FULLER, R.; Probiotics: the scientific basic. London: **Chapman and Hall**, 1992. p.209-224.

HARGIS, BM et al. Evaluation of the chicken crop as a source of *Salmonella* contamination for broiler carcasses. **Poultry Science**, 1995.

HENRIQUE, A.P.F., FARIA, D.E., NETO, R.F. et al. Uso de probióticos e antibióticos como promotores de crescimento para frangos de corte. In: Conferência Apinco de Ciência e Tecnologia Avícolas, 1997, São Paulo. Trabalhos de Pesquisas. Campinas: FACTA, 1997. p.27.

HENZLER DJ, OPITZ HM. The role of mice in the epizootiology of *Salmonella enteritidis* infection on chicken layer farms. **Avian Diseases** 1992.

HOFER E, SILVA FILHO JS, REIS EMF. Sorovares de *Salmonella* isolados de matérias-primas e de ração para aves no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, n. 18, p. 21-27, 1998.

_____; _____. Prevalência de sorovares de *Salmonella* isolados de aves no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, n. 17, p. 55-62, 1997.

_____; REIS E. M. F. 1994. *Salmonella* serovars in food poisoning episodes recorded in Brazil from 1982 to 1991. **Revta Inst. Med. Trop.**, São Paulo.

HOLLISTER, A.G et al. Effect of lyophilization in sucrose plus dextran and rehydration in thioglycollate broth on performance of competitive exclusion cultures in broiler chicks. **Poult. Sci.**, v.74, p.586-590, 1995.

KOGUT, M.H. FUAKATA, T., TELLEZ, G. et al. Effect of *Eimeria Tenella* infection on resistência to *Salmonella Typhimurium* colonization in broiler chicks inoculated with anaerobic cecal flora and fed dietary lactose. *Avian Dis.*, 1994.

HUMPHREY TJ. Public health implications of the infection of egg-laying hens with *Salmonella enteritidis* phage type 4. **World's Poultry Science Journal**, n. 46, p. 5-13, 1990.

- ICMSF. International Commission on Microbiological Specifications for Foods. Microorganismos de los alimentos: características de los patógenos microbianos. **Zaragoza: Acribia**. p. 349-386, 1996.
- IRINO K, FERNANDES SA, TAVECHIO AT, NEVES BC, DIAS AMG. Progression of Salmonella enteritidis phage type 4 strains in São Paulo State, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo** 1996.
- JAY, J.M. Microbiologia moderna de los alimentos. Zaragoza, **Ed. Acribia**, p. 190-209, 1973.
- JIN, L.Z. et al. 1998. Growth performance, intestinal microbial populations, and serum cholesterol of broilers fed diets containing Lactobacillus cultures. **Poult. Sci.**, n. 77, p.1259-1265, 1998.
- JACQUELINE E. SHEA, CARMEN R. BEUZON, COLIN GLEESON, ROSANNA MUNDY, AND DAVID W. HOLDEN, Influence of the Salmonella typhimurium Pathogenicity Island 2 Type III Secretion System on Bacterial Growth in the Mouse. **Hammersmith Hospital, London W12 0NN**, United Kingdom, 1998.
- KAKU M et al. Surto alimentar por Salmonella enteritidis no Noroeste do Estado de São Paulo, Brasil. **Revista de Saúde Pública** 1995.
- KELLEY TR, PANCORBO OC, MERKA WC, BARNHARTS HM. Antibiotic resistance of bacterial litter isolates. **Poultry Science**, n. 77, p. 243-247, 1998.
- LANGONI, H., PRADO, R.A.T., PINTO, J.P.A.N. et al. Isolamento de salmonelas em ovos de galinha oferecidos no comércio de Botucatu - S.P. **Hig. Alimentar**, v. 9, p.45-47, 1995.
- LILLY, D.M.; STILLWELL, R.H. Probiotics: growth promoting factors produced by microorganisms. **Science**, v.147, p.747-8, 1965.
- LÍRIO V. S. et al.. Frequência de 17 sorotipos de Salmonella isolados em alimentos. **Higiene Alimentar** 1998; 12: 36-42.
- LODDI, M.M. et al. Uso de probiótico e antibiótico sobre o desempenho, o rendimento e a qualidade de carcaça de frangos de corte. **Rev. Bras. Zootec.**, v.29, p.1124-1131, 2000a.
- _____ et al. Ação isolada ou combinada de antibiótico e probiótico como promotores de crescimento em rações iniciais de frangos de corte. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 37, 2000, Viçosa. **Anais ...Viçosa: SBZ**, 2000.
- _____ et al. Ação isolada ou combinada de antibiótico e probiótico como promotores de crescimento em rações iniciais de frangos de corte. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 37, 2000, Viçosa. **Anais ...Viçosa: SBZ**, 2000b.

MACARI, M. FURLAN, L. GONZÁLES, E. **Fisiologia Aviária – Aplicada a frangos de corte**; FUNEP/UNESP, 2002.

MCHAN F, COX NA, BLANKENSHIP LC, BAILEY JS. In vitro attachment of *Salmonella typhimurium* to chick ceca exposed to selected carbohydrates. *Avian Diseases*, 1989.

MARUTA, K. Probióticos e seus benefícios. In: CONFERÊNCIA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 1993, Santos. **Anais...** Santos: APINCO, 1993.

MEAD GC. Hygiene Problems and Control of Process Contamination. Mead GC. *Processing of Poultry*. New York, **Elsevier Applied Science**, n. 360, 1989.

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.

MEYER, H. H., 2001. Biochemistry and physiology of anabolic hormones used for improvement of meat production. **APMIS**, 109:1-8.

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

MIRANDA JBN et al. Ocorrência de *Salmonella* em farinhas utilizadas como matéria prima na composição de rações de animais. **Revista do Instituto Adolfo Lutz** 1978.

NISBET, D.J.; RICKE, S.C.; SCANLAN, C.M. et al. Inoculation of broiler chicks with a continuous-flow derived bacterial culture facilitates early cecal bacterial colonization and increases resistance to *Salmonella typhimurium*. **J. Food Protect.**, v.57, p.12-15, 1994.

NOORDHVIZEN, J.P., FRANKENA, K. *Salmonella enteritidis*: clinical epidemiological approaches for prevention and control of *Salmonella enteritidis* in poultry production. **Int. J. Food Microbiol.**, v.21, p.131-143, 1994.

NOTERMANS S, TEUNIS P, BORGDORFF M, VAN DE GIESSEN A, AMENT AJHA. The cost-benefit analysis of an SE eradication **Program**. **World Poultry** 1996.

NUNES IA. *Salmonella enteritidis* – fagotipos, susceptibilidade a drogas antimicrobianas e epidemiologia molecular baseada na sonda complementar ao rRNA. [Tese de Doutorado]. São Paulo (SP): **Instituto de Ciências Biomédicas – USP**; 1999.

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

OLIVEIRA D.D., SILVA EN. Salmonela em ovos comerciais: ocorrência, condições de armazenamento e desinfecção da casca. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, n. 52, p. 655-661, 2000.

ONIFADE AA, OBIYAN RI, ONIPEDE E, ADEJUMO DO, ABU OA, BABATUNDE GD. Assessment of the effect of supplementing rabbit diet with a culture of *Saccharomyces cerevisiae* using growth performance, blood composition and clinical enzyme activities. **Animal Feed Science and Technology**, n. 77, p. 25-32, 1999.

PERALES I, AUDICANA A. The role of hens' eggs in outbreaks of salmonellosis in north Spain. **International Journal of Food Microbiology**, n. 8, p. 175-180, 1989

PIVNICK, H. et al. Comparison of fresh feces with lyophilized and frozen cultures of feces as inocula to prevent *Salmonella* infection in chicks. **J. Food Protect.**, v.45, p.1188-1194, 1982

PRINCE, R. J. & LEE, J. S. Inhibition of *Pseudomonas* species by hydrogen peroxide producing lactobacilli. **Journal of Milk and Food Technology**. v. 33, p. 13-18, 1970.

RABSCH W, HARGIS BM, TSOLIS RM, KINGSLEY RA, HINZ K, TSCHAPE H, BAUMLER AJ. Competitive exclusion of *Salmonella enteritidis* by *Salmonella gallinarum* in poultry. **Emerging Infection Diseases** 2000.

RIEMANN H, KASS P, CLIVER D. *Salmonella enteritidis* epidemic. **Science**, 2000.

ROBERTS T. Salmonellosis control: Estimated economic costs. **Poultry Science**, 1988; n. 67, p. 936-943, 2000.

ROSENAU MJ. The inefficiency of bacterial viruses in the extermination of rats. **Public Health Bulletin**, 1910.

SANTOS DMS, BERCHIERI JÚNIOR A, FERNANDES SA, TAVECHIO AT, AMARAL LA. *Salmonella* em carcaças de frango congeladas. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 2000; 20: 39-42.

SILVA EN, BOSQUIROLI SL. Epidemiological occurrence of *Salmonella* in a broiler integrated company. In: **World Poultry Congress**; 1996; New Delhi, India. SILVA EN, REIS R, OLIVEIRA RL, ÁVILA FA. *Salmonelas* em farinhas de origem animal destinadas à fabricação de rações. **Arquivo da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais** 1973.

SILVA, EN. Salmoneloses em galinhas. In. Curso de Sanidade Avícola, 1994, Campinas – **Fundação Apinco de Ciência e Tecnologia Avícolas**, 1994.

SILVA MA, ALBINO LFT, ROSTAGNO HS, SILVA MA, VARGAS JR JG. Rendimento de carcaça de frangos de corte em função dos níveis de proteína

bruta e metionina + cistina na ração. In: **Anais da 33ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia. Fortaleza;** 1996;

SILVA, E.N. Salmonella enteritidis em aves e saúde pública. **Hig. Alimentar**, v.9, p.7-13, 1995.

SILVA EN. Salmonelose: Problemas atuais de patologia aviária e saúde pública. In: **Conferência APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas;** 1991; Campinas, São Paulo.Brasil.p. 37-45.

SILVA EN, Snoeyenbos GH, Weinack OM, Smyser CF. Studies on the use of 9R strain of Salmonella gallinarum as a vaccine in chickens. **Avian Dis.** 1992.

SILVA EN, Snoeyenbos GH, Weinack OM, Smyser CF. Studies on the use of 9R strains of Salmonella gallinarum as a vaccine in chickens. **Avian Diseases** 1981; 25: 38-52.

SINNEL, Hans Jurgen - Introduccion a la higiene de los alimentos. **Ed. ACRIBIA,** 1981.

SIMÕES M, MARQUES EGL, ROCHA MMM, PRANDI MAG, PISANI B. Surtos alimentares por Salmonella enteritidis ocorridos na região de Campinas no período de março de 1995 a março de 2001. In: **XXI Congresso Brasileiro de Microbiologia;**, Foz do Iguaçu: 2001.

SIQUEIRA, R.S. Manual de microbiologia de alimentos. Brasília: **EMBRAPA,**159 p. 1995.

SONCINI RA, BACK A. Salmonella enteritidis em aves: erradicação ou controle por vacinação. In: Conferência APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas; 2001. FACTA - Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, Campinas, São Paulo. Brasil. **Anais...**, 2001.

SCHNEITZ, C.; HALONEN, U.; NURMI, E. Use of competitive exclusion to protect newly-hatched chicks against intestinal colonization and invasion by Salmonella Enteritidis PT4. **British Poultry Science**, 33, p775-779, 1992.

SPACKMAN, D. *Salmonella* in poultry in the U.K. Observations and actions. WESTERN POULTRY DISEASE CONFERENCE, 1989 Sacramento. **Proceedings.** s.n., 1989.

STADELMAN, W.J. The preservation of quality in shell eggs In: STADELMAN, W.J. **Egg science and technology.** 3.ed. Westport: AVI, 1986.

STAVRICK, S., T. M. GLEESON, AND B. BLANCHFIELD. 1991. Efficacy of undefined and defined bacterial treatment in competitive exclusion of Salmonella from chicks. Pages 323–330 in: Colonization Control of Human Bacterial Enteropathogens in Poultry. L. C. Blankenship, **ed. Academic Press Inc.**, New York:. 1992.

SNOEYENBOS GH, SMYSER CF, VAN ROEKEL H. Salmonella infections of the ovary and peritoneum of chickens. **Avian Diseases** 1969; 13: 668-670.

ST. LOUIS ME, MORSE DL, POTTER ME. The emergence of grade A eggs as a major source of Salmonella enteritidis infections. **Journal of American Medical Association** 1988; 259: 2103-2107.

TAUNAY A. E., FERNANDES S. A, TAVECHIO A. T. The role of Public Health Laboratory in the problem of salmonellosis in São Paulo State, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, 1996.

TAUXE, R.V. Emerging foodborne diseases: An evolving public health challenge. *Centers Dis. Control Prevention, Atlanta, Special Issue*, v.3, p. 12, 1997.

TAVECHIO A. T. et al. Patterns of Salmonella serovars: increase of Salmonella enteritidis in São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, 1996.

TELLEZ, G.I., KOGUT, M.H., HARGIS, B.M. Eimeria tenella or Eimeria adenoeides: induction of histological and morphometric changes increase resistance to Salmonella enteritidis infection in Leghorn chicks. In: Annual Meeting Abstracts - **Poultry Science Association**, 82, 2001.

TORTUERO, F. Influence of implantation of Lactobacillus acidophilus in chicks on the growth, feed conversion, malabsorption of fats syndrome and intestinal flora. *Poult. Sci.*, v.52, p.197-203, 1973.

USDA (United States Department Agriculture). FSIS (Food Safety and Inspection Service); 1998; Washington, DC, USA. ZEIDLER G. Who's afraid of the Salmonella wolf? **World Poultry** 1996.

VARGAS Jr JG, Toledo RS, Albino LFT, Rostagno HS, Rocha DP. Uso de probióticos e prebiótico em rações de frangos de corte. In: Conferência Apinco de Ciência e Tecnologia Avícolas 2000, Campinas. Suplemento 2. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**. Campinas: Apinco, 2000.

VERDI, S.R.; TORRES, V.S.; BARBOSA, M. Análise qualitativa e quantitativa de microrganismos patogênicos em farelo de soja. In: **CONFERÊNCIA APINCO**, Curitiba. Resumos... Campinas: FACTA, 1996. p.105.

VITAL BRASIL JM. Sorovares de Salmonella em animais e em matéria prima e perfil de resistência aos antimicrobianos. In: **Congresso Brasileiro de Microbiologia**. Salvador, Bahia: 1999.

WALTMAN, WD, HORNE AM, PIRKLE C, JOHNSON DC. Prevalence of Salmonella enteritidis in spent hens. **Avian Diseases** 1992.

WHO - World Health Organization. Use of quinolones in food animals and potential impact on human health. Report of a WHO Meeting; 1998; Geneva, Switzerland.

_____. WHO consultation on the monitoring of antimicrobial usage in food animals for the protection of human health; Oslo, Norway: 2001.

WOLKE, L. F. et al. Utilização do probiótico *Bacillus natto* como promotor de crescimento na alimentação de frangos de corte. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 33, 1996, Fortaleza. Anais... Fortaleza: SBZ, 1996. p.36-38.

SCHNEITZ, C.,1992. Automated droplet application of a competitive exclusion preparation. **Poultry Sci.** 71: 2125–2128.

ZANCAN F. T. et al.. Salmonella spp investigation in transport boxes of day-old birds. **Brazilian Journal of Microbiology** 2000.

ZEIDLER G. Who's afraid of the Salmonella wolf? **World Poultry** . Supl. p.4-9. 1996.

ZINPRIN, R.L.; Control of established *Salmonella typhimurium* intestinal colonization with in vivo-passaged anaerobes. **Avian Dis.**, v.37, p.183-8, 1993.