

# USO DE PROBIÓTICO NA PREVENÇÃO DE SALMONELOSES EM FRANGOS DE CORTE

## Alternatives in the prevention of salmonellosis in poultry

Antônio Augusto Rossi<sup>1</sup>, Marília Terezinha Sangoi Padilha<sup>2</sup>, Ione Iolanda dos Santos<sup>3</sup>, José Carlos Fiad Padilha<sup>2</sup>

### RESUMO

Dentre as principais zoonoses de origem bacteriana, transmitidas pelas aves, pode-se assinalar as salmoneloses causadas por salmonelas patogênicas, que causam toxinfecções alimentares e podem estar presentes em produtos e subprodutos de origem animal contaminados. Com o objetivo de buscar subsídios no sentido de aperfeiçoar os sistemas de prevenção e controle alternativos para esta zoonose, foi realizado um experimento com 780 frangos de corte, da linhagem Ross, abatidos aos 31 dias de idade, submetidos a três tratamentos, com 4 repetições de 65 aves cada. Os animais do tratamento um receberam o probiótico Mucosal starter culture e foram inoculados com *Salmonella enteritidis* (SPRING et al., 2000), na dose de 10<sup>5</sup> unidades formadoras de colônias, por mililitro. No tratamento dois-controle positivo-os animais somente foram inoculados com *S. enteritidis*, na mesma dose que no tratamento um. Os animais do tratamento três-controle negativo-não receberam inoculação de salmonelas e nem probiótico. Avaliou-se o peso vivo, o consumo de ração e foram estimadas a conversão alimentar, o fator de produção e a percentagem de contaminação por salmonela. Não foram detectadas diferenças significativas, entre os tratamentos, para os parâmetros zootécnicos e microbiológicos analisados. Os animais que receberam o probiótico não se mostraram mais eficientes quando inoculados com salmonelas patogênicas, mas apresentaram um melhor desempenho em relação ao padrão da linhagem Ross utilizada.

**Termos para indexação:** Saúde pública, salmonela, zoonose, avicultura, aditivo.

### ABSTRACT

Salmonellosis are zoonoses caused by pathogenic salmonellas very common in products of infected birds. An experiment was made with the main aim to consider the need to search subsidy and perfectly for control and prevention systems in the growth of disease in public health. 780 chickens from Ross line are used, they were 31-day-old, and three treatments have been applied to 4 repetitions of 65 birds each. The animals of treatment one received the probiotic Mucosal starter culture and were inoculated with *Salmonella enteritidis* in 10<sup>5</sup> units group colony forms/ mliter. The treatment two was considered positive control and the animal were inoculated with *S. enteritidis* the same way that treatment one. The animals of treatment three did not receive probiotics and nor inoculated with salmonella. Some parameters were analyzed such as weight, food conversion, production factor and the percent of the contamination by salmonellas. There were not differences to the zootechnical and microbiological parameters for everyone treatments analysed. The animals that received probiotic did not show more efficient when inoculated with *S. enteritidis*, but they presented best performance that status from Ross line used.

**Index terms:** Public health, salmonella, zoonose, aviculture, additives.

(Recebido em 28 de abril de 2006 e aprovado em 7 de dezembro de 2006)

### INTRODUÇÃO

Entre as principais zoonoses de origem bacteriana, transmitidas pelas aves, pode-se assinalar as salmoneloses, causadas por salmonelas patogênicas que se situam entre os agentes patogênicos mais frequentes em surtos de toxinfecção alimentar, em humanos.

O risco de ocorrer infecções em humanos por salmonelas, através do consumo de alimentos de origem animal contaminados, tem levado à utilização de antimicrobianos (antibióticos e quimioterápicos), como preventivo às doenças avícolas. O problema se agrava quando uma ou mais cepas de um microorganismo apresentam resistência às drogas de eleição, para o seu

tratamento. O uso de antimicrobianos como preventivo pode estimular a seleção de bactérias resistentes nesse ecossistema. Patógenos humanos e genes de resistência podem passar entre humanos, animais e ecossistemas, por contato ou através do consumo de alimento ou água contaminada (KELLEY et al., 1998).

Para que o País tenha uma avicultura competitiva e crescente, tanto no mercado interno como no externo, é necessário que as empresas do setor Agro-Industrial tenham um adequado sistema de biossegurança, com regras bem definidas, em relação ao manejo e controle sanitário, minimizando o uso de antimicrobianos. Cepas de *S. enteritidis* de diferentes serovares isoladas de aves têm mostrado alta sensibilidade aos antibióticos de uso

<sup>1</sup>Médico Veterinário, Mestre – Alpharma do Brasil Ltda – Rua Paranaguá, 192, apartamento 52 – 86020-912 – Londrina, PR – Antonio.rossi@alpharma.com

<sup>2</sup>Zootecnistas, Doutores, Professores Adjunto – Departamento de Zootecnia e Desenvolvimento Rural/DZDR – Universidade Federal de Santa Catarina/UFSC – Rodovia Ademar Gonzaga, 1346 – Cx. P. 476 – 88040-900 – Florianópolis, SC – mariliap@mbox1.ufsc.br; jpadilha@mbox1.ufsc.br

<sup>3</sup>Engenheira Agrônoma, Mestre – Departamento de Zootecnia e Desenvolvimento Rural/DZDR – Universidade Federal de Santa Catarina/UFSC – Rodovia Ademar Gonzaga, 1346 – Cx. P. 476 – 88040-900 – Florianópolis, SC – ione@cca.ufsc.br

comum em avicultura, incluindo as quinolonas. Entretanto, tem sido observado o aumento da resistência antimicrobiana e multirresistência cruzada, em cepas de origem humana. O uso de determinados tipos de antibióticos em aves, particularmente as quinolonas, tem contribuído para a manutenção de lotes positivos para *S. enteritidis*. Os últimos levantamentos realizados no ano de 2001 continuam a mostrar que a *S. enteritidis*, em materiais avícolas, é o principal sorotipo responsável pelas infecções humanas (SILVA, 2004).

O uso de antibióticos na produção animal, inclusive como promotores de crescimento, tem sido apontado como uma das causas do aumento da resistência aos antimicrobianos de um modo geral. Além de alterar o equilíbrio e a simbiose entre a biota desejável e o animal, os antibióticos podem se acumular nos tecidos dos animais que, ao serem ingeridos e/ou seus produtos, promovem resistência da biota humana ao antibiótico utilizado e resistência cruzada às terapias antibióticas, em humanos e outros animais (KELLEY et al., 1998). Neste contexto, pesquisadores têm se empenhado na procura de alternativas. Uma delas é o uso de probióticos, não como substitutos dos antibióticos, mas como uma maneira eficaz e econômica para que os antibióticos sejam utilizados quando realmente necessários. Neste trabalho, procurou-se testar um probiótico, com o objetivo de auxiliar na procura de alternativa ao controle de salmonelas, na cadeia produtiva de frangos de corte.

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no município da Palhoça, SC, na granja experimental da CERENE, entre novembro de 2004 e janeiro de 2005. As análises de presença de salmonela foram realizadas no Laboratório de Patologia da Empresa avícola Macedo Koerich S.A. e as amostras dos animais positivos foram encaminhadas para a tipificação no Instituto Adolfo Lutz.

O galpão utilizado no experimento era sub-dividido em unidades de 5m<sup>2</sup> (box). Cada box estava equipado com um comedouro pendular manual, com capacidade para 20 kg de ração e um bebedouro tipo pendular.

As instalações foram lavadas com água clorada (5 ppm de cloro). Após o vazio sanitário de 60 dias, as instalações foram lavadas novamente com água clorada, na mesma concentração, e posteriormente desinfetados com amônia quaternária (1:1000).

Cada box recebeu uma camada de cepilho (maravilha de madeira), de aproximadamente 20 cm de altura e uma ficha de identificação, na qual foi registrado, além do número do box e do tratamento, os dados de mortalidade, de consumo de ração e de peso vivo das aves, durante o período experimental.

A temperatura e a umidade dentro do galpão foram controladas com o auxílio de um termo-higrômetro e foram utilizadas campânulas e cortinas plásticas, para manter a temperatura adequada às necessidades das aves, durante o período experimental.

Foram utilizados 780 pintos de corte de um dia, machos da linhagem Ross, alojados em boxes experimentais de 5m<sup>2</sup>, distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado, com três tratamentos de quatro repetições, com 65 aves cada. Por ser um experimento com inoculação e manipulação de bactérias patogênicas, onde são necessários cuidados especiais de segurança, não foi possível trabalhar com um número maior de animais. De cada repetição, foram analisadas amostras de dez aves para detectar a presença ou não de salmonela que, nos casos positivos, foi feita a tipificação.

Neste experimento foram utilizados somente pintos oriundos de matrizes vacinadas contra salmonelose. Os animais do tratamento um receberam o probiótico "Mucosal starter culture" e um desafio sanitário, sendo inoculados com *S. enteritidis*, na dose de 10<sup>5</sup> unidades formadoras de colônias, por mililitro (UFC/ml). O probiótico foi ministrado no incubatório no primeiro dia de vida, logo após o nascimento das aves, na dose de 0,2 ml/ave. O probiótico utilizado foi, segundo seu fabricante, um composto contendo biota basal, obtida do epitélio da mucosa cecal de frangos, livres de salmonelas e outros patógenos avícolas. Entretanto, não foi especificado que tipo de biota continha o produto. Os animais do tratamento dois-controle positivo-não receberam o probiótico e foram inoculados com *S. enteritidis*, da mesma forma que no tratamento um. Os animais do tratamento três-controle negativo-não receberam probiótico e não foram inoculados com *S. enteritidis*. O experimento teve a duração de 31 dias.

A ração inicial (1-21 dias) e a ração de crescimento (22-31 dias) foram formuladas de acordo com as recomendações nutricionais do manual da linhagem (AGROCERES ROSS, 2004), foram isoproteicas e isocalóricas com 22 e 18 % de proteína bruta e 2.900 e 3.100 kcal de energia metabolizável/kg, respectivamente. Na Tabela (1) estão especificadas a composição percentual e química das rações.

Foram analisados os parâmetros zootécnicos e os microbiológicos. Os parâmetros zootécnicos foram calculados e analisados aos 28 dias de idade e os microbiológicos aos 7 e 31 dias. Foram registrados o peso vivo (PV), o consumo de ração e calculado o ganho de peso (GP), a conversão alimentar (CA) e o Fator de Produção = (GPD x Viabilidade / CA x 100), onde o GPD é a relação do ganho de peso pela idade; a viabilidade é o n° de aves abatidas multiplicado por 100 e dividido pelo n° de aves alojadas e a CA é relação da ração consumida pelo ganho de peso das aves.

**TABELA 1** – Composição percentual e química das rações experimentais, na matéria natural, adaptados do Agrocere Ross (2004).

<b>Ingredientes ( %)</b>	<b>Inicial (0-21 dias)</b>	<b>Crescimento (22-31 dias)</b>
Milho	54,32	67,04
Farinha de carne	0,40	4,29
Farelo de soja	38,48	24,10
Farinha de ostras	1,55	0,70
Fosfato bicálcico	1,54	0,00
Óleo de soja	2,87	0,35
Óleo de frango	0,00	2,56
Sal	0,40	0,40
Cloreto Colina*	0,03	0,02
DL-Metionina	0,19	0,31
L-Lisina	0,00	0,12
Premix Vitamínico**	0,20	0,10
Premix Mineral***	0,10	0,10
Total	100,0	100,0
<b>Composição química</b>		
Energia Metabolizável (kcal EM/kg)	2950	3100
Proteína Bruta (%)	22,0	18,3
Metionina + Cistina (%)	0,90	0,82
Lisina (%)	1,30	1,06
Triptofano (%)	0,28	0,21
Treonina (%)	0,93	0,77
Cálcio (%)	1,00	0,90
Fósforo disponível (%)	0,47	0,40
Sódio (%)	0,20	0,20

\*Produto comercial com 70% de Cloreto de colina. \*\* Composição mínima em UI ou em mg do premix vitamínico por 100kg de ração: Vitamina A 1200000; Vitamina D3 400000; Vitamina E 10000; Vitamina K 2500, Tiamina 300, Riboflavina 1200; Piridoxina 500; Vitamina B12 0,2; Niacina 4500; Acido Pantotênico 2000; Acido fólico 200; Biotina 40; Colina 60000.\*\*\* Composição mínima em mg do premix mineral por 100kg de ração: Cobre 800; Ferro 6000; Iodo 50; Manganês 7000; Cobalto 25; Zinco 5000; Selênio15.

O Grau de infecção dos cecos foi calculado a partir do logaritmo de unidades formadoras de colônias (UFC x Volume resuspenso/Peso do órgão). O Fator de infectividade foi determinado através da leitura das placas, onde se calculou a relatividade do número de colônias, por amostra de 10 aves e o Fator de Proteção é o componente relativo ao número do fator de infectividade. O método utilizado foi o descrito por Mead et al. (1989). Utilizou-se placas de petri, com meio de cultura MacConkey (MERK) para o isolamento das cepas; meio BHI ou caldo

nutriente, no enriquecimento das culturas; água peptonada 0,10%, para o isolamento das cepas; PBS 0,1 M pH 7, tampão fosfato salino na diluição das amostras; meio XLD (Gram-negativo) específico para a identificação das salmonelas e álcool a 70%, na desinfecção do local de coleta.

A multiplicação, inoculação e contagem de salmonelas foi realizada pela incubação do cultivo de cepas de salmonela, a 37° C, por um período de 14 a 24 h. A padronização do inóculo usado foi feita a partir de 1 colônia

semeada em 60 ml de BHI, incubada à 37° C por 1 h e contadas, sucessivamente, até 30 h de incubação. Cada ave recebeu, através de cânula rígida, diretamente no ingluvío, 0,1 ml do inóculo contendo 10<sup>5</sup> bactérias. A determinação da presença de salmonela nos cecos foi realizada após sete dias da inoculação, onde os cecos foram retirados com assepsia e colocados em sacos plásticos estéreis, pesados e identificados. Os cecos de cada ave e os seus conteúdos, após pesados, foram diluídos com 9 ml de água peptonada estéril e homogêneo, para realizar a contagem de colônias. Cada placa com XLD foi semeada com 0,1 ml de conteúdo cecal e incubada a 37° C. O número de colônias foi determinado três vezes, uma a cada 24 h de incubação, até 72 h.

Os parâmetros zootécnicos foram avaliados com o auxílio do programa estatístico Minitab (versão 2000), usando-se o modelo linear de análise de variância. Para a avaliação da presença de *Salmonella* para a análise de infectividade ou não de salmonelose, utilizou-se o teste de Friedman (CAMPOS, 1976), que permite a análise não-paramétrica de dados.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados referentes ao peso vivo, consumo de ração, ganho de peso e conversão alimentar dos frangos de corte, aos 28 dias, de acordo com os tratamentos, encontram-se na tabela 2.

Não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os tratamentos para o peso vivo, ganho de peso, consumo de ração e conversão alimentar das aves que receberam ou não probióticos. As boas condições experimentais, (profilática e ambientais), deste trabalho dificultaram o aparecimento de diferenças entre os tratamentos, o que, provavelmente, seria diferente nas condições de campo e com maior número de aves.

Apesar de não se detectar diferenças significativas entre os tratamentos testados, se observou que, para todos os parâmetros zootécnicos analisados, estes foram

superiores aos valores do padrão da linhagem Ross, como pode se observar na tabela 2 (AGROCERES ROSS, 2004). Se fizermos uma média geral dos valores obtidos para os três tratamentos, visto que não foram detectadas diferenças significativas entre eles, e compararmos esta média com o padrão da linhagem, o peso vivo, o consumo de ração e o ganho de peso obtidos pelas aves foram entre 25 e 30% superiores aos padrões da linhagem e a conversão foi em torno de 6% maior.

Em relação à literatura, a maioria das publicações existentes, onde foi feito um desafio com salmonela patogênica, não apresenta resultados de desempenho zootécnico dos animais. E os que apresentam, não submetem os animais a um desafio sanitário. Esta dicotomia, entre os dados zootécnicos e sanitários, dificulta a comparação dos resultados obtidos, com os dados de outros autores. Os efeitos sinérgicos ou antagônicos que podem ocorrer, quando as aves são submetidas ao um desafio sanitário, ainda são desconhecidos. Torna-se indispensável analisar os efeitos e a eficiência das substâncias alternativas, neste caso o probiótico, nos índices zootécnicos dos animais que são submetidos a desafios provocados experimentalmente.

Na tabela 3 são apresentados os valores obtidos para o fator de produção, o grau de infectividade e o fator de proteção observados no experimento realizado. Os valores obtidos para o fator de produção, ficaram aproximadamente 50% acima dos patamares da produção avícola. Isso se deve à idade em que as aves foram pesadas para os parâmetros zootécnicos aos 28 dias, e a idade em que as aves foram sacrificadas para a pesquisa de salmonela, aos 31 dias, antes do normalmente usado na produção que é aos 42 dias (Tabela 3).

Não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os tratamentos avaliados aos 7 e 31 dias de idade, em relação ao grau de infectividade e ao fator de proteção avaliados aos 28 dias de idade (Tabela 3).

**TABELA 2** – Peso vivo (PV), consumo de ração (CR), ganho de peso (GP) e conversão alimentar (CA) de frangos de corte, da linhagem Ross, aos 28 dias de idade, inoculados ou não com salmonela e/ou com probiótico, e o padrão da linhagem utilizada.

Tratamentos	PV (kg)	CR (kg)	GP (kg)	CA	Viabilidade (%)
MSC*	1,928	2,637	1,875	1,406	96
Controle Positivo	1,886	2,618	1,841	1,422	97
Controle Negativo	1,889	2,536	1,844	1,375	98
Padrão Ross	1,353	1,954	1,311	1,490	-

\*MSC: mucosal start cultura.

**TABELA 3** – Fator de Produção de frangos de corte da linhagem Ross aos 28 dias de idade e fator de infectividade para *S. enteritidis* aos 7 e 31 dias de idade, em função dos tratamentos utilizados.

Tratamentos	Fator de Produção aos 28 dias	Fator de infectividade	
		aos 7 dias	aos 31 dias
Probiótico	446	6	6
Controle Positivo	430	6	4
Controle Negativo	445	4	4

No entanto, percebe-se uma redução natural de 33% na contaminação para o controle positivo, (inoculado com salmonela), entre os 7 e 31 dias de idade. Isso pode estar associado a uma defesa natural que as aves de algumas linhagens possuem frente a enteropatógenos, onde as salmonelas são eliminadas, naturalmente, sem ocorrer nova recontaminação pelo ambiente, ou então podemos ter falsos positivos, onde não é possível detectar a presença de salmonela. Os resultados obtidos divergem daqueles publicados por Spring et al. (2000) que ao utilizarem mananoligossacarídeo para a proteção do desafio de duas cepas de salmonelas, a *S. typhimurium* 29 E (Jones, 1983) e a *S. dublin* (Firon, 1987), observaram uma redução na contaminação por salmonelas e quando se adicionaram o probiótico Mucosal starter culture na dieta, este apresentou uma tendência na redução dos coliformes fecais. Pode-se acrescentar também os dados de Santin et al. (2001) que observaram diferenças significativas aos 21 e 42 dias de idade, no desempenho de frangos de corte, quando compararam dietas suplementadas com prebióticos e dietas não suplementadas, o que foi correlacionado com o aumento no tamanho de vilos da mucosa intestinal das aves, suplementadas aos 7 dias de idade. Spring et al. (2000) sugerem que os mananoligossacarídeos 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, conseqüentemente, o turnover dessas células, o que pode resultar em melhor utilização dos ingredientes da ração. A dose e/ou o tipo de probiótico usado não foi suficiente para inibir o desenvolvimento da salmonela inoculada nos frangos.

### CONCLUSÃO

O probiótico usado não teve ação destacada como controlador da biota/ou inibidor de microorganismos patogênicos, pois as aves não apresentaram um melhor desempenho quando comparado com as dos tratamentos controle. De um modo geral, independentemente dos tratamentos utilizados neste experimento, houve melhor desempenho zootécnico das aves, em relação ao padrão da linhagem utilizada.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGROCERES ROSS. **Melhoramento genético de aves:** manual de biosseguridade. Rio Claro, 2004.
- CAMPOS, H. de. **Estatística experimental não-paramétrica.** 2. ed. Piracicaba: ESALC, 1976.
- KELLEY, T. R.; PANCORBO, O. C.; MERKA, W. C.; BARNHART, H. N. Antibiotic resistance of bacterial litter isolates. **Poultry Science**, Amsterdam, v. 77, n. 2, p. 243-247, 1998.
- MEAD, G. C.; BARROW, P. A.; HINTON, M. H.; HUMBERT, F.; IMPEY, C. S.; LAHELLEC, C.; MULDER, R. W. A. W.; STARVRIC, S.; STERN, N. J. Recommended assay for treatment of chicks to prevent *Salmonella* colonization by competitive exclusion. **Journal of Food Protection**, Oxford, v. 52, n. 7, p. 500-502, 1989.
- SANTIN, E.; MAIORKA, A.; MACARI, M.; GRECCO, M.; SANCHEZ, J. C.; OKADA, T. M.; MYASAKA, A. M. Performance and intestinal mucosa development of broiler chickens fed diets containing *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. **Journal of Applied Poultry Research**, London, v. 10, n. 3, p. 236-244, 2001.
- SILVA, E. N. Efeito das doenças infecciosas na qualidade de carne de frangos. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2004, Santos. **Anais...** Campinas: FACTA, 2004.
- SPRING, P.; WENK, C.; DAWSON, K. A.; NEOMAN, K. E. The effects of dietary mannanoligosaccharides on cecal parameters and the concentrations of enteric bacteria in the ceca of *Salmonella*-challenged broiler chicks. **Poultry Science**, London, v. 79, n. 2, p. 205-211, 2000.