

Controle da infecção por *Salmonella Enteritidis* em frangos de corte com ácidos orgânicos e mananoligosacarídeo

Control of the infection caused by *Salmonella Enteritidis* with organic acids and mannanoligosaccharide in broiler

Joana Darc Lopes Bassan^I Maristela Lovato Flôres^{II} Taiane Antoniazzi^{II}
Eloisa Bianchi^{III} Javier Kuttel^{III} Michele Martins Trindade^{II}

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a ação de dois ácidos orgânicos (ácido fórmico e ácido propiônico) e de um mananoligosacarídeo (MOS) adicionados à dieta no controle da infecção intestinal por *Salmonella Enteritidis* (SE) em frangos de corte. Neste estudo de 39 dias, foram utilizadas 150 aves, de um dia de idade, da linhagem Cobb, lote misto, livre de SE, divididas em seis tratamentos (T) com 25 animais cada, em que: T1 (ausência de infecção), T2 (ácidos orgânicos e ausência de infecção), T3 (ácidos orgânicos + MOS e ausência de infecção), T4 (ácidos orgânicos e infecção com SE), T5 (ácidos orgânicos + MOS e infecção com SE) e T6 (infecção com SE). No 4º dia após o alojamento, a cama foi instilada com SE e a cada sete dias cinco aves por grupo foram submetidas à eutanásia por deslocamento cervical e necropsiadas. Depois foram realizados exames bacteriológicos para SE nesses animais, utilizando fezes coletadas sobre a cama de maravalha dos grupos e das tonsilas cecais dos animais necropsiados. No 18º dia, somente 60% das aves estavam infectadas nos tratamentos T4 e T5; no 25º dia, 40% das aves no T4 e 20% no T5 estavam infectadas; no 32º dia 100% das amostras testadas foram negativas em ambos os tratamentos (T4 e T5). Constatou-se que o T6 foi 100% positivo até o 32º dia e no 39º dia reduziu em 20% o número de animais infectados. Dentro dos parâmetros de avaliação deste experimento, os ácidos orgânicos e o mananoligosacarídeo adicionados à dieta contribuíram para o controle da infecção por SE.

Palavras-chave: *Salmonella Enteritidis*, frango de corte, ácidos orgânicos, mananoligosacarídeo.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effect of two organic acids (formic acid and propionic acid) and of one

mannanoligosaccharide added to the diet to control the intestinal infection caused by *Salmonella Enteritidis* (SE) in broilers. In this study of 39 days 150 birds were used, with one day of age, of the Cobb lineage, both sexes and free of SE. They were divided in 6 different treatments (T) with 25 birds each, where: T1 (no infection), T2 (organic acids + no infection), T3 (organic acids + mannanoligosaccharide and no infection), T4 (organic acids and infection with SE) T5 (organic acids + mannanoligosaccharide + and infection with SE) T6 (infection with SE). After housing, the chicken litter was instilled on the 4th day with SE and every seven days, five birds from each group were euthanized through cervical dislocation. The necropsy was performed and also the bacteriological exams to detect SE, using the feces collected over the chicken litter of the groups, bacteriological analysis of the cecal tonsils was done as well. On the 18th day only 60% of birds were infected in treatments T4 and T5; on the 25th day, 40% of birds in T4 and 20% in the T5 were infected; on the 32nd day, 100% of tested samples were negative in both treatments. The T6 group was 100% positive until the 32nd day, but on the 39th day, it got reduced in 20% of the number of infected animals. In the experimental conditions of this study, the organic acids and the mannanoligosaccharide added to the diet contributed to control the infection caused by SE.

Key words: *Salmonella Enteritidis*, broiler, organic acids, mannanoligosaccharide.

INTRODUÇÃO

A *Salmonella Enteritidis* (SE) é o patógeno entérico, pertencente à família Enterobacteriaceae, de origem alimentar, mais freqüentemente descrito na

^IPrograma de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Rua Francisco Crossetti, 355/202, 97050-210, Santa Maria, RS Brasil. E-mail: joanabassan@yahoo.com.br. Autor para correspondência.

^{II}Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP), Laboratório Central de Diagnóstico de Patologias Aviárias, UFSM, Santa Maria, RS, Brasil.

^{III}Empresa Vetanco do Brasil, Chapecó, SC, Brasil.

literatura nas ocorrências de toxinfecções em seres humanos. A importância deste microrganismo decorre de sua prevalência significativa com distribuição mundial nos lotes de frango de corte e suas implicações na saúde pública (GAST, 2003).

Nas aves, as salmonelas podem ser classificadas em quatro grupos de acordo com suas manifestações clínicas, facilitando com este agrupamento o entendimento epidemiológico e com isso o auxílio na escolha da melhor estratégia de controle. A SE se enquadra no grupo III, juntamente com a *S. Typhimurium*, sendo estes sorotipos os líderes de causas de toxinfecções alimentares no homem, podendo ocasionalmente ser consideradas patogênicas para aves, principalmente jovens (BACK et al., 2006).

Apesar de toda a monitoria industrial com o propósito da segurança alimentar, ainda assim essas infecções têm sido frequentes, sendo que as aves são uma significativa fonte de contaminação de salmonelas para o homem. Em razão de o Brasil ser o maior exportador de carne de aves e da grande exigência dos países importadores, se reforça a necessidade de maior controle (BACK et al., 2006).

STERZO et al, (2007) relata que o uso do produto comercial *BioMin® Poultry Star*, que é composto por um probiótico composto por flora normal multicepas, quando oferecido na água de bebida por 10 dias foi capaz de controlar a colonização intestinal por *Salmonella Enteritidis*.

Para auxiliar na prevenção e minimizar as infecções por bactérias patogênicas, são adicionados ácidos orgânicos (AO) à dieta, pois estes alteram o pH, passando a ter uma ação antibacteriana, particularmente contra bactérias Gram negativas (OSTERMANN et al., 2005). Os ácidos orgânicos, se usados corretamente junto com medidas nutricionais, de manejo e biossegurança, podem ser uma ferramenta poderosa para manter a saúde do trato intestinal das aves, melhorando o rendimento zootécnico sem risco de resíduos, como os dos antibióticos, na carne e nos ovos (PARTANEN & MROZ, 1999).

ROPPA (2006) relata que o MOS atua por bloqueio dos sítios de adesão de bactérias resultando em uma melhora na imunidade, por permitir que os patógenos sejam apresentados às células imunes como antígenos atenuados, sendo uma substituição à utilização do MOS fosforilado aos antibióticos, o que tem sido recomendado em muitos países, principalmente por empresas exportadoras de carne de frangos. Além disso, o mesmo autor relata que a tendência internacional de substituição de antibióticos

promotores de crescimento por aditivos naturais parece irreversível na produção avícola.

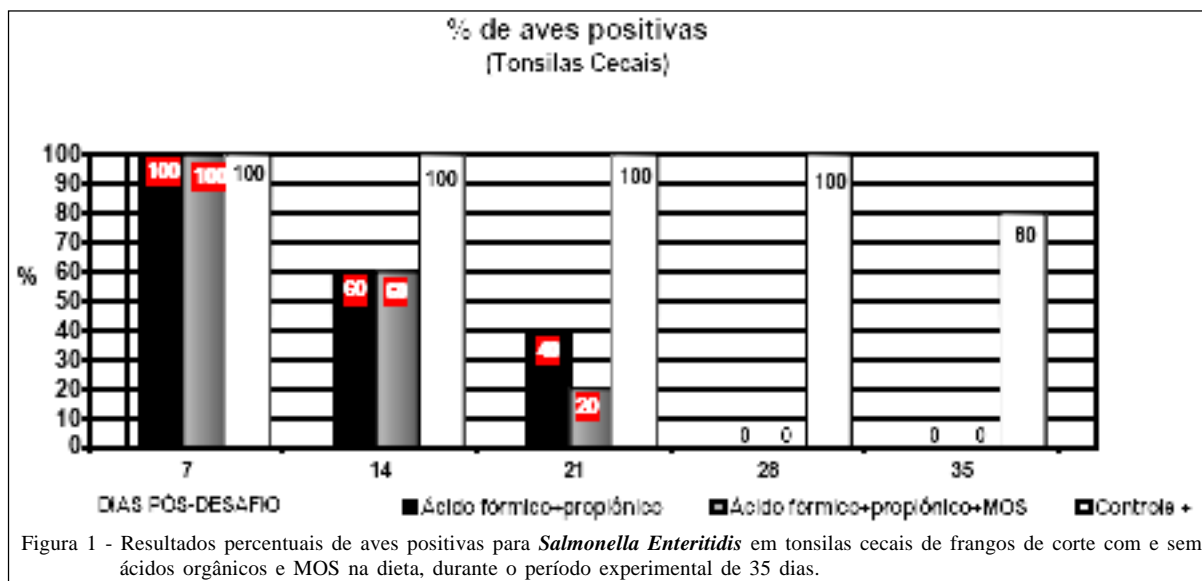
O objetivo deste trabalho foi avaliar a ação de dois ácidos orgânicos (ácido fórmico e ácido propiônico) e de um mananoligossacarídeo (MOS) adicionados à dieta no controle da infecção intestinal por *Salmonella Enteritidis* (SE) em frangos de corte.

MATERIAL E MÉTODOS

As aves foram alojadas por 39 dias, no isolamento do Laboratório Central de Diagnóstico de Patologias Aviárias (LCDPA), da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), e as análises laboratoriais foram realizadas no LCDPA. Foram utilizadas 150 aves de corte de um dia de idade, da linhagem Cobb, mista, com peso médio inicial de 43 gramas, livres de *Salmonella* sp., adquiridas do Laboratório de Avicultura (LAVIC) da UFSM, com tratamentos alocados em seis grupos (T1 a T6), com 25 unidades cada (Figura 1), alojados em box 1,5m² x 1,5m² sobre cama de maravalha esterilizada em autoclave. Foi cultivada uma amostra de SE, cedida pelo Laboratório de Enterobactérias do Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ-RJ), em meio de água peptonada (AP) a 37°C, em seguida ela foi transferida para o meio de ágar nutriente (AN). Após 24h a 37°C, a amostra apresentou concentração de 3x10⁸UFC mL⁻¹, padronizada a partir da escala 3 de Mac Farland.

As aves foram alojadas com um dia de idade, monitoradas para *Salmonella* sp. por meio da avaliação bacteriológica do pool das fezes dos tratamentos. A dieta e a água também foram analisadas para *Salmonella* sp. No quarto dia, a SE foi instilada e misturada na cama de maravalha, de forma que todas as porções contivessem a bactéria. A partir do 11º dia, a cada sete dias, num período de 39 dias, cinco aves de cada tratamento foram submetidas à eutanásia por deslocamento cervical, necropsiadas e foram realizados exames bacteriológicos. Foram coletadas para os exames amostras de fezes depositadas sobre a cama de todos os tratamentos e também das tonsilas cecais de cada ave.

Cada amostra analisada de 1g, foi macerada em cadinho estéril e distribuída em 9mL de caldo de pré-enriquecimento não-seletivo (peptona bacteriológica), incubada por 24h a 42°C. Em seguida, foi transferido 1mL para um tubo contendo 9mL de Tetracionato e 1mL para um tubo de 9mL de Rappaport-Vassiliadis incubados por 24h a 42°C. Depois de realizado o cultivo em placas de ágar verde brilhante (VB) e ágar XLT₄, foram incubados por 24h na estufa a 37°C, as colônias suspeitas de SE foram submetidas à prova sorológica com anti-soro somático polivalente e provas



bioquímicas: Ágar triplice de açúcar e ferro (TSI), Ágar lisina-ferro (LIA), meio SIM (*Sulphide Indol Motility*), Caldo uréia e Citrato de Simmons (OLIVEIRA, 2000).

A dieta formulada com milho e farelo de soja não continha nenhuma droga com finalidade bactericida ou fungicida, para evitar interferências no experimento. A quantidade de ácidos e MOS adicionados na ração foi de 4kg ton⁻¹. Nos tratamentos T1 e T6, as aves foram alimentadas com a dieta e ausência de ácidos e MOS. Foi adicionado na dieta o ácido propiônico + ácido fórmico para o T2 e T4 e o ácido propiônico + ácido fórmico + MOS foi adicionado na dieta dos T3 e T5.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da análise bacteriológica para SE nas fezes e nas tonsilas cecais estão apresentados na tabela 1 e na figura 1.

As análises confirmaram que a ração e a água de beber das aves eram negativas para *Salmonella* sp. no início do experimento. No 11º dia 100% das aves analisadas dos tratamentos T4 e T5 apresentaram resultados positivos para SE. No 18º dia, somente 60% das aves estavam infectadas nos tratamentos T4 e T5. Conforme LAMBERT & STRATFORD (1999), os ácidos orgânicos não-dissociados penetram na bactéria, na célula bacteriana, e são dissociados liberando o cátion (+) e o ânion (-). A forma catiônica reduz o pH interno e as bactérias consomem energia para manter o equilíbrio e morrem, exercendo função bactericida. O ânion do ácido se difunde livremente por meio da parede celular em sua forma não-dissociada e o acúmulo deste torna-se tóxico para a bactéria mediante mecanismos complexos que

implicam desequilíbrio aniônico, conduzindo a problemas osmóticos internos e interferindo na síntese de proteína. Os ácidos orgânicos na sua forma não-dissociada não poderão penetrar na parede celular da bactéria.

Concordando com SILVA et al. (2005), os quais concluíram que os tratamentos com ácidos orgânicos na concentração de 30kg ton⁻¹ mostraram-se eficazes na inibição do crescimento da *Salmonella* sp. em rações avícolas, em todas as repetições tanto após 24h, 48h e sete dias de contato do produto com a ração contaminada. No entanto, discordando dos autores ALBUQUERQUE et al. (1998), que em uma pesquisa concluíram que os ácidos orgânicos apresentaram efeito irregular em termos de atividade bactericida em dietas artificialmente contaminadas por *Salmonella* sp.

PELICANO et al (2007) observaram que o uso de promotores de crescimento aumentam a altura das vilosidades intestinais quando associados a probióticos e *Bacillus subtilis*, enquanto que em associação a MOS + AO ou apenas MOS e pool bacteriano quando usados individualmente não influenciaram.

No 25º dia, observou-se infecção somente em 40% das aves no T4 (em que os ácidos foram adicionados) e em 20% no T5 (em que o MOS foi adicionado), indicando um provável efeito protetor dos componentes adicionados nesses dois tratamentos. Quando o MOS é absorvido nas células M localizadas no interior das placas de Peyer, estimula a imunidade sistêmica e associada ao intestino, atuando como antígeno não-patogênico e exercendo um efeito

Tabela 1 - Resultados da análise para *Salmonella Enteritidis* em fezes e tonsilas cecais de frangos de corte com e sem adição de ácidos orgânicos e Mananligossacarídeo na ração em percentagem.

Trat	Dia 11		Dia 18		Dia 25		Dia 32		Dia 39	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
T1	000	100	000	100	000	100	000	100	000	100
T2	000	100	000	100	000	100	000	100	000	100
T3	000	100	000	100	000	100	000	100	000	100
T4	100	000	060	040	040	060	000	100	000	100
T5	100	000	060	040	020	080	000	100	000	100
T6	100	000	100	000	100	000	100	000	080	020
Fezes dos grupos	000	100	20	80	20	80	20	80	000	100

semelhante a um adjuvante. Além disso, os mananligossacarídeos fosforilados derivados da parede celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae* cepa 1026 (MOS fosforilado) inibem a colonização de patógenos por meio do bloqueio das fímbrias do tipo 1, que permitem que esses patógenos ataquem a superfície epitelial do intestino (ROPPA, 2006). Segundo JUNIOR & OLIVEIRA (2006), SE possui fímbrias tipos 1 e/ou 3, sendo em razão destas a capacidade e as bactérias patogênicas lesar em as células do hospedeiro, sendo bloqueadas pelo MOS.

No 32º dia, 100% das amostras testadas foram negativas em ambos os tratamentos (T4 e T5), justificando a importância da utilização dos ácidos para controlar a infecção por SE. Ressalta-se ainda que o T6, que obteve a adição do MOS na ração, o número das aves infectadas foi ainda menor no 25º dia do que no T4 (sem o MOS). HOOGE (2006) relata que a adição de altos níveis de MOS fosforilado (0,40%) na dieta de frangos jovens desafiados com *Salmonella* reduzem as contagens de bactérias no ceco.

LODDI et al. (2006) relatam que o MOS possui características específicas que permitem reduzir a colonização de patógenos no organismo. Os mananligossacarídeos da parede celular de leveduras podem atuar bloqueando os sítios de ligação de bactérias patogênicas na mucosa intestinal, diminuindo assim os danos à mucosa e resultando em uma melhor utilização dos ingredientes da dieta (ROPPA, 2006).

Constatou-se que o T6 foi 100% positivo até o 32º dia, e no 39º dia reduziu em 20%, provavelmente pela imunidade produzida pós-infecção. Os resultados encontrados são semelhantes aos de OSTERMANN (2005), o qual afirma que a mistura de ácidos orgânicos está entre aquelas que têm apresentado melhor consistência de resposta às infecções. O tratamento 6 demonstrou a persistência da infecção e serviu de comparação com os outros tratamentos (T4 e T5) com adição de ácidos orgânicos chegando à ausência da

recuperação da SE nos dias 32 e 39 nas aves dos tratamentos T4 e T5.

Os ácidos e o MOS utilizados estavam associados a um transportador mineral, com a função de garantir a dissociação no ceco. Segundo LAMBERT & STRATFORD (1999), a única forma de evitar que os ácidos orgânicos se dissociem no intestino da ave é protegendo-os dentro de uma matriz que tenha a capacidade de passar na porção anterior do aparelho digestivo sem desnaturar. Sem proteção contra o ambiente do trato gastrointestinal, os ácidos orgânicos se dissociam antes de chegar aos segmentos do intestino onde se encontra a bactéria que deverá ser atacada.

Nos tratamentos T2 (com os dois ácidos) e T3 (com os dois ácidos e o MOS), não houve qualquer sinal clínico que indicasse reação ao uso dos produtos, demonstrando sua inocuidade nas condições de avaliação clínica deste experimento.

Para MARTIN (1994), os prebióticos do tipo MOS são os de uso freqüente na indústria de rações, podendo ser utilizados como nutrientes pelas bactérias eutróficas e alguns autores atribuem a eles aumentos na retenção de minerais e uma melhor mineralização óssea quando suplementados a dietas de aves.

À medida que as bactérias probióticas e MOS são administrados, a condição de eubiose se torna permanente, impossibilitando o estabelecimento de *Escherichia coli*, *Clostridium* sp. e *Salmonella* sp., aumentando o número de bactérias benéficas produtoras de ácidos orgânicos como láctico, acético e butírico (ITO et al., 2004), o que se verificou a partir do 25º dia no tratamento T5.

As aves do tratamento T6, entre o 31º e 35º dias, apresentaram polidipsia, arripiamento de penas, prostração e asas caídas, concordando com os achados de JUNIOR & OLIVEIRA (2006). Os mesmos autores citam ainda que a presença de sinais clínicos é comum em aves jovens e ocasional em adultas. Morreram duas aves, com 31 e 35 dias, respectivamente, no T6, sendo

que na necropsia apresentaram lesões macroscópicas de esplenomegalia com petéquias, fígado friável, coração esbranquiçado e flácido e intestino hemorrágico. Exames bacteriológicos das aves dos tratamentos 4 e 5 foram positivos para SE, estas porém não apresentaram sinais clínicos. JUNIOR & OLIVEIRA (2006) relatam que os sorotipos pertencentes ao grupo das paratifóides colonizam o trato intestinal sem determinar qualquer sinal clínico, uma vez que não são específicos de aves, mas com adaptação suficiente para persistir no intestino destas, possibilitando a eventual contaminação das carcaças e dos ovos.

No entanto, RIBEIRO et al. (2007) citam que o uso de prebióticos e probióticos não influencia na performance das aves desafiadas com SE e nem na produção de anticorpos contra SE e que o uso de antimicrobianos favoreceu a colonização dos cecos com SE, enquanto os prebióticos e probióticos diminuíram a colonização.

CONCLUSÕES

Dentro dos parâmetros de avaliação deste experimento: a) Os ácidos orgânicos (fórmico e o propiônico) e o mananoligossacarídeo foram inócuos, ou seja, não causaram dano ao organismo das aves, considerando que não provocaram sinais clínicos nos grupos T2 e T3; b) Os resultados indicam que os dois ácidos orgânicos e o MOS contribuíram no controle da infecção por *Salmonella Enteritidis*, pois nos grupos em que os mesmos foram adicionados à dieta (T4 e T5) o número de aves infectadas reduziu a partir do 18º dia em relação ao 11º dia de experimento; c) A percentagem de aves infectadas no 18º dia foi menor no T5 (com ácidos orgânicos e MOS) que no T4.

COMITÊ DE ÉTICA E BEM-ESTAR ANIMAL DA UFSM

Registrado e aprovado sob o número 23081.000053/2006-77.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, R. et al. Tratamento de rações de aves com ácidos orgânicos: estudo da atividade bactericida e avaliação de técnicas de recuperação de *Salmonella* sp. **Brazilian Journal Veterinary Research and Animal Science**, v.35, n.6, p.279-282, 1998.
- BACK, A. et al. Monitoria e controle de salmonela: aspectos práticos. In: SIMPÓSIO BRASIL SUL DE AVICULTURA, 7., 2006, Chapecó, SC. **Anais...** Chapecó: Núcleo Oeste de Médicos Veterinários, 2006. p.95-103.
- GAST, R.K. *Salmonella* infections. In: SAIF, Y.M. et al. **Diseases of poultry**. 11.ed. Ames: Iowa State University, 2003. Cap.16, p.567-599.
- HOOGE, D.M. Meta-análise de experimentos com frangos de corte mantidos em boxes experimentais avaliando os efeitos do mananoligossacarídeo fosforilado. In: ESPECIAL AVE WORLD. **Promotores naturais de crescimento**. São Paulo: Animal World, 2006. p 9-10. (A Revista do Avicultor Moderno, ago/set, edição especial).
- ITO, N.M.K. et al. Saúde gastrointestinal, manejo e medidas para controlar as enfermidades gastrointestinais. In: PRODUÇÃO DE FRANGOS DE CORTE, 2004, Campinas. **Anais...** Campinas: FACTA, 2004. p.206-260.
- JUNIOR, A.B.; OLIVEIRA, G.H. Salmoneloses aviárias. In: ANDREATTI FILHO, R.L. **Saúde aviária e doenças**. São Paulo: Roca, 2006. Cap.9, p.96-111.
- LAMBERT, R.J.; STRATFORD, M. Weak acid preservatives: modeling microbial inhibition and response. **Journal of Applied Microbiology**, v.86, p.157-164, 1999.
- LODDI, M.M. et al. Efeito de mananoligossacarídeo fosforilado e ácidos orgânicos sobre o desempenho e morfologia intestinal de frangos de corte. In: ESPECIAL AVE WORLD. **Promotores naturais de crescimento**. São Paulo: Animal World, 2006. p 10-12. (A Revista do Avicultor Moderno, ago/set, edição especial).
- MARTIN, S.C. Potential for manipulating the gastrointestinal microflora: a review of recent progress. In: BIOTECHNOLOGY IN THE FEED INDUSTRY OF ANNUAL SYMPOSIUM, 10., 1994, London. **Proceedings...** London: Nottingham University, 1994. p.155-166.
- OLIVEIRA, S.J. **Guia bacteriológico prático: microbiologia veterinária**. Canoas, RS: ULBRA, 2000. 144p.
- OSTERMANN, P. et al. Metabolismo e bases conceituais para a ação benéfica de ácidos orgânicos para frangos de corte. **Ave World: A Revista do Agricultor Moderno**, ano 3, n.15, p.28-31, 2005.
- PARTANEN, K.H.; MROZ, Z. Organic acids for performance enhancement in pig diets. **Nutrition research review**, v.12, p.117-145, 1999.
- PELICANO, E.R.L. et al. Morphometry and ultra-structure of the intestinal mucosa of broilers fed different additives. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v.9, n.3, p.173-180, 2007.
- RIBEIRO, A.M.L. et al. Effects of prebiotics and probiotics on the colonization and immune response of broiler chickens challenged with *Salmonella Enteritidis*. **Brazilian Journal of Poultry Science**. v.9, n.3, p.193-200. 2007.
- ROPPA, F. Promotores naturais de crescimento. In: **Especial Ave World**. A Revista do Avicultor Moderno, ago/set 2006. São Paulo: Animal World, Edição especial, p.16.
- SILVA, L.C.C. et al. Avaliação de um ácido orgânico como agente inibidor do crescimento de *Salmonella* sp em rações de aves. **Brazilian Journal of Poultry Science**, Supl.7, p.219, 2005. (Prêmio Lamas)
- STERZO, E.V. et al. Organic acids and/or compound with defined microorganisms to control *Salmonella enterica* serovar Enteritidis experimental infection in chickens. **Brazilian Journal of Poultry Science** v.9, n.1, p.69-73, 2007.