BRUNO ROGÉRIO RUI

Uso do ácido fórmico no controle de *Salmonella* Enteritidis em frangos de corte experimentalmente infectados

São Paulo
2014

BRUNO ROGÉRIO RUI

Uso do ácido fórmico no controle de *Salmonella* Enteritidis em frangos de corte experimentalmente infectados

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Patologia

Área de Concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientadora:

Profa. Dra. Tânia de Freitas Raso

São Paulo

2014

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.2981
FMVZ

Rui, Bruno Rogério
Uso do ácido fórmico no controle de *Salmonella* Enteritidis em frangos de corte
experimentalmente infectados / Bruno Rogério Rui. -- 2014.
70 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2014.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Tania de Freritas Raso.

1. *Salmonella* Enteritidis. 2. Ácidos orgânicos. 3. Ácido fórmico. 4. Transmissão horizontal.
5. Frango de corte. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Uso do ácido fórmico no controle de *Salmonella enteritidis* em frangos de corte experimentalmente infectados", protocolado sob o nº 2511/2011, utilizando 72 (setenta e dois) frangos de corte, sob a responsabilidade do(a) Profa. Dra. Tânia de Freitas Raso, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 15/2/2012.

We certify that the Research "Use of formic acid in the control of *Salmonella enteritidis* in broilers infected experimentally", protocol number 2511/2011, utilizing 72 (seventy two) broilers, under the responsibility Profa. Dra. Tânia de Freitas Raso, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 2/15/2012.

São Paulo, 28 de maio de 2014.

Alice Maria Melville Paiva Della Libera
Vice-Presidente no exercício

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87,
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP - Brasil
05508-270

Fone: + 55 11 3091-7671/7676/0004/8459
Fax: + 55 11 3032-2224
E-mail: livvz@usp.br
<http://www.fmvz.usp.br>

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: RUI, Bruno Rogério

Título: Uso do ácido fórmico no controle de *Salmonella* Enteritidis em frangos de corte experimentalmente infectados

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus pais, pelo apoio incondicional em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Chega ao fim mais uma etapa da minha vida. Realmente não foi fácil, no entanto acredito que estou mais maduro e sereno para os novos desafios que virão.

Agradeço primeiramente aos meus pais, que não mediram esforços para que eu chegasse até aqui. Pai, você para mim é sinônimo de honestidade e trabalho, um homem que vive literalmente em função da família, com uma dedicação fora do comum comigo e com a mamãe! Mãe, você é meu exemplo de amor e compreensão, sempre me apoiando e rezando por mim. Sei que a cada passo que eu der você estará sempre do meu lado me dando sustentação. Vó, mesmo você não estando aqui, sei que você está me vendo de onde estiver, e não tenho dúvidas que sempre estará comigo.

Obrigado a minha orientadora, Professora Tânia, pela oportunidade e por ter aberto as portas da FMVZ para mim. Serei eternamente grato por seu voto de confiança comigo.

Agradeço ao meu co-orientador Professor Antônio José Piantino Ferreira, pela oportunidade e pela confiança depositada em mim para este projeto.

Sou grato a Professora Claudete Serrano Astolfi Ferreira pela grande ajuda com o Elisa e os grandes ensinamentos em imunologia.

Agradeço aos pós-graduandos e técnicos do laboratório de Ornitopatologia I que trabalharam arduamente para realização deste experimento.

Agradeço aos amigos do laboratório de Ornitopatologia II, a Vivi pelo apoio e principalmente pela grande amizade e ao Jean pela amizade.

Agradeço ao Daniel, pela amizade que ultrapassou essa barreira e como você próprio diz, tornou-se irmandade. Obrigado por ter aberto a sua casa para mim, e principalmente me fazendo sentir parte da sua família. Obrigado pela PARCERIA, risadas, viagens.

Obrigado ao Danilo e a Jussara que me acolheram em seu lar e me fizeram sentir parte dele, serei eternamente grato pelo carinho de vocês comigo. Agradeço a Dami e ao Vinicius pela amizade.

Obrigado Tis por ser minha irmã, por estar sempre comigo e também por me incluir em sua família. Agradeço ao Mide pela grande amizade e companheirismo.

Obrigado a Cami pela parceria e amizade. Vocês são da ELITE e isso definitivamente jamais mudará.

Obrigado ao professor Marcílio pela grande ajuda com a análise estatística, e principalmente pela amizade. Também agradeço à Professora Camila pela gentileza e carinho comigo. Agradeço aos amigos do laboratório de Inseminação Artificial: Cris, Fernanda, Liege, Gisele, Cláudia e Ricardo.

Agradeço aos meus grandes amigos Diego e Givago, Renato e Cicinho.

Meu obrigado as famílias Lisboa, Bastos e Assada que sempre me receberam com muito carinho.

Agradeço a todos os funcionários do Departamento de Patologia principalmente à Cris, Adriana e Milena e a todos os professores do VPT da FMVZ/USP.

A todos os funcionários da biblioteca da FMVZ e à seção de pós-graduação.

À Universidade de São Paulo e a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia que possibilitou este mestrado.

Agradeço a CAPES pelo apoio financeiro.

RESUMO

RUI, B. R. **Uso do ácido fórmico no controle de *Salmonella* Enteritidis em frangos de corte experimentalmente infectados** [Use of formic acid in the control of *Salmonella* Enteritidis in broilers infected experimentally]. 2014. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

A salmonelose é uma das mais importantes causas de toxinfecção alimentar em humanos, provocando sérios problemas à saúde pública, além de ser uma das doenças de maior impacto na produção avícola. Em vista disso, este estudo objetivou avaliar o uso de ácido fórmico no controle de *Salmonella* Enteritidis (SE). Assim, foram utilizados 360 pintinhos de um dia de idade: 50% das aves foram inoculadas via ingluvío com 3×10^7 UFC/0,1mL de SE e 50% não (aves contactantes). As aves foram divididas em cinco (05) grupos com seis (06) repetições cada: T1) controle sem o aditivo; T2) ácido fórmico 0,3% na ração; T3) ácido fórmico 0,2% na ração; T4) ácido fórmico diluído em água de beber até que a mesma atingisse um pH 4; T5) ácido fórmico 0,2% protegido na ração. As aves receberam ácido do 1º ao 7º dia e do 35º ao 42º dia. A cada sete dias, amostras de fezes foram colhidas da cama em todos os grupos para se avaliar o isolamento de SE. Aos 42 dias foram colhidas à necropsia amostras de ingluvío, fígado/baço e ceco para o isolamento de SE e sangue para a avaliação sorológica. Nas aves do T1, do T2 e do T5 SE foi isolada do ingluvío, fígado/baço e ceco das aves inoculadas e das contactantes. Houve isolamento de SE no T3 apenas em ingluvío e ceco das aves inoculadas e, no T4, apenas do ceco das contactantes. Em todos os grupos SE foi reisolada do material da cama, embora não em todas as semanas. A avaliação sorológica realizada com teste comercial de ELISA revelou aves sororeagentes no T1 (inoculadas e contactantes), no T2 (inoculadas) e no T3 (contactantes). Nenhuma ave foi sororeagente no T4 e T5. A transmissão horizontal foi evidenciada em todos os grupos estudados. Os dados foram comprovados por ANOVA e teste LCD. Nos grupos T3 e T4 o ácido fórmico foi eficaz em reduzir a presença e a transmissão horizontal de SE.

Palavras-chave: *Salmonella* Enteritidis, Ácidos Orgânicos, Ácido Fórmico, Transmissão Horizontal, Frango de Corte.

ABSTRACT

RUI, B. R. **Use of formic acid in the control of *Salmonella* Enteritidis in broilers infected experimentally** [Uso do ácido fórmico no controle de *Salmonella* Enteritidis em frangos de corte experimentalmente infectados]. 2014. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Salmonellosis is one of the most common and widely distributed foodborne diseases, with tens of millions of human cases occurring worldwide every year. Furthermore, this disease is responsible to significant economic losses to the poultry industry. Endemic infection of broiler chickens with *Salmonella* Enteritidis (SE) and consequential human illness has been well documented. For these reasons the aim of this study was to evaluate the use of formic acid to control SE in broilers experimentally infected. Thus 360 day-old chicks were used in the experiment: 50% (180) of birds were inoculated in crop with 3×10^7 CFU/0.1 mL of SE and 50% (180) were used as controls and kept in contact with the infected chicks. For the formic acid treatment the birds were divided into five (05) groups with six (06) replicates as follows: T1) control without additive; T2) 0.3% formic acid in the diet ; T3) 0.2% formic acid in the diet ; T4) formic acid diluted in drinking until it reached pH 4 water; T5) 0.2% formic acid microencapsulated in the food. The birds received the formic acid from the 1st to 7th day and from the 35th to 42nd days. Every seven days faeces samples were collected from the chick's litter and SE isolation was attempted. In the 42 day blood samples were collected for serological evaluation by means of Elisa. Additionally samples from the crop, liver/spleen and cecum were collected at necropsy and submitted to culture for SE detection. SE was isolated from crop, liver/spleen and cecum of the inoculated and contacts birds belonging to the T1, T2 and T5. Regarding the T3, SE was isolated in the crop and cecum of the inoculated birds and in the T4 only in the contacts chick's cecum. In all groups SE was isolated from the litter, although not in every week. Serological evaluation revealed serum positive birds in T1 (inoculated and contacts), T2 (inoculated) and T3 (contacts). Antibodies anti-SE were not detected in the serum from the birds of T4 and T5. Horizontal transmission was observed in all groups. The data were confirmed by ANOVA and LCD test. In groups T3 and T4 formic acid was effective in reducing the presence and horizontal transmission of SE.

Key words: *Salmonella* Enteritidis, Organic Acids, Formic Acid, Horizontal Transmission, Broiler.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Mecanismo de ação dos ácidos orgânicos na célula microbiana.	31
Gráfico 1 – Percentual de reisolamento de SE nos órgãos de aves inoculadas contactantes do T1 aos 42 dias pós-infecção experimental	43
Gráfico 2 – Percentual de reisolamento de SE nos órgãos de aves inoculadas e contactantes do T2 aos 42 dias pós-infecção experimental	43
Gráfico 3 – Percentual de reisolamento de SE nos órgãos de aves inoculadas e contactantes do T3 aos 42 dias pós-infecção experimental.	44
Gráfico 4 – Percentual de reisolamento de SE nos órgãos de aves inoculadas e contactantes do T4 aos 42 dias pós-infecção experimental	44
Gráfico 5 – Percentual de reisolamento de SE nos órgãos de aves inoculadas e contactantes do T5 aos 42 dias pós-infecção experimental	45
Gráfico 6 – Percentual de aves inoculadas e contactantes sororeagentes para SE no ELISA nos grupos de T1 a T5.....	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Médias e desvio padrão do reisolamento de SE em órgãos de aves desafiadas com SE e tratadas com ácido fórmico.....	41
Tabela 2 – Médias e desvio padrão do isolamento de SE em órgãos de aves contactantes às desafiadas com SE e que foram tratadas com ácido fórmico	42
Tabela 3 – Frequência de isolamento de SE nas fezes coídas das camas nos dias 7, 14, 21, 28, 35 e 42, de acordo com o grupo de tratamento	42
Tabela 4 – Médias e desvio padrão de aves inoculadas com SE e contactantes tratadas com ácido fórmico que foram sororeagentes no ELISA para <i>Salmonella</i> Enteritidis	45

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µl	Microlitro
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APPCC	Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle
ATP	Adenosina Trifosfato
AVB	Ágar Verde Brilhante
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CVE	Centro de Vigilância Epidemiológica
CEPA	Centro Experimental de Patologia Aviária
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DDTHA	Divisão de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay</i>
H ⁺	Protón de Hidrogênio
IgG	Imunoglobulina G
Kg	Quilograma
LCFA	<i>Long-chain fatty acids</i>
MC	<i>Mac-Conkey</i>
MCFA	<i>Medium-chain fatty acids</i>
ml	Mililitro
pH	Potencial Hidrogeniônico
pKa	Constante de Acidez
PIB	Produto Interno Bruto
PNSA	Programa Nacional de Sanidade Avícola
R-COOH	Radical Carboxila
Rpm	Rotações por minuto
SAR	Soroaglutinação Rápida
SE	<i>Salmonella</i> Enteritidis
SCFA	<i>Short-chain fatty acid</i>
SPI-1	<i>Salmonella Pathogenicity Island</i>
SS	<i>Salmonella-Shigella</i>
ST	<i>Salmonella</i> Typhimurium
ufc	Unidade Formadora de Colônia

Ton	Tonelada
TSI	Triplo Açucar Ferro
UBABEF	Associação Brasileira dos Produtores e Exportadores de Frangos
XLD	Xilose Lisina Desoxicolato
XLT4	Xylose Lysine Tergitol-4

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 <i>Salmonella</i> spp.....	18
2.1.1 Etiopatogenia	18
2.1.2 Epidemiologia.....	21
2.1.2.1 <i>Salmonella</i> Enteritidis em aves e produtos avícolas.....	21
2.1.2.2 <i>Salmonella</i> Enteritidis e saúde pública	22
2.1.3 Diagnóstico	24
2.1.4 Prevenção e controle	27
2.2 Ácidos orgânicos	29
2.2.1 Definição e características	29
2.2.2 Mecanismo de ação	30
2.2.3 Ação dos ácidos orgânicos sobre a <i>Salmonella</i> spp.....	32
2.2.4 Utilização dos ácidos orgânicos na produção animal	33
2.2.5 Utilização dos ácidos orgânicos na produção animal brasileira	34
3 OBJETIVOS.....	37
3.1 Objetivo geral	37
3.2 Objetivos específicos	37
4 MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1 Aves.....	38
4.2 <i>Salmonella</i> spp.....	38
4.3 Delineamento experimental	38
4.4 Coleta de material biológico e isolamento de SE	39
4.5 Ensaio imunoenzimático	40
4.6 Análise estatística	40
5 RESULTADOS.....	41
5.1 Reisolamento de <i>Salmonella</i> Enteritidis.....	41
5.2 Elisa.....	45
6 DISCUSSÃO.....	46
7 CONCLUSÃO	55
<u>REFERÊNCIAS</u>	56

1 INTRODUÇÃO

A avicultura tem papel de destaque no agronegócio brasileiro. A cadeia produtiva avícola representa 1,5% do Produto Interno Bruto (PIB) nacional gerando 4,5 milhões de empregos diretos e indiretos, sendo a principal atividade econômica de muitas cidades no país. A produção de carne de frango em 2013 foi de 12.308 milhões de toneladas, posicionando o Brasil como o terceiro maior produtor mundial. Desde 2006 a carne de frango é o produto de origem animal com maior volume de exportações no país, alcançando 3.891 milhões de toneladas em 2012, mantendo-se como o maior exportador mundial de carne de frango (UBABEF, 2014).

Considerando a importância desta produção para os mercados internos e externos, o Departamento de Defesa Animal do Ministério da Agricultura, Abastecimento e Produção Animal (MAPA) em 1994 consolidou o Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA) (Portaria Ministerial Nº 193/1994). Este programa tem como objetivo certificar a saúde dos plantéis avícolas pela realização de ações de vigilância, profilaxia, controle e erradicação de doenças nas aves. Entre as principais doenças inseridas no PNSA estão as salmoneloses, que se destacam pelos prejuízos que causam à indústria avícola e pelo impacto à saúde pública (BRASIL, 2003). As infecções causadas por *Salmonella* spp. têm grande relevância junto às autoridades sanitárias de diversos países em decorrência do potencial zoonótico e das restrições no comércio internacional de alimentos.

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) aponta que no Brasil, entre os anos de 1999 a 2004, a *Salmonella* spp. foi o microrganismo de maior prevalência entre os agentes etiológicos de zoonoses transmitidas por alimentos. Dentre os sorovares de *Salmonella* encontrados, *S. Enteritidis* (SE) foi o predominante (DDTHA/CVE 2004). Para combater afecções diversas, particularmente aquelas de maior impacto econômico à produção avícola, preconiza-se o uso de antibióticos. Assim, tradicionalmente, os antibióticos estão inseridos nas formulações de ração para frangos de corte, pois também são utilizados como promotores de crescimento. Contudo, seu uso

indiscriminado pode resultar em resistência microbiana e, ainda, em resíduos em carnes e ovos. Em 2006, com o intuito de inibir a utilização indiscriminada dos antimicrobianos, a União Europeia proibiu seu uso em inclusões baixas e constantes em rações para animais destinados ao consumo humano, incluindo produtos de origem avícola (GRAVE et al., 2007). Posteriormente, os Estados Unidos limitaram o emprego dos antibióticos em animais de produção (MANI-LOPEZ et al., 2012).

No Brasil, o uso de alguns quimioterápicos (tetraciclina, penicilina, cloranfenicol, sulfonamidas, furazolidona, nitrofurazona e avoparcina) foram banidos em 1998 como aditivos alimentares em rações animais (BRASIL, 1998), sendo permitido o uso de 16 antimicrobianos na alimentação animal. Contudo, deve-se respeitar o período de carência de cada antibiótico, para que o produto de origem animal, quando consumido pela população, esteja livre de resíduos destes fármacos (BRASIL, 2007).

Consequentemente, pesquisas foram desenvolvidas com a finalidade de diminuir o uso de antibióticos na produção animal (VANDERPLAS et al., 2010; MANI-LÓPEZ et al., 2012). Entre as novas alternativas de controle das infecções por *Salmonella* Enteritidis os ácidos orgânicos veem se destacando, pois são de baixo custo, não produzem resíduos na carne e não requerem período de carência (DIBNER; RICHARDS, 2005). Além disso, na prática, apresentam resultados semelhantes aos obtidos com os antibióticos comumente empregados. Tais características são de suma importância, já que a demanda por produtos livres de resíduos é crescente e o consumidor busca alimentos cada vez mais naturais (MANI-LÓPEZ et al., 2012).

Em face da importância crescente da SE na avicultura nacional, o presente trabalho objetivou avaliar o uso do ácido fórmico no controle da infecção e da transmissão horizontal por *Salmonella* Enteritidis em pintinhos experimentalmente infectados.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Salmonella* spp.

Salmonella spp. é um dos principais patógenos de frangos e também uma das principais causas de toxinfecção em humanos (ANDREATTI, 2008; GAST, 2008).

2.1.1 Etiopatogenia

As primeiras bactérias do gênero *Salmonella* foram identificadas no final do século XIX, isoladas de baço e linfonodos de humanos (BARROW 1993). Gaffky em 1884 descreveu sua morfologia e em 1900, Lignières propôs o nome do gênero, *Salmonella*, em homenagem ao médico veterinário Daniel E. Salmon (CORREA & CORREA, 1992).

As bactérias do gênero *Salmonella* pertencem à família Enterobacteriaceae, englobando duas espécies: *S. bongori* e *S. enterica*. São bacilos curtos de 0,7 a 1,5 x 2,5 µm, Gram-negativos, anaeróbios facultativos e não esporulados. Possuem flagelos, o que lhes confere mobilidade, com a exceção dos sorovares Gallinarum e Pullorum. Sua temperatura de incubação varia entre 5° e 45°C, embora a temperatura ideal seja 37°C. O pH ideal para a incubação é 7,0; contudo, pode variar de 4,0 a 9,0 (HOLT et al., 1994; GAST; HOLT, 2001; GAST, 2008). Reduzem nitrato em nitrito e geralmente não fermentam a lactose ou o fazem de maneira lenta. Geralmente são produtoras de gás a partir da D-glicose e outros carboidratos. São indol negativas, produtoras de ácido sulfídrico e o citrato de sódio pode ser utilizado como sua única fonte de carbono. São oxidase negativas e catalase positivas, não hidrolisam a ureia e utilizam o malonato de forma variável (HOLT et al., 1994).

As salmonelas são muito susceptíveis à destruição pelo calor, como por exemplo, quando submetidas a 55°C por 1 hora ou a 60°C por 15 a 20 minutos. Diversos desinfetantes químicos são eficazes no controle de *Salmonella*, sendo que o peróxido de hidrogênio, ácido acético, ácido lático e cloro reduzem a

concentração bacteriana em carcaças de frango. No entanto, podem permanecer viáveis em produtos congelados por longos períodos. Alguns sorotipos sobrevivem por semanas ou meses no esterco e na cama de aves, permanecendo nos equipamentos e galpões, disseminando assim a *Salmonella* entre os lotes de aves de uma granja (GAST, 2008).

Salmonella enterica possui mais de 2.500 sorotipos, que são muito parecidos geneticamente, havendo diferença nos antígenos de superfície (LPS) e flagelos (KAUFMANN, RAUPACH, FINLAY, 2001), sendo que 90 destes são os mais comuns em animais e humanos. Em aves podem causar três enfermidades: a pulorose causada por *Salmonella Pullorum*; o tifo aviário causado por *Salmonella Gallinarum*; e o paratifo aviário, causado por qualquer outro sorotipo com a exceção do *Pullorum* e *Gallinarum*, com destaque para *Salmonella Enteritidis* (SE) e *Typhimurium* (ST), responsáveis por toxinfecções alimentares em humanos (GAST, 2008). Quando comparadas com outros sorotipos, *Salmonella Gallinarum* e *Salmonella Pullorum* estão relacionadas com doença grave e mortalidade em aves (REVOLLEDO; FERREIRA, 2012).

Embora as infecções paratífóides sejam muito comuns em aves, raramente causam doença aguda sistêmica, exceto em aves jovens altamente susceptíveis e submetidas a condições inadequadas, que podem apresentar alta mortalidade e retardo no crescimento. A resistência das aves à salmonelose aumenta proporcionalmente com a idade, provavelmente em função da maturidade do sistema imune e desenvolvimento da microbiota, mais complexa no intestino; que compete com as salmonelas por receptores intestinais (SUZUKI, 1994). Deste modo, as salmonelas paratífóides frequentemente determinam um quadro assintomático em frangos de corte, em que ocorre a colonização do trato gastrointestinal, algumas vezes persistindo até o abate, o que resulta em contaminação da carcaça (GAST, 2008).

A capacidade de invasão de *Salmonella* spp. nos tecidos do hospedeiro demonstra a sua virulência. Após a ingestão de SE pela ave, o ingluvío é o primeiro ambiente onde a bactéria se encontra, influenciando na sobrevivência e na virulência da SE no trato gastrointestinal (RICKE, 2003b). Posteriormente à sua adesão, por meio de fímbrias na superfície das células da mucosa intestinal, as bactérias induzem a formação de invaginações na membrana celular do hospedeiro. Os sorovares que estão associados com o quadro de

enterite induzem uma resposta secretória no epitélio intestinal, acionando o recrutamento de neutrófilos que se deslocam para a parte interna do lúmen intestinal. Assim, ocorre intensa multiplicação da bactéria nos fagossomos formados no interior das células epiteliais do intestino (HOLT; MACRI; PORTER, 1995).

Alguns sorovares podem causar infecção sistêmica, pois devido aos mecanismos de virulência podem resistir à ação de substâncias bactericidas dos fagócitos. Este processo de resistência à fagocitose faz com que a infecção se perpetue, pois permite a migração dos fagócitos infectados para outros órgãos, resultando na infecção sistêmica (HOLT; MACRI; PORTER, 1995). A SE pode, por exemplo, a partir do trato gastrointestinal da ave invadir a corrente sanguínea e atingir órgãos como fígado, coração e ovário. Embora alguns outros sorotipos (Typhimurium, Heidelberg e Infantis) sejam também conhecidos por serem invasivos em aves, o padrão e as consequências da disseminação sistêmica foram documentados mais extensivamente para SE. Após a inoculação experimental por via oral em poedeiras, SE foi isolada de diversos órgãos, incluindo o baço, o fígado, o ovário, o oviduto, o coração e na corrente sanguínea. Foi observada também após a inoculação experimental utilizando outras vias (intratraqueal, conjuntival, intracloacal, aerossol) e em aves naturalmente infectadas. Sabe-se ainda que as frequências de colonização intestinal e de invasão aos órgãos internos são maiores em aves recém-nascidas do que em aves mais velhas. Do mesmo modo, a persistência da *Salmonella* em vários sítios de colonização é também influenciada pela idade da ave quando infectada (GINOCCHIO, PLACE, GALAN, 1992; GAST, 2008).

Esta disseminação sistêmica, frequente nas infecções por SE em aves, possibilita a contaminação de carcaças, principalmente durante o processamento no abatedouro, fato que implica em maior risco de infecção humana. Deste modo, a carne de frango contaminada tem sido apontada como importante via de transmissão de SE aos seres humanos (GALANIS et al., 2006).

Nas aves tanto a transmissão vertical quanto a horizontal podem ocorrer. A transmissão vertical ocorre pela contaminação do ovo no trato reprodutivo, seja no ovário, no oviduto ou na passagem do ovo pela cloaca, em contato com

as fezes, representando uma importante via de transmissão em lotes de matrizes infectadas. Na forma horizontal, a ave pode se infectar pelo contato direto entre aves, pela ingestão de fezes, cama, ração ou água de bebida contaminada, além do contato com pessoas, roedores, aves silvestres, insetos, fômites ou instalações contaminados (NAKAMURA et al., 1994; GAST, 2008; GANTOIS et al., 2009; LEFFER et al., 2010).

2.1.2 Epidemiologia

A epidemiologia da *Salmonella*, abrange a transmissão entre as aves e também a contaminação dos produtos avícolas e seu risco à saúde pública (GAST, 2008).

2.1.2.1 *Salmonella* Enteritidis em aves e produtos avícolas

O primeiro relato da ocorrência de SE em aves no Brasil foi realizado no início da década de 90, sendo isolada em pintos de corte que apresentaram sinais clínicos compatíveis com a enfermidade e mortalidade (FERREIRA et al., 1990). Nesta mesma década, a salmonelose era um problema crescente na União Europeia (HUMPHREY, 1990) e nos EUA (BARROW, 1993) com surtos relacionados ao consumo de produtos avícolas contaminados.

No período compreendido entre 1970 e 1990, o Instituto Adolfo Lutz de São Paulo caracterizou o sorovar SE em apenas 0,85% das 14.345 amostras de origem não-humanas analisadas (TAUNAY et al., 1996). Porém, no mesmo Instituto em 1995, SE foi isolada em 40,7% das amostras não-humanas, sendo representadas particularmente por ovos, aves (matrizes) e amostras ambientais (TAVECHIO et al., 1996).

A partir de então, diversos estudos no Brasil demonstraram a presença e o aumento da incidência de SE em materiais avícolas distintos: aves, carcaças de frango congeladas, matérias-primas, ração e amostras ambientais (HOFER et al., 1997; HOFER et al., 1998; SANTOS et al., 2000; SANTOS et al., 2003; MALDONADO, 2008; BORGES et al., 2013; PULIDO-LANDÍNEZ et al., 2013).

Zancan et al. (2000) avaliaram a presença de *Salmonella* em forro de caixa de entrega de pintinhos em 1997 e detectaram SE em 40% de 10 caixas de pintos de poedeiras comerciais no Estado de São Paulo. Gama (2001), também em São Paulo, analisou amostras de mecônio colhidas de caixas de transporte de 12 lotes de pintainhas com um dia de idade, isolando SE de quatro deles. Os lotes positivos foram acompanhados e analisados quanto à presença de SE nas fezes até as 52 semanas de idade das aves.

No período entre 1994 e 1999, Andreatti Filho et al. (2001) identificaram SE em 46,6% dos isolados de *Salmonella*, sendo o sorovar prevalente na pesquisa em aves comerciais, particularmente frangos de corte. Dados de um laboratório de diagnóstico avícola revelaram que SE também foi o sorovar mais prevalente nos anos de 1997 a 2001, sendo detectada em 82,4% dos 376 isolamentos realizados no período, sendo predominante em amostras de frangos e matriz de corte (SILVA; DUARTE, 2002).

Freitas (2008) verificou a presença de *Salmonella* spp. em carcaças e miúdos resfriados de aves comercializados no Distrito Federal, detectando o agente em 2,7% das amostras de miúdos, sendo SE identificada em 1,3% destes isolados. Entre 2007 e 2011, laboratórios públicos e privados isolaram 12.582 amostras de *Salmonella* em carcaças de aves e produtos avícolas comerciais de diferentes regiões do Brasil. A caracterização antigênica demonstrou que SE estava entre os sorovares mais prevalentes (COSTA et al., 2013).

2.1.2.2 *Salmonella* Enteritidis e saúde pública

Atualmente os sorotipos paratífóides, com destaque para SE, têm incidência crescente na avicultura. As aves submetidas à criação industrial, bem como os seus produtos, estão expostos à *Salmonella* praticamente em todas as fases da produção, podendo assim atingir o consumidor final. (BOLDER, et al. 2002; OWMWHANDO; KUBOTA, 2010; ARNOLD, et al., 2013).

Desde a década de 1980 surtos de salmonelose humana têm ocorrido no mundo todo, sendo causados por *Salmonella* Enteritidis presentes em carne

de frango e ovos contaminados (GUARD-PETTER, 2001). Nos Estados Unidos, durante o período de 1996 a 2006, foram diagnosticados 75.058 casos de *S. Typhimurium* (ST) e 69.547 casos de SE em humanos, sendo, portanto, os dois sorovares mais isolados de humanos e produtos de origem avícola naquele país (CENTER OF DISEASES CONTROL, 2008).

Em janeiro de 2012 nos Estados Unidos, o CDC relatou um surto de SE afetando 68 pessoas em 10 Estados. Segundo o relatório, todos os infectados adquiriram a bactéria em uma cadeia de restaurante mexicano (CENTER OF DISEASES CONTROL, 2012).

Na Europa, *S. Enteritidis* foi responsável por 62,5% dos casos registrados de salmonelose humana (GANTOIS, DUCATELLE et al., 2009). Um levantamento dos casos humanos de salmonelose realizado pelo Instituto Nacional de Saúde de Portugal no período de 2000 a 2012 revelou que SE estava envolvida em 68% dos casos e a ST em 19,5%. Demonstrando assim que o país apresentava a maior incidência de casos de salmonelose em humanos na Europa (SILVEIRA; MARQUES; MACHADO, 2013).

No Brasil, por sua vez, SE era raramente detectada em humanos. Em 1981, Mota et al. publicaram a primeira descrição de surto humano por *Salmonella* Enteritidis ocorrido em Curitiba/PR. Em 1993, foi notificada pela primeira vez no Estado de São Paulo um surto por SE afetando alunos de uma escola em Pontalinda, no qual de 772 pessoas expostas, 211 foram afetadas (KAKU et al., 1995).

Assim, desde o início da década de 90, evidenciou-se um aumento significativo da ocorrência deste sorovar tanto em fontes humanas quanto não-humanas (ANDREATTI FILHO, 2008). Nesta ocasião, houve um aumento surpreendente na detecção de SE em amostras humanas pesquisadas no Instituto Adolfo Lutz em São Paulo. Em 1991, SE representava 1,2% dos sorovares isolados passando para 64,9% destes sorovares em 1995 (TAVECHIO et al., 1996). No período de 1993 a 1997, ainda no Estado de São Paulo, Peresi et al. (1998) descreveram surtos de salmonelose acometendo 906 pessoas resultando em 295 hospitalizações, sendo a SE isolada em 80,5% das coproculturas, de todas as amostras de alimentos suspeitas e, em 41,7% dos ovos analisados.

No período de 1996 a 2003, Fernandes et al. (2006) identificaram 3.554 isolados de *Salmonella* de infecções humanas. Entre os 68 diferentes sorovares determinados, SE foi predominante em infecções gastrointestinais e extra-intestinais, responsável por 67,4% de todos os isolados. Santos et al. (2003) avaliaram 272 isolados de *Salmonella* Enteritidis, dos quais 111 foram isolados de carcaças de frango congeladas, 35 de diferentes materiais de origem avícola e 126 de alimentos e material biológico de humanos envolvidos em episódios de toxinfecções alimentares.

Na última década diversos surtos associados a SE foram descritos relacionados ao consumo de alimentos contendo carne de frango ou ovos (MARTINS et al., 2006; MALHEIROS; PAULA; TONDO, 2007; SOUSA et al., 2013). Deste modo, fica evidenciado que a salmonelose decorrente da infecção por SE permanece como uma importante causa de doença em humanos no Brasil.

2.1.3 Diagnóstico

Em face à sua importância econômica e ao impacto à segurança alimentar, a detecção rápida e eficaz de lotes de aves infectados por *Salmonella* se tornou fundamental no esforço para reduzir a frequência da transmissão entre os lotes de aves e aos consumidores de produtos avícolas. O histórico do lote, associado aos possíveis sinais clínicos e lesões, é apenas um indicativo da ocorrência de paratifo aviário (ANDREATTI, 2008), sendo crucial obter o diagnóstico rápido e definitivo para que as medidas de controle sejam adotadas.

O diagnóstico confirmatório de SE pode ser realizado pelo isolamento bacteriano, por meio do cultivo de órgãos tais como coração, baço, fígado e conteúdo cecal, principalmente, ou de materiais diversos (cama, ração, etc). O protocolo de isolamento microbiológico é fundamentado em etapas: o pré-enriquecimento com o objetivo de recuperar as células bacterianas lesadas; o enriquecimento seletivo visando a inibição do crescimento de bactérias competidoras na cultura; o isolamento das colônias em meios seletivos que

promovem o desenvolvimento preferencial de colônias de *Salmonella* spp. com características típicas (BRASIL, 1995). Posteriormente, resultados compatíveis com colônias sugestivas de *Salmonella* spp. nos meios de cultura necessitam de confirmação por testes bioquímicos e sorológicos com anti-soros somático e flagelar específicos para a confirmação do sorovar (ANDRADE et al., 2010).

As culturas devem ser incubadas de 24 a 48 horas sendo a temperatura ideal a de 37°C. A água peptonada tamponada a 2% é o meio de escolha para a etapa de pré-enriquecimento não-seletivo. Na etapa de enriquecimento seletivo os caldos tetracionato e Rappaport-Vassiliadis são os mais recomendados. Para o plaqueamento seletivo pode ser utilizados os meios: ágar verde-brilhante (AVB), xilose lisina desoxicolato (XLD), MacConkey (MC) e *Salmonella-Shigella* (SS), além de Xylose-Lysine-Tergitol 4 (XLT4), ágar Rambac, ágar Bismuto Sulfito e meio com substratos cromogênicos. A adição de novobiocina nos meios de plaqueamento seletivo é importante para inibir o crescimento de outras bactérias (OLIVEIRA, 2000; ANDREATTI, 2008). A fermentação do dulcitol, manitol e maltose, a não-fermentação de lactose e sacarose, a descarboxilação da lisina, a não-produção de indol, a não-hidrólise de uréia, testes de malonato negativo e motilidade positiva confirmam o diagnóstico de *Salmonella* spp. (GAST, 2008; ANDREATTI, 2008).

Testes sorológicos são utilizados para a pesquisa de anticorpos em aves infectadas e monitoramento do lote. A soroaglutinação rápida (SAR) é um teste de triagem, fácil e rápido, amplamente utilizado no Brasil, sendo considerado o método de eleição para a triagem de lotes infectados (BRASIL, 1994). Contudo, no Brasil só existem disponíveis antígenos comerciais específicos para *Salmonella* Pullorum/Gallinarum, os quais não são específicos para a identificação de aves infectadas por salmonelas paratíficas.

A Instrução Normativa N° 62, publicada pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, preconiza o uso de solução salina peptonada tamponada na etapa de pré-enriquecimento. Para o enriquecimento seletivo é recomendado o Rappaport-Vassiliadis e o caldo selenita-cistina. No isolamento o AVB, o XLT4, o XLD, são os sugeridos. Para a identificação bioquímica são recomendadas as seguintes provas: a presença de citocromo oxidase; a detecção de pirrolidonil peptidase (PYRase), a produção de urease; a fermentação da glicose, da sacarose e da lactose no meio TSI; a detecção de

beta-galactosidase; a descarboxilação da lisina; a produção de H₂S; a motilidade e a produção de indol. Com o avanço da tecnologia na produção de imunoreagentes, o ensaio imunoenzimático (ELISA) vem sendo pesquisado em diversos estudos demonstrando maior especificidade na detecção de anticorpos anti-*Salmonella* spp. (BARROW, 1992; BARROW, 1994; OLIVEIRA et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2006). Tem sido utilizado também para a quantificação de anticorpos específicos para *Salmonella* Enteritidis em gema de ovo (TAYEB et al., 2006). Por utilizar anticorpos monoclonais específicos para epítomos de proteínas de SE, o ELISA apresenta menor índice de reação cruzada com outros sorovares (CARDOSO, 2008).

Adicionalmente, o ELISA tem como vantagem ser uma técnica de diagnóstico que pode ser realizada com um grande número de amostras. O resultado é obtido mais rapidamente quando comparado com o isolamento bacteriano (GAST, 2008). Diferentes tipos de ELISA, particularmente os ensaios com bloqueio de anticorpos indiretos ou duplos, usando uma variedade de antígenos, tais como lipopolissacarídeos (LPS), flagelos e antígeno fimbrial SEF14 são utilizados em diversos países (BARROW, 1992; BARROW, 1994).

Em geral, o ELISA utilizado para diagnóstico de SE é o indireto, o qual detecta imunoglobulina G no soro ou nos ovos das aves, pois IgG é a principal classe de imunoglobulina presente na circulação de aves infectadas com SE (BARROW 1994). Contudo, no início da infecção por SE a IgG pode estar em uma concentração muito baixa, não sendo possível a sua detecção pelo ELISA, porém, mesmo assim a ave pode eliminar grandes quantidades da bactéria na fezes (BARROW 1992; GAST 2008).

Outra desvantagem do ELISA é a ocorrência de reações cruzadas com outros sorovares de *Salmonella* (BARROW et al. 1994; THORNS et al. 1996). Thorns et al. (1996) testaram um ELISA baseado em antígenos de LPS e flagelo e verificaram que houve reação cruzada de SE com *S. Panama* e *S. Typhimurium*. Apenas no ELISA com antígeno fimbrial (SEF-14) não houve reação cruzada de SE com os outros sorovares. Apesar disso, o ELISA é uma importante técnica de diagnóstico auxiliar no controle da SE em frangos, sendo útil como uma ferramenta de diagnóstico de triagem (GAST, 2008).

2.1.4 Prevenção e controle

Surtos de salmonelose associados à ingestão de alimentos contaminados têm ocorrido mundialmente. Deste modo, a preocupação com a segurança alimentar das populações é crescente e, conseqüentemente, aumentam os esforços para o controle de *Salmonella* em aves comerciais.

O fato da ocorrência da SE ter pouco ou nenhum impacto na produtividade das granjas é uma das dificuldades associadas à erradicação desse agente nas granjas do Brasil. Além disso, os programas de controle e erradicação são complexos e de elevado custo; há pouca consciência de que a erradicação de SE nas granjas causará redução nos surtos humanos e, por fim, há grande dificuldade dos órgãos oficiais na operacionalização destes programas (SILVA; DUARTE, 2002). Deste modo, as medidas de controle são difíceis de empregar de forma eficaz, pois existem inúmeras fontes potenciais de infecção por *Salmonella* em uma empresa avícola integrada (REVOLLEDO; FERREIRA; MEAD, 2006).

O controle de SE nos lotes de aves é complexo, visto que a bactéria pode afetar toda a escala de produção, considerando-se a disseminação por via vertical e o elevado potencial de excreção bacteriana pelas fezes de uma ave infectada. Aves positivas eliminam SE pelas fezes contaminando o ambiente (cama, comedouro, bebedouro) e sobrevivendo por longo período de tempo no galpão (GAST, 2008). Conseqüentemente, os inúmeros casos de salmonelose humana decorrentes da ingestão de produtos de origem avícola contaminados são o reflexo da dificuldade de se estabelecer medidas adequadas de prevenção e controle.

Devido ao grande impacto econômico que a salmonelose representa para a avicultura, além do seu potencial zoonótico, medidas de biossegurança devem ser instituídas dentro de toda cadeia avícola, desde as matrizes até o processo de abate e de processamento da carcaça. Dentre as principais medidas destacam-se: monitoramento de infecção em aves reprodutoras, seleção de linhagens genéticas resistentes às salmoneloses, controle de roedores, insetos e aves silvestres, manejo correto da cama, desinfecção

eficiente do aviário, uso de rodolúvios e pedilúvios nos aviários e um treinamento adequado para os funcionários dos mesmos (ANDREATTI, 2008; BERGE; WIERUP, 2012).

Além disso, a aquisição de aves livres de SE e a manutenção das mesmas livres até o abate é fundamental na epidemiologia da SE em granjas e abatedouros. Mesmo um pequeno número de aves inicialmente infectadas pode causar a contaminação de toda uma linha de abate (NASCIMENTO, 1995).

Uma importante medida de controle é o monitoramento microbiológico no incubatório, realizando isolamento rotineiro de amostras obtidas dos diversos setores, além de um programa bem estabelecido de desinfecção. Ovos rachados, sujos com fezes ou fora dos ninhos não devem ser incubados. A SAR (soroaglutinação rápida) é uma importante ferramenta de triagem a ser realizada nas reprodutoras com o intuito de se realizar uma monitoria sorológica de SE no lote (ANDREATTI, 2008; BERGE; WIERUP, 2012).

Diversas vacinas inativadas para SE estão disponíveis no mercado. Essas diminuem a transmissão transovariana de SE, no entanto, ainda não são capazes de eliminar a bactéria de órgãos, fezes e ovos (VAN IMMERSEEL et al., 2005). Para a produção de vacinas mais eficazes novos estudos são necessários para um melhor entendimento da relação da *Salmonella* spp. com o hospedeiro (REVOLLEDO; FERREIRA, 2012).

O Decreto de Lei nº 6065, publicado pela Presidência da República, define que a carne de aves e também de mamíferos não pode apresentar *Salmonella* spp.; caso haja a detecção da bactéria, esses produtos devem ser condenados totalmente. Com base nesta legislação, os frigoríficos desenvolveram programas de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC), com o intuito de minimizar a contaminação dos produtos de origem animal na linha de abate (BRASIL, 2004).

Além das medidas gerais de biossegurança, outros métodos de prevenção e controle são também empregados. Como a utilização de antibióticos para as aves está cada vez mais restringida e, em alguns países, até mesmo proibida, outros métodos de controle têm sido utilizados com destaque para o uso dos ácidos orgânicos (DIBNER; RICHARDS, 2005).

2.2 Ácidos orgânicos

Os ácidos orgânicos representam uma importante alternativa ao uso de antibióticos no controle da *Salmonella* spp. em aves comerciais (DIBNER; BUTTIN, 2002).

2.2.1 Definição e características

Ácidos orgânicos são definidos como ácido carboxílico, ou seja, ácidos que apresentam o radical R-COOH (carboxila). Os ácidos orgânicos podem ser de cadeia curta (*short-chain fatty acids* – SCFA), média (*medium-chain fatty acids* – MCFA) ou longa (*long-chain fatty acids* – LCFA) (DIBNER; RICHARDS, 2005; VAN IMMERSEEL et al., 2006). Os ácidos orgânicos de cadeia curta, que contém de 1 a 7 carbonos, são os mais empregados na avicultura comercial por possuírem atividade microbiana, sendo adicionados à ração e/ou à água de bebida das aves. Os ácidos com cadeias médias e principalmente os de cadeia longa, por sua vez, têm baixa solubilidade em água, o que dificulta sua aplicação prática, pois não atuam sobre a microbiota intestinal (DIBNER; RICHARDS, 2005).

Ainda, os ácidos orgânicos podem ser monocarboxílicos tais como o ácido acético, propiônico, butírico e fórmico, ou apresentarem uma hidroxila, geralmente no carbono α , como nos ácidos láctico, tartárico, fumárico e cítrico, estes tem efeito bactericida e/ou bacteriostático pela acidificação do citoplasma bacteriano. Há ainda os ácidos que apresentam duplas ligações e têm ação antifúngica, como o ácido sórbico e fumárico, no entanto, não são todos os ácidos orgânicos que apresentam esses efeitos (DIBNER; BUTTIN, 2002).

Os ácidos orgânicos podem ser classificados como fracos, ou seja, tem menor proporção de carboxilas quando comparados aos ácidos fortes e são apenas parcialmente dissociados, permanecendo, assim, relativamente estáveis no trato gastrintestinal dos animais. São componentes de tecidos animais, vegetais e também são formados durante a fermentação microbiana

no trato intestinal constituindo parte importante do suprimento energético dos animais hospedeiros (DIBNER; BUTTIN, 2002).

O primeiro relato da utilização dos ácidos orgânicos foi na preservação de cereais colhidos com alto teor de umidade para prolongar o período de armazenamento dos mesmos, sendo uma prática de baixo custo quando comparada à secagem artificial (CHAVEERACH, et al., 2002). O valor nutritivo do milho preservado com ácidos orgânicos quando confrontado a outros métodos de conservação foi superior, resultando em melhor desempenho dos animais alimentados com este cereal. Deste modo, pesquisas foram iniciadas com o intuito de avaliar o emprego de ácidos orgânicos nas rações animais. A primeira utilização dos ácidos orgânicos em rações ocorreu na década de 1970, em decorrência de sua ação antifúngica (RICKY, 2003a).

Atualmente os ácidos orgânicos são reconhecidos pelo fundamental papel na redução de microrganismos nas rações. Patógenos como *Escherichia coli*, *Campylobacter* spp. e *Salmonella* spp. são controlados na ração com o uso de ácidos orgânicos, consequentemente há redução das infecções subclínicas nas aves que se alimentam de rações tratadas (DIBNER; BUTTIN, 2002).

O Brasil está, junto com os Estados Unidos, China, México e Japão, entre os países que tem maior produção de acidificantes nas rações animais, exportando para países da América Latina, Oriente Médio e Ásia (COMPANIES AND MARKETS, 2012).

2.2.2 Mecanismo de ação

A ação antimicrobiana dos ácidos orgânicos varia de acordo com o tipo de ácido empregado, sua concentração e o pH do meio (CHAVEERACH, et al., 2002; BUTIN, 2001). Contudo, sua ação como antimicrobiano ainda não foi completamente elucidada. Algumas teorias sugerem que eles se difundem na sua forma não dissociada (lipossolúvel) através da membrana microbiana. O pH intracitoplasmático é maior que o do ambiente circundante, favorecendo assim, o transporte através da membrana por gradiente de concentração. Os ácidos dissociam-se (H^+ e A^-) no interior da célula do patógeno diminuindo o pH

intracelular. Com o objetivo de manter o pH interno inalterado, a célula acionará o transporte ativo, pois os prótons são impermeáveis à membrana microbiana e eles precisam ser retirados da célula com o intuito de neutralizar o pH intracelular. Assim, os prótons (H^+) saem da célula e são trocados por cátions, ocasionando o esgotamento das reservas energéticas da bactéria. Concomitantemente, o pH ácido irá danificar ou modificar a funcionalidade de enzimas, proteínas estruturais e DNA, desestabilizando a homeostase celular e a membrana externa pelo processo de quelação. Promovendo assim o efeito bactericida desejado. Em suma, o ácido induzirá o aumento do pH intracelular causando prejuízos ao metabolismo bacteriano com consequente morte celular (VANDERPLAS et al., 2010; MANI-LÓPEZ et al., 2012). A Figura 1 ilustra o provável mecanismo de ação antimicrobiano dos ácidos orgânicos.

Figura 1 - Mecanismo de ação dos ácidos orgânicos na célula microbiana

(Adaptado de MANI-LÓPEZ, et al., 2012).

Sabe-se que os ácidos orgânicos com maior atividade antimicrobiana tem um pKa (pH no qual o ácido é dissociado) entre 3 e 5 (DIBNER; BUTTIN, 2002). Na forma não dissociada a ação inibidora do ácido é de 100 a 600 vezes maior do que na forma dissociada. Ricke (2003) descreve que os ácidos orgânicos em sua forma não dissociada penetram mais facilmente na membrana lipídica da célula bacteriana. Assim, a concentração de ácido não

dissociado aumenta conforme o pH do meio diminui, portanto, o ácido orgânico tem sua eficácia otimizada em pH mais baixos (VANDERPLAS et al., 2010; MANI-LÓPEZ et al., 2012).

Stralford et al. (2009) propuseram uma nova teoria sobre o mecanismo de ação dos ácidos orgânicos, sugerindo que nem todo ácido orgânico atua diminuindo o pH citoplasmático bacteriano. O ácido sórbico, por exemplo, em uma concentração inibidora atuaria lesionando a membrana bacteriana, acarretando a perda de sua integridade e o aumento de permeabilidade a prótons, resultando na lise da bactéria (STRALFORD et al., 2009).

Em síntese, a eficácia dos ácidos orgânicos dependerá de sua constante de dissociação, concentração e do pH do meio. Ressalta-se, no entanto, que algumas bactérias, como por exemplo, a *Salmonella* spp., podem desenvolver resistência ao ácido, adaptando-se ao meio mesmo em condições de pH extremo (3,0). A maioria das bactérias resistentes aos ácidos cresce à temperatura de 37°C, portanto, temperaturas inferiores ou superiores a este valor dificultam o crescimento das mesmas (ALVAREZ-ORDONEZ, et al. 2009). A variação na concentração e formulação do ácido orgânico também surge como alternativa para evitar a resistência bacteriana, que representa uma grande preocupação nos dias atuais (MANI-LÓPEZ, et al., 2012).

2.2.3 Ação dos ácidos orgânicos sobre a *Salmonella* spp.

O conhecimento acerca da ação antimicrobiana dos ácidos orgânicos sobre a *Salmonella* spp. ainda são escassos (VAN IMMERSEEL, 2005). A *Salmonella* codifica alguns genes que são responsáveis pela adaptação da bactéria ao hospedeiro e ainda são fundamentais para a invasão bacteriana. Em segmentos do cromossomo conhecidos como ilhas de patogenicidade existem genes que codificam proteínas envolvidas na virulência de *Salmonella enterica* (GROISMAN & OCHMAN, 1996; OCHMAN et al., 2000). SPI-1 (*pathogenicity islands*) regula uma série de proteínas, componentes estruturais que auxiliam a bactéria na invasão às células epiteliais. A SPI-1 é regulada

pelo gene *hilA* (HENSEL, 2004). Outras formas de invasão foram descritas (HARA-KAONGA & PISTOLE, 2004; LATASA et al., 2005; VELGE et al., 2012).

Lawhon et al. (2002) observaram que o ácido propiônico e butírico diminuíram a expressão do gene *hilA* na *Salmonella* spp. causando dessa forma uma redução da invasão nas células epiteliais. Este resultado também foi comprovado *in vivo*, já que ratos desafiados com uma cepa de *Salmonella* spp. que foi tratada com os ácidos propiônico e butírico sobreviveram, enquanto os que foram desafiados com uma cepa selvagem morreram dias após.

Gantois et al. (2006) também analisaram a ação do ácido butírico em células epiteliais intestinais. O ácido reduziu a expressão, em mais de 20 vezes, de 17 genes da SPI-1, entre eles *hilD* e *invF*. No entanto, ainda são necessários mais estudos para se compreender como os ácidos orgânicos agem no controle de *Salmonella* spp. (VAN IMMERSEEL et al., 2005).

2.2.4 Utilização dos ácidos orgânicos na produção animal

Os ácidos orgânicos de cadeia curta (acético, fórmico, cítrico, fumárico, propiônico e sórbico) são os mais utilizados na ração e água dos animais, pois apresentam baixa toxicidade e boa solubilidade. Embora a atividade antimicrobiana dos ácidos de cadeias média e longa seja maior, estes têm baixa solubilidade em água, conseqüentemente, os ácidos com cadeias maiores que 10 carbonos não são utilizados na prática (DIBNER; RICHARDS, 2005; VAN IMMERSEEL et al., 2006).

Além dos efeitos antimicrobianos, os ácidos podem estimular a secreção pancreática das aves e aumentar a produção de muco intestinal otimizando o metabolismo gastrointestinal, digestão, absorção e retenção de nutrientes, promovendo desta maneira melhor conversão alimentar pela ave (PARTANEN; MROZ, 1999; VAN IMMERSEEL et al., 2006).

A microbiota do trato gastrointestinal das aves varia conforme a idade, o pH do órgão, medicamentos utilizados e infecções com microrganismos patogênicos. No ingluvío, que tem um pH de 5,3 (FORD, 1974; MENDES, 2001), há predominância de *Lactobacillus* spp. os quais produzem ácido lático

e acético que inibem o crescimento de outras bactérias. Em razão do pH extremamente ácido (4,0) do proventrículo e moela poucas bactérias são capazes de sobreviver neste ambiente. O duodeno, jejuno e íleo são colonizados por *Lactobacillus* spp., *Enterococcus* spp. e *Streptococcus* spp. O ceco contém a maior quantidade de microrganismos, sendo também responsável pela fermentação microbiana. Assim, a microbiota do trato gastrointestinal é fundamental no controle dos patógenos, pois faz exclusão competitiva com os microrganismos patogênicos, os quais colonizam o trato gastrointestinal quando há desequilíbrios na microbiota, por exemplo, mudança na dieta, infecções ou estresse térmico (JIANGGRANG et al., 2003).

Para a acidificação da ração e da água das aves, os ácidos podem ser empregados de duas formas. A primeira é na forma livre, na qual o ácido não é protegido. Desta forma, sua ação ocorre apenas no inglúvio, sem atividade no restante do trato gastrointestinal, visto que sua concentração vai diminuindo durante o trânsito pelos processos de absorção e metabolização. A segunda forma, mais atual, baseia-se no uso dos ácidos orgânicos revestidos (microencapsulados), que são liberados lentamente durante o transporte no trato gastrointestinal, deste modo, o ácido atinge o intestino delgado e ceco, sendo este o local onde há grande colonização de *Salmonella* spp. (VAN IMMERSEEL et al., 2004).

Pesquisas demonstraram que a suplementação na ração de ácido propiônico e fórmico revestidos resultou na diminuição da colonização intestinal, morbidade e mortalidade após a infecção por *Salmonella* spp. em frangos de corte (VAN IMMERSEEL et al., 2004). A utilização de ácidos orgânicos via água antes do abate das aves é uma alternativa eficaz na diminuição dos microrganismos patogênicos, como sugerem Byrd et al. (2001) que avaliaram a eficácia do ácido láctico, acético e fórmico em frangos inoculados via inglúvio com *Salmonella* Typhimurium.

2.2.5 Utilização dos ácidos orgânicos na produção animal brasileira

Berchieri e Barrow (1996) foram um dos pioneiros na pesquisa sobre a eficácia dos ácidos orgânicos no Brasil, demonstrando que aves que

receberam uma mistura comercial de ácido fórmico e ácido propiônico na ração diminuíram em 66% a transmissão horizontal de *Salmonella* Gallinarum.

Dentre os órgãos das aves, o ingluvírio é conhecido como uma fonte de contaminação de *Salmonella* spp. e *Campylobacter* spp. durante o processamento das carcaças, representando um ponto crítico de controle da entrada destes patógenos na linha de produção de carne de frango. De tal modo, a maioria das pesquisas avalia o efeito dos ácidos orgânicos na diminuição da contaminação do produto final. Em um destes estudos, Ávila et al. (2003) testaram a eficácia dos ácidos láctico e cítrico via água em frangos. Inocularam $10^{8,96}$ ufc de *Salmonella* Enteritidis via papo 8 e 48 horas antes do abate. Os resultados demonstraram que as aves que receberam a água com ácido 48 horas antes do abate diminuíram a concentração de *Salmonella* recuperadas do papo quando comparado ao grupo controle. No entanto, o grupo que recebeu o aditivo 8 horas antes do abate não apresentou diferença significativa quando comparado ao controle. Segundo os autores, o período de 8 horas seria muito curto para a adaptação das aves à água com ácido e, provavelmente, houve um menor consumo de água e por isso o resultado não foi satisfatório.

Silva (2005) avaliou tratamentos com ácidos orgânicos na concentração de 30 Kg/tonelada de ração, verificando que os ácidos foram eficazes na inibição do crescimento da *Salmonella* spp. em rações avícolas após 24h, 48h e sete dias de contato do produto com a ração contaminada. Em outro estudo, a eficácia do ácido na ração foi avaliada em frangos de corte inoculados com *Salmonella* Enteritidis via papo aos 3 dias de idade. Foram testadas duas concentrações da mistura de ácido fórmico (1,5 Kg/ton) e propiônico (3,0 Kg/ton) na ração. A diferença na contagem de bactérias presentes no conteúdo cecal foi estatisticamente menor nos dois grupos tratados com ácido, quando comparados com o grupo controle que não recebeu o ácido na ração (STERZO et al., 2007).

Bassan et al. (2008) observaram que a adição de solução contendo ácido fórmico e propiônico (4 Kg/ton) na dieta de frangos reduziu a colonização por *Salmonella* na tonsila cecal a partir do 18º dia após a inoculação, sendo que a partir do 32º dia todas as aves apresentaram resultado negativo para *Salmonella* Enteritidis.

Tais estudos evidenciam as crescentes pesquisas sobre o uso dos ácidos orgânicos na avicultura nacional.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a eficácia do ácido fórmico no controle da infecção por *Salmonella* Enteritidis (SE) e na transmissão horizontal em pintinhos experimentalmente infectados.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a eficácia do ácido fórmico administrado via ração ou via água no controle da infecção por SE em frangos de corte;
- Avaliar a ocorrência de transmissão horizontal entre os pintinhos desafiados com SE no 1º dia de vida e pintinhos contactantes tratados com o ácido;
- Determinar semanalmente a presença de SE na cama das aves;
- Avaliar o reisolamento de SE nos órgãos de aves aos 42 dias de idade tratadas com ácido fórmico;
- Avaliar a conversão sorológica por método imunoenzimático (ELISA) de aves desafiadas com SE e de contactantes aos 42 dias de idade.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Aves

Foram utilizados 360 pintos de corte de linhagem comercial, alojados no Centro Experimental de Patologia Aviária (CEPA) na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. As aves foram mantidas em baias com cama de maravalha e receberam aquecimento por meio de luz artificial durante o período inicial, além de ração e água *ad libitum*.

4.2 *Salmonella* spp.

A cepa SA 109 de *Salmonella* Enteritidis, pertencente à coleção de culturas do Laboratório de Ornitopatologia I (LABOR) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP), foi escolhida para ser utilizada no experimento. A solução estoque do inóculo para a infecção experimental foi preparada pela inoculação da bactéria em meio Luria-Bertani por 4h a 37°C sob agitação (60 rpm). O número de unidades formadoras de colônias (UFC)/mL foi determinado pela inoculação de 100 µL de suspensão bacteriana, após diluição seriada, em água peptona 0,1%, na base 10, em meio MacConkey. As placas foram mantidas a 37°C por 18 horas para o crescimento bacteriano.

4.3 Delineamento experimental

Os pintinhos foram distribuídos de maneira aleatória em cinco (05) tratamentos com seis (06) repetições de 12 aves cada, sendo que o tratamento 1 (T1) foi o grupo controle, sem a adição de ácido fórmico; o T2 com a adição de ácido fórmico na ração, na concentração de 0,3%; o T3 com a adição de

ácido fórmico na ração, na concentração de 0,2%; o T4 com a adição de ácido fórmico na água de bebida até que a mesma atingisse em pH de 4 e, o T5 com a adição de ácido fórmico protegido na ração, na concentração de 0,2%.

No 1º dia de vida, seis aves (50%) de cada grupo foram inoculadas com 0,1 mL de suspensão bacteriana contendo 3×10^7 UFC *Salmonella* Enteritidis, por meio de sonda esofágica, diretamente no inglúvio, as outras seis (50%) aves não receberam o inócuo, foram marcadas com corante e definidas como contactantes.

Os grupos tratados (T2 a T5) receberam o ácido do 1º ao 7º dia de idade das aves e posteriormente do 35º ao 42º dia. Enquanto o grupo 1 não recebeu o ácido fórmico.

4.4 Coleta de material biológico e isolamento de SE

Foram colhidas amostras de fezes da cama de todos os tratamentos no 7º, 14º, 21º, 28º, 35º e 42º dias de experimento para o reisolamento de *Salmonella* spp.

Ao completar 42 dias de idade as aves foram submetidas à colheita de sangue por punção cardíaca, sendo em seguida eutanasiadas em câmara de CO₂ (Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais – FMVZ/USP nº 2511/2011). As amostras de soro foram aliquotadas e armazenadas a -20°C. As aves foram necropsiadas e foram colhidos de forma asséptica fragmentos de inglúvio, fígado, baço e cecos de todas as aves, com tesouras e pinças estéreis. Os órgãos foram acondicionados em sacos estéreis previamente identificados com o número da ave e a baia que a mesma pertencia.

Objetivando a recuperação de SE, os fragmentos de inglúvio, fígado, baço e conteúdo cecal de seis (06) aves de cada grupo (50% inoculadas e 50% contactantes) foram triturados e homogeneizados. Posteriormente, este material foi inoculado em meio de enriquecimento tetracionato, que foi mantido por 36 horas a 37°C. Após este período de incubação as amostras foram semeadas em Agar XLT₄ e incubadas a 37°C por 48 horas. A identificação

bioquímica de colônias negras, sugestivas de *Salmonella* spp. foi realizada com o uso do sistema Lac EMIC 9T (Probac do Brasil).

4.5 Ensaio imunoenzimático

As amostras de soro obtidas foram submetidas ao ensaio imunoenzimático (ELISA) utilizando o *kit* comercial *Salmonella* Enteritidis Antibody Test Kit (*Flockchek IDEXX Laboratories*®, EUA) seguindo as instruções do fabricante. O teste foi realizado com soro de seis aves de cada baia, sendo de três (03) que haviam sido desafiadas com SE e três (03) que não haviam sido desafiadas (contactantes). As densidades óticas inferiores a 5,9 foram consideradas positivas e as densidades superiores a 6,0 foram consideradas negativas. Controles positivos e negativos presentes no *Kit* foram usados conforme as instruções do fabricante.

4.6 Análise estatística

Os dados do reisolamento de *Salmonella* e do ELISA foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) utilizando o programa de estatística *StatView for Windows Copyright* 1998 (SAS Institute Inc., NC, USA). As médias do reisolamento e do ELISA para cada tratamento foram comparadas pelo teste LSD a 5% de probabilidade ($p \leq 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 Reisolamento de *Salmonella* Enteritidis

A tabela 1 apresenta os dados do reisolamento de SE no inglúvio, fígado/baço e ceco das aves inoculadas com SE no 1º dia de idade em tratamentos com diferentes concentrações e vias de administração de ácido fórmico. Os grupos de aves do T2, T3 e T5 apresentaram diferença estatística significativa apenas em fígado/baço. Foi observada diferença estatística significativa no reisolamento de *Salmonella* em inglúvio, fígado/baço e ceco das aves do T4. Apesar de não ter sido observada diferença significativa no reisolamento de SE em fígado/baço nas aves do T3 e T5, as médias foram consideravelmente menores em relação àquelas do T1.

Tabela 1 – Médias e desvio padrão do reisolamento de SE em órgãos de aves desafiadas com SE e tratadas com ácido fórmico.

Grupos	Inglúvio	Fígado/baço	Ceco
T1	27,7% ± 38,9 ^a	22,2% ± 17,2 ^a	22,2% ± 27,2 ^a
T2	22,2% ± 17,2 ^a	0% ± 0 ^b	22,2% ± 17,2 ^a
T3	16% ± 18,2 ^a	0% ± 0 ^b	5,50% ± 13,6 ^{ab}
T4	0% ± 0 ^b	0% ± 0 ^b	0% ± 0 ^b
T5	14,2% ± 17,8 ^a	4,7% ± 12,5 ^b	14,2% ± 17,8 ^{ab}

^{a-b} na mesma coluna indica diferença estatística pelo teste LSD ($p \leq 0,05$). T1: grupo controle sem aditivo; T2: ácido fórmico 0,3% na ração; T3: ácido fórmico 0,2% na ração; T4: ácido fórmico via água; T5: ácido fórmico protegido 0,2% na ração.

A tabela 2 mostra as médias e o desvio padrão do reisolamento de SE em inglúvio, fígado/baço e ceco das aves contactantes, as quais não foram inoculadas com SE em tratamentos com diferentes concentrações e vias de administração de ácido fórmico. Nas aves do T3 houve diferença significativa em inglúvio, fígado/baço e ceco, pois em nenhum dos órgãos foi isolada *Salmonella* spp. O mesmo resultado foi observado no inglúvio e fígado/baço

nas aves dos tratamentos 4 e 5. Não foram encontradas diferenças significativas nas médias de reisolamento de *Salmonella* em ceco das aves dos T4 e T5, entretanto, houve uma considerável redução em relação ao reisolamento de *Salmonella* em comparação às aves dos tratamentos 1 e 2.

Tabela 2 – Médias e desvio padrão do reisolamento de SE em órgãos de aves contactantes às desafiadas com SE e que foram tratadas com ácido fórmico.

Grupos	Inglúvio	Fígado/baço	Ceco
T1	5,5% ±13,6 ^a	11,1% ± 17,2 ^{ab}	11,1% ± 17,2 ^a
T2	11,1% ±17,2 ^a	22,2% ± 27,2 ^a	16,6% ±18,2 ^a
T3	0% ± 0 ^b	0% ± 0 ^b	0% ± 0 ^b
T4	0% ± 0 ^b	0% ± 0 ^b	6,6% ± 14,9 ^a
T5	0% ± 0 ^b	0% ± 0 ^b	6,6% ± 14,9 ^a

^{a-b} na mesma coluna indica diferença estatística pelo teste LSD ($p \leq 0,05$). T1: grupo controle sem aditivo; T2: ácido fórmico 0,3% na ração; T3: ácido fórmico 0,2% na ração; T4: ácido fórmico via água; T5: ácido fórmico protegido 0,2% na ração.

Em relação ao reisolamento de SE nas fezes presentes na cama, a qual foi colhida semanalmente, esta foi reisolada nos dias 7, 14 e 42 das baias do T1. Das baias das aves do T2 e do T3, *Salmonella* foi reisolada nos dias 7, 14, 28, 35 e 42. Das baias do T4 houve a presença de *Salmonella* nos dias 7, 14, 28 e 35. Enquanto das baias de aves do T5 *Salmonella* foi reisolada nos dias 14 e 42, conforme sumarizado na tabela 3.

Tabela 3 – Frequência de reisolamento de SE nas fezes colhidas das camas nos dias 7, 14, 21, 28, 35 e 42, de acordo com o grupo de tratamento

Grupo	dia 7	dia 14	dia 21	dia 28	dia 35	dia 42
T1	+	+	-	-	-	+
T2	+	+	-	+	+	+
T3	+	+	-	+	+	+
T4	+	+	-	+	+	-
T5	+	-	-	-	-	+

(-) Não houve isolamento de *Salmonella*.

Os gráficos de 1 a 5 demonstram o percentual de aves infectadas e contactantes evidenciando a ocorrência de transmissão horizontal após 42 dias da infecção experimental.

Gráfico 1 – Percentual de reisolamento de **SE** nos órgãos de aves inoculadas e contactantes do T1 aos 42 dias pós-infecção experimental.

Gráfico 2 – Percentual de reisolamento de **SE** nos órgãos de aves inoculadas e contactantes do T2 aos 42 dias pós-infecção experimental

Gráfico 3 – Percentual de reisolamento de SE nos órgãos de aves inoculadas e contactantes do T3 aos 42 dias pós-infecção experimental.

Gráfico 4 – Percentual de reisolamento de SE nos órgãos de aves inoculadas e contactantes do T4 aos 42 dias pós-infecção experimental

Gráfico 5 – Percentual de reisolamento de SE nos órgãos de aves inoculadas e contactantes do T5 aos 42 dias pós-infecção experimental

5.2 ELISA

Os resultados do ELISA a partir das amostras das aves que foram inoculadas com SE e contactantes, tratadas com ácido fórmico e do grupo controle (T1) estão demonstrados na tabela 4. As aves do T1 apresentaram diferença estatística significativa quanto ao número de aves sororeagentes em relação aos outros grupos. Apenas nas aves do T2 houve a presença de anticorpos específicos ao antígeno de *Salmonella* Enteritidis dentre as demais aves dos grupos tratados com ácido orgânico na ração.

Tabela 4 – Médias e desvio padrão de aves inoculadas com SE e contactantes tratadas com ácido fórmico que foram sororeagentes no ELISA para *Salmonella* Enteritidis.

Tratamento	Aves inoculadas	Aves contactantes
T1	16,6% ± 14,9 ^a	9,4% ± 10,4 ^a
T2	5,5% ± 13,6 ^b	0% ± 0 ^a
T3	0% ± 0 ^b	5,5% ± 13,6 ^a
T4	0% ± 0 ^b	0% ± 0 ^a
T5	0% ± 0 ^b	0% ± 0 ^a

^{a, b} na mesma coluna indica diferença estatística ($p \leq 0,05$). T1: grupo controle; T2: ácido fórmico 0,3% na ração; T3: ácido fórmico 0,2% na ração; T4: ácido fórmico via água; T5: ácido fórmico protegido 0,2% na ração.

O gráfico seis (06) demonstra o percentual de aves sororeagentes no ELISA para anticorpos anti-SE entre aves inoculadas e contactantes dos T1 a T5.

Gráfico 6 – Percentual de aves inoculadas e contactantes sororeagentes para SE no ELISA nos grupos de T1 a T5.

6 DISCUSSÃO

As infecções por *Salmonella* spp. causam grande impacto econômico decorrente de queda no desempenho, gastos com medicamentos, mortalidade, além do seu impacto causando toxinfecção alimentar em humanos. Em vista disso, a indústria avícola vem buscando métodos alternativos ao uso de antimicrobianos para sua prevenção e controle (WALES et al., 2010).

Estudos referentes ao uso de ácidos orgânicos para o controle de *Salmonella* spp. demonstraram resultados divergentes. Isto se deve não apenas ao tipo de ácido e ao sorovar utilizado, mas também à concentração e a via de administração de ambos, bem como as condições de manejo utilizadas durante o experimento (VAN IMEERSEEL et al., 2005; DAVIES; CARRIQUE-MAS, 2010; WALES et al., 2010).

No presente estudo, as aves inoculadas do T1 apresentaram os percentuais mais elevados de reisolamento de SE entre todos os grupos (Tabela 1) estudados, confirmando a disseminação sistêmica, bem como, a transmissão horizontal, sendo o agente reisolado de aves contactantes aos 42 dias (Tabela 2). Esse resultado condiz com o esperado, visto que este grupo foi desafiado com SE, mas não recebeu nenhum aditivo como tratamento.

Nas aves do T2, que consistiu na administração de ácido fórmico na ração em uma concentração de 0,3%, houve reisolamento de SE em ingluvío e ceco das aves inoculadas, sendo o percentual (22,2%) semelhante ao encontrado no T1 (grupo controle). Entretanto, não houve reisolamento de *Salmonella* spp. no fígado/baço. A porcentagem de reisolamento de SE no ceco (22,2%) de aves inoculadas no T2 se refletiu na eliminação desta na cama, pois a bactéria foi isolada nos dias 7, 14, 28, 35 e 42, resultando assim em infecção das aves contactantes que apresentaram isolamento do agente em todos os órgãos, evidenciando a infecção sistêmica. O fraco desempenho do ácido fórmico a 0,3% nas aves do T2 corrobora com os resultados encontrados por Van Immerseel et al. (2004) que avaliaram o uso do ácido acético e fórmico a 0,22%, no controle de SE em aves experimentalmente infectadas com SE. De 20 aves inoculadas, *Salmonella* spp. foi reisolada do

fígado de 11 delas e em 9 aves houve a recuperação de *Salmonella* spp. no baço, indicando que os ácidos não foram eficientes neste caso.

Nas aves do T3 (ácido fórmico 0,2% na ração) o reisolamento de SE nas aves inoculadas foi observado no ingluvío (16,6%) e em menor percentual no ceco (5,5%). Entretanto, não houve reisolamento do agente em nenhum dos órgãos analisados de aves contactantes, demonstrando que o ácido fórmico nesta concentração foi eficiente em inibir a transmissão horizontal de SE. Em relação à cama dos frangos, *Salmonella* foi detectada nos mesmos dias do T2, conforme demonstrado na Tabela 3.

Aves inoculadas do T5, que receberam o ácido fórmico microencapsulado a 0,2% na ração, apresentaram reisolamento de *Salmonella* no ingluvío (14,2%) e ceco (14,2%) estatisticamente superior quando comparado às aves do T4, e uma porcentagem baixa em fígado/baço (4,7%) (Tabela 1). Nas aves contactantes do T5, *Salmonella* foi reisolada apenas no ceco (6,6%) (Tabela 2). O ácido microencapsulado é liberado de maneira mais lenta quando comparado ao ácido livre, sendo também metabolizado mais lentamente, atingindo, portanto, o trato gastrointestinal inferior em maior concentração (VAN IMMERSEEL et al 2004, 2005). Os resultados aqui obtidos foram similares aos encontrados por Van Immerseel et al. (2005) que, ao testarem a eficácia do ácido butírico protegido a 0,25%, obtiveram uma diminuição no reisolamento de SE em ceco. De 25 aves inoculadas foi recuperada SE em 14 aves no fígado e 12 no baço, resultado semelhante ao grupo que não recebeu o aditivo. Fernandez-Rúbio et al. (2009) conseguiram resultados mais expressivos em relação aos resultados deste estudo, utilizando ácido butírico protegido na concentração de 0,92% em aves experimentalmente infectadas com SE. Entre 20 aves inoculadas com SE os autores recuperaram a bactéria em ingluvío e ceco de apenas duas, não recuperando SE no fígado de nenhuma ave. A alta concentração de ácido butírico protegido pode ter sido determinante para que os autores conseguissem uma ação satisfatória contra SE.

Ainda em relação as aves do T5, a recuperação de SE na cama ocorreu nos dias 14 e 42, o que provavelmente pode ser uma das fontes de contaminação de aves contactantes. Embora, nas aves deste tratamento, tenha

ocorrido recuperação de SE em apenas 2 dias (14 e 42), resultado este superior aos outros tratamentos estudados.

O ácido fórmico é facilmente diluído em água, por isso é muito usado para se acidificar a água de beber de aves comerciais (DIBNER; BUTTIN, 2002).

No que se refere ao uso do ácido fórmico na água (T4), os resultados demonstraram que não houve recuperação de SE nos órgãos analisados das aves inoculadas (Tabela 1). Estes resultados são estatisticamente inferiores aos resultados encontrados nas aves inoculadas do T1, no ingluvío e no ceco de aves inoculadas do T2 e do T5. Não havendo diferença estatística significativa entre as aves inoculadas do T4 com as do T3. Em relação às aves contactantes (Tabela 2), não foi reisolada SE no ingluvío e no fígado/baço das aves do T4, apenas 6,6% no ceco; resultado semelhante foi encontrado nas contactantes do T5.

Entretanto, entre as aves contactantes do T2, o reisolamento de SE foi estatisticamente superior no ingluvío, fígado/baço e ceco, quando comparadas àquelas do T3 e; no ingluvío e fígado/baço na comparação com as aves do T4 e T5. Apesar de não haver diferença estatística, o percentual de reisolamento de SE no ceco de aves contactantes do T2 foi maior que no ceco de aves do T4 e T5.

Os resultados sugerem uma boa eficiência do ácido fórmico administrado na água no controle da transmissão horizontal de SE.

Os resultados obtidos neste estudo com o emprego de ácido orgânico por via água de bebida corroboram com os achados de Byrd et al. (2001). Os autores analisaram a eficiência de três ácidos orgânicos (lático, fórmico e acético) a 0,5% na água de bebida de aves experimentalmente infectadas com *Salmonella Typhimurium* (ST) e tratadas com o aditivo oito (08) horas antes do abate. A recuperação de ST no ingluvío de aves tratadas com ácido fórmico diminuiu 72% em relação ao grupo que não recebeu o aditivo.

Ávila et al. (2003) utilizaram, em aves experimentalmente infectadas com SE, ácido lático (0,4%), ácido cítrico (0,5%) e a mistura de ambos (0,8%) na água de bebida, oito (08) e 32 horas antes do abate. O ácido cítrico, em aves tratadas 32 horas antes do abate, atuou de forma que ocorresse uma recuperação de $2,17^{10}$ UFC de SE no ingluvío, resultado estatisticamente

inferior ao encontrado nas aves do grupo controle. Estes resultados corroboram com os encontrados neste estudo, provando que a adição de ácido orgânico na água de bebida mostra-se como uma importante ferramenta no controle de SE.

A eficácia dos ácidos orgânicos na água de bebida é explicada pela rápida diminuição do pH no inglúvio das aves, local este que representa um dos principais sítios de colonização de *Salmonella* spp. e porta de entrada para a disseminação da bactéria no trato gastrointestinal. A diminuição no pH é prejudicial à *Salmonella* spp. cujo pH ideal é em torno de 7 (GAST, 2008). O pH mais ácido favorece a multiplicação de bactérias presentes na microbiota, tais como os *Lactobacillus* spp., que produzem ácido lático acidificando ainda mais o inglúvio, sendo mais um importante obstáculo para a multiplicação de *Salmonella* spp. (LUDTKE; GREGORY; COSTA, 2008). Com o pH mais baixo no inglúvio a ação do ácido orgânico é ainda mais efetiva. O contrário também é observado, ou seja, com um pH mais próximo à neutralidade ou mais básico, a eficiência do ácido é bastante prejudicada (RICKE, 2003). No Brasil é obrigatório um jejum pré-abate de no mínimo de oito (08) horas. Se ocorrer um aumento do tempo de jejum pré-abate, o pH do inglúvio tende a aumentar devido ao longo período sem alimentação. Deste modo, *Lactobacillus* spp. podem morrer, pois cessam-se os nutrientes para a sua sobrevivência e ocorre um aumento da multiplicação de *Salmonella* spp. Por esta razão, a acidificação da água durante o período de jejum pré-abate é uma importante ferramenta no controle de *Salmonella* spp. em frangos de corte (BYRD et al. 2001; LUDTKE; GREGORY; COSTA, 2008).

A palatabilidade da água é alterada com a adição do ácido orgânico, portanto, é fundamental que as aves recebam o ácido por um período mais longo para que possam se adequar a esta alteração (ÁVILA et al., 2003). No presente estudo o aditivo foi fornecido na primeira e na última semana de vida das aves. Este período utilizado foi suficiente para a adaptação das aves ao paladar da água com o aditivo, visto que o T4 foi capaz de inibir a recuperação de SE nos órgãos testados.

É importante ressaltar que nas aves do T4 não houve recuperação de SE no inglúvio, tanto para as aves inoculadas quanto para as contactantes e, naquelas do T3 e T5, não houve isolamento de *Salmonella* no inglúvio das contactantes. O inglúvio é um dos principais contaminantes da carcaça durante

o abate, pois no momento da evisceração o mesmo pode se romper e seu conteúdo pode entrar em contato com a carcaça (LEITÃO, 2001). O intestino também pode ser rompido no momento da evisceração sendo, deste modo, outro potencial contaminante (DELAZARI, 2001). No presente estudo não houve a recuperação de SE no ceco das aves inoculadas do T4 e nas contactantes do T3. Estes resultados são importantes para a saúde animal, mas principalmente para saúde pública, visto que SE é uma das principais fontes de toxinfecções em humanos.

Os tratamentos T3 e T4 apresentaram bons resultados no controle de SE, sendo o T4 mais eficiente. Mesmo não havendo diferença estatística entre ambos no que diz respeito às aves contactantes, nas aves inoculadas o reisolamento de SE no T4 foi estatisticamente menor no ingluvío (Tabela 1).

Em todos os tratamentos houve isolamento de SE na cama (Tabela 5) e sabe-se que esta é uma das principais fontes de transmissão horizontal de patógenos entre as aves, podendo ainda ser fonte de contaminação de ração, água, bebedouros e comedouros. É fundamental realizar o correto manejo da cama infectada, sendo necessário a sua troca completa e uma desinfecção criteriosa do aviário antes do recebimento de um novo lote de aves (VIGAS et al., 2012).

A capacidade de tolerância da *Salmonella* spp. ao pH ácido pode explicar o baixo desempenho no controle de *Salmonella* spp. observado nas aves do T2 deste estudo. Este grupo recebeu o ácido fórmico na concentração de 0,3% adicionado à ração. A *Salmonella* spp. pode ter acionado os mecanismos genéticos de resposta à tolerância ácida sobrevivendo ao desafio frente ao ácido fórmico (FOSTER; 1993; BEARSON, et al. 1996; AUDIA; WEBB; FOSTER, 2001).

Apesar de *Salmonella* spp. requerer um pH neutro para sua sobrevivência e multiplicação, esta pode ser capaz de adquirir tolerância ao pH ácido, ativando vários genes para a produção de proteínas envolvidas na adaptação ao pH de 2-3,0 (FOSTER; 1993; BEARSON, et al. 1996; AUDIA; WEBB; FOSTER, 2001). Além de *Salmonella* spp., outras bactérias são conhecidas por conseguirem adquirir essa tolerância, tais como a *Listeria monocytogenes* (KROLL; PATCHETT, 1992; HILL et al., 1995; GAHAN; HILL,

1999) e *Escherichia coli* O157:H7 (GARREN; HARRISON; RUSSELL, 1997; BUCHANAN; EDELSON, 1999; LEENANON; DRAKE, 2001).

O início da resposta de tolerância ao ácido começa no ingluvío, onde a *Salmonella* spp. se adapta ao pH ácido, para depois seguir para o proventrículo, moela e intestino. (FOSTER, 1993; BEARSON, et al. 1996; AUDIA; WEBB; FOSTER, 2001)

Para avaliar a capacidade de tolerância de ST ao ácido, Álvarez-Ordóñez et al. (2008) analisaram a resposta *in vitro* da bactéria submetida a acidificação dos meios de cultura BHI (*Brain Heart Infusion*) ou ME (*Meat Extract*) por vários ácidos orgânicos (acético, láctico, ascórbico, cítrico e málico). Os resultados indicaram que os ácidos orgânicos testados não foram capazes de inibir o crescimento de ST cultivada no meio BHI ou ME.

A resposta de tolerância da bactéria ao ácido é dividida em dois estágios: o primeiro é denominado de choque pré-ácido e é ativado em pH=6, envolvendo os sistemas que alcalinizam o meio. O segundo estágio, chamado de choque pós-ácido, é acionado quando os valores de pH do meio atingem 4,5. Neste caso, proteínas são produzidas pela bactéria com o intuito de reparar ou evitar os danos causados pelo pH baixo. Três proteínas reguladoras foram identificadas (RpoS, Fur, PhoP). A RpoS é responsável pela resposta geral da célula bacteriana frente ao estresse, enquanto PhoP é necessária para a sobrevivência da bactéria nos macrófagos e proteção contra peptídeos antimicrobianos. Por outro lado, a Fur regula a assimilação de ferro pela célula bacteriana, quando há excesso de Fe^{2+} esta proteína reprime a expressão de genes regulados pelo ferro. Outros genes estão envolvidos na resposta de tolerância ácida, tais como o *polA* e o *ada*, necessários para o reparo do DNA e o gene *fabF* responsável pela síntese de ácidos graxos (FOSTER, 1993; BEARSON et al., 1996; AIDA; WEBB; FOSTER, 2001; BEALES, 2004).

Para que a resposta de tolerância bacteriana seja ativada, a diminuição do pH deve ser gradativa (BEARSON et al., 1996), tal como ocorre quando o ácido é suplementado na ração. No entanto, quando adicionado à água de bebida, o ácido promove uma diminuição brusca no pH do ingluvío impedindo a *Salmonella* spp. de acionar seus mecanismos de resposta ao pH ácido (BYRD et al., 2001).

Os melhores resultados obtidos no controle de *Salmonella* spp. com o uso de ácidos orgânicos foram observados com a utilização de uma mistura de vários ácidos orgânicos no mesmo tratamento, como observado nos estudos de Skånseng et al. (2010) e Wales et al. (2013). Essa associação de ácidos pode promover um sinergismo no efeito destes frente aos microrganismos. Contudo, uma associação de vários ácidos resulta em um produto com preço maior, o que pode ser um entrave para a sua utilização na avicultura comercial. Outro fator a ser analisado, é a solubilidade dos ácidos orgânicos em água. Quanto maior o tamanho da cadeia do ácido orgânico, menor será a sua solubilidade, portanto, ácidos orgânicos de cadeia longa não serão solúveis em água (DIBNER; BUTTIN, 2001).

O tratamento com ácido orgânico apenas, não é suficiente para se prevenir e controlar a disseminação de SE nas aves. É essencial que seja realizado um manejo adequado, respeitando as condições de biossegurança e legislação vigentes em cada país (VAN IMMERSEEL et al., 2005).

Em relação à avaliação sorológica, neste experimento foi utilizado um teste de ELISA disponível comercialmente para a detecção de anticorpos anti-*Salmonella* Enteritidis. O ELISA é um ensaio sorológico amplamente utilizado na avicultura industrial para monitorar o *status* sanitário das aves frente à *Salmonella* spp. e outros patógenos. É utilizado por ser de fácil execução e de resultados rápidos, no entanto, tem um custo elevado quando comparado com outros testes sorológicos, como a soroaglutinação, por exemplo.

O teste de ELISA utilizado no presente trabalho tem como base uma placa revestida com antígenos flagelares purificados de SE. No entanto, outros sorotipos de *Salmonella* podem possuir os mesmos epítomos flagelares, produzindo, portanto, resultados falso-positivos. Por esta razão é essencial que os resultados positivos no ELISA sejam confirmados por isolamento bacteriano (IDEXX, 2010).

A produção de anticorpos (IgG) nas aves tem sua produção máxima aos 14 dias de idade, sendo que ocorre uma diminuição gradativa da concentração de imunoglobulinas após esta idade (BARROW, et al., 1994; RATCLIFFE, 2008). Barrow et al. (1994) ressaltaram que anticorpos flagelares poderiam não permanecer na ave por longos períodos. No presente estudo a colheita de sangue para a realização do ELISA ocorreu aos 42 dias de idade da

ave e, com esta idade algumas aves poderiam não ter mais anticorpos detectáveis. Apesar disso, anticorpos foram detectados nas aves inoculadas do T1 e T2 e nas aves contactantes do T1 e T3 (Gráfico 3).

O uso do ácido fórmico, principalmente nas aves do T4, diminuiu a colonização por SE, pois esta não foi reisolada dos órgãos analisados. Tal fato pode também ter interferido na produção de imunoglobulinas, resultando em níveis não detectáveis pela técnica de ELISA. No T1, composto por aves que não receberam o aditivo, o percentual de aves sororeagentes foi superior a todos os grupos tratados com o ácido (Tabela 4). Neste caso, a colonização por SE não sofreu interferência do ácido e a produção de anticorpos foi detectada pelo *kit* comercial de ELISA utilizado.

Thons et al. (1996) analisaram três *kits* de ELISA para a detecção de SE. No primeiro teste, o antígeno era baseado na flagelina de SE, assim como o *kit* utilizado neste experimento. No segundo teste, o antígeno era baseado no LPS (lipopolissacarídeo) de SE e, no terceiro, o antígeno era baseado em uma fímbria de SE. Os autores infectaram um grupo de aves com SE, outro com ST e um terceiro grupo com *S. Panama*. Apenas o ELISA desenvolvido a partir do antígeno fimbrial foi capaz de diferenciar os três sorovares, detectando apenas SE. Os outros dois ELISAs detectaram além de SE, ST e *S. Panama*, produzindo, portanto, resultado falso-positivo para SE. Os autores sugeriram que a utilização de testes de ELISA baseados em antígenos flagelares e LPS para a detecção de SE deve ser reavaliada, visto que em seus resultados houve reação cruzada com outras salmonelas.

No nosso experimento foi possível observar que o ácido fórmico, principalmente quando administrado pela água, foi eficiente para controlar a disseminação de SE entre as aves. Com a restrição no uso de antibióticos na avicultura comercial é fundamental ter um produto para substituí-los e os ácidos orgânicos tem demonstrado bons resultados no controle da *Salmonella* spp. No entanto mais estudos, tanto em *in vivo* quanto *in vitro*, são necessários para se entender melhor os mecanismos de ação dos ácidos, as dosagens adequadas e também como controlar a resistência da *Salmonella* spp. aos ácidos orgânicos.

7 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nas condições experimentais utilizadas permitem a formulação das seguintes conclusões:

- O ácido fórmico apresentou melhor resultado na redução de SE quando administrado pela água de bebida (T4) quando comparado à administração por via ração, visto que foi eficiente tanto nas aves infectadas quanto nas contactantes. Mostrou-se capaz de proteger as aves contra SE reduzindo a disseminação sistêmica da bactéria, sendo eficaz principalmente na redução da colonização do ingluvírio no pré-abate.
- A transmissão horizontal entre aves inoculadas e contactantes foi evidenciada em todos os tratamentos, com a exceção do T3.
- Houve isolamento de SE na cama em todos os grupos testados, embora no T5 apenas nos dias 14 e 42.
- Embora tenham sido detectadas aves sororeagentes entre as inoculadas e contactantes, o ELISA não foi satisfatório como técnica de diagnóstico para a monitoria de SE no período pré-abate.

REFERÊNCIAS

ALVAREZ-ORDÓÑEZ, A.; FERNÁNDEZ, A.; BERNARDO, A.; LÓPEZ M. Comparison of acids on the induction of an acid tolerance response in *Salmonella typhimurium*, consequences for food safety. **Meat Science**, v. 81, p. 65-70, 2009.

AMITH-ROMACH, E.; SKLAN, D.; UNI, Z. Microflora ecology of the chicken intestine using 16S ribosomal DNA primers. **Poultry Science**, v. 83, p. 1093-1098, 2004.

ANDRADE, R. B.; GEMELLI, T.; DALL ONDER L. P.; CRISTINA, K.; BRITO, T.; BARBOZA, A. A. L.; BRITO, B. G. Métodos de diagnósticos para patógenos alimentares: *Campylobacter* sp., *Salmonella* sp. e *Listeria monocytogenes*. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 77, n. 4, p. 741-750, 2010.

ANDREATTI FILHO, R. Paratifo aviário. In: REVOLLEDO L.; FERREIRA, A.J.P. **Patologia Aviária**. São Paulo: Manole, 2008. p. 21-33.

ANDREATTI FILHO, R. L. Sorovares de *Salmonella* isolados de materiais avícolas no período de 1994 a 1999. **Revista de Educação Continuada**, v. 4, p. 90-101, 2001.

ARNOLD, M. E.; MARTELLI, F.; MCLAREN, I.; DAVIES, R. H. Estimation of the Rate of Egg Contamination from Salmonella-Infected Chickens, **Zoonosis and Public Health**, j. 61, n. 1, p. 18-27, 2013.

AUDIA, J. P.; WEBB. C. C.; FOSTER, J. W. Breaking through the acid barrier: an orchestrated response to proton stress by enteric bacteria. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 291, p. 97-106, 2001.

ÁVILA, L. A. F., NASCIMENTO, V. P., CANAL C. W., SALLE, C. T. P. MORAES, H. L. S. Effect of acidified drinking water on the recovery of *Salmonella* Enteritidis from broiler crops. **Brazilian Journal Poultry Science**, v. 5, n. 3, p. 183-188, 2003.

BARROW, P. A. ELISAs and the serological analysis of *Salmonella* infections in poultry: a review. **Epidemiology Infectious**, v. 109, p. 361-369, 1992.

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

BARROW, P. A. Serological diagnosis of *Salmonella* serotype *Enteritidis* & infections in poultry by ELISA and other tests. **International Journal of Food Microbiology**, v. 21, p. 55-68, 1994.

BASSAN, J. D.; FLORES, M. L.; ANTONIAZZI, T.; BIANCHI, E.; KUTTEL, J.; TRINDADE, M. M. Controle da infecção por *Salmonella* Enteritidis em frangos de corte com ácidos orgânicos e mananoligossacarídeo. **Ciência Rural**, v. 38, n. 7, p. 1961-1965, 2008.

BERCHIERI JR., A.; BARROW, P. A. Reduction in incidence of experimental fowl typhoid by incorporation of a commercial formic acid preparation into poultry feed. **Poultry Science**, v. 75, n. 4, p. 339-441, 1996.

BERGE, A. C.; WIERUP, M. Nutritional strategies to combat *Salmonella* in mono-gastric food animal production. **Animal**, j. 6, n. 4, p. 557-564, 2012.

BEARSON, S. M., BENJAMIN, W. H., Jr., SWORDS, W. E., FOSTER, J. W.: Acid shock induction of rpoS is mediated by the mouse virulence gene mviA of *Salmonella* typhimurium, **Journal Bacteriology**, v. 178, p. 2572–2579, 1996.

BORGES, K. A.; FURLAN, T. Q.; BORSOI, A.; MORAES, H. L. S.; SALLE, C. T. P.; NASCIMENTO, V. P. Detection of virulence-associated genes in *Salmonella* Enteritidis isolates from chicken in South of Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 12, p. 1416-1422, 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Programa Nacional de Sanidade Avícola. Atos Legais. Portaria Ministerial Nº 193/1994. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo**, Brasília - DF, 19 set 1994. Seção 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria SDA 8, de 23 de janeiro de 1995. **Método analítico de carcaça de aves e pesquisa de *Salmonella* 1995**. Disponível em: <<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis>>. Acesso em: 01 fev. 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria N° Portaria 193, 12 de maio de 1998. Proíbe o uso de Penicilina, tetraciclina, sulfonamidas sistêmicas como aditivos na alimentação animal. 1998. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/qualidade-dos-alimentos/aditivos-proibidos>>. Acesso em: 01 fev. 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa N° 62, de 26 de agosto de 2003. Oficializa os métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. **Diário Oficial da União**. Brasília - DF, 18 set. 2003. Seção 1, p. 14.

BRASIL. Presidência da República. Decreto nº 6296. Aprova o Regulamento da Lei nº 6.198, de 26 de dezembro de 1974, que dispõe sobre a inspeção e a fiscalização obrigatórias dos produtos destinados à alimentação animal, dá nova redação aos arts. 25 e 56 do Anexo ao Decreto nº 5.053, de 22 de abril de 2004, e dá outras providências. 11 de dezembro de 2007. 2007. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2007-2010/2007/Decreto/D6296.htm> Acesso em: 03 fev. 2023.

BOLDER, N. M.; JANS, L. L. G.; PUTIRULAN, F. F., WAGENAAR, J. A. Resistance of broiler outbred lines to infection with *Salmonella enteritidis*. **Avian Pathology**, v. 31, p. 581-587, 2002.

BRODDICKER, J. D.; KNOSP, B. M.; JONES, B. D. Transcription of the *Salmonella* Invasion Gene Activator, *hilA*, Requires HilD Activation in the Absence of Negative Regulators. **Journal of Bacteriology**, v. 185, n. 2. p. 525-533, 2003.

BYRD, J. A., HARGIS, B. M., CALDWELL, D. J., BAILEY, R. H., HERRON, K. L., MCREYNOLDS, J. L., BREWER, R. L., ANDERSON, R. C., BISCHOFF, K.

M., CALLAWAY, T. R., KUBENA L. F. Effect of lactic acid administration in the drinking water during pre laughter feed withdrawal on *Salmonella* and *Campylobacter* contamination of broilers. **Poultry Science**, v. 80 p. 278–283, 2001.

CARDOSO, B. Sorologia e Interpretação. In: REVOLLEDO L.; FERREIRA, A. J. P. **Patologia Aviária**. São Paulo: Manole, 2008. p. 421-448.

CENTER OF DISEASE CONTROL. ***Salmonella* surveillance**: annual summary, 2006. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, CDC, 2008, 101 p.

CENTER OF DISEASE CONTROL. **Investigation announcement: multistate outbreak of *Salmonella* Enteritidis infections linked to restaurant chain a**. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/salmonella/restaurant-enteritidis/index.html>>. Acesso: 26 mar, 2012.

CERQUETTI, M. C.; GHERARDI, M. M. Vaccination of chickens with a temperature-sensitive mutant of *Salmonella* enteritidis. **Vaccine**, v. 18, p. 1140–1145, 2000.

CHART, H., ROWE, B., BASKERVILLE, A., HUMPHREY, T. J. Serological response of chickens to *Salmonella* Enteritidis infection. **Epidemiology Infectious**, v. 104, p. 63-71, 1990.

CHAVEERACH, P.; KEUZENKAMP, D. A.; LIPMAN, L. J. A.; VAN KNAPEN, F. Effect of organic acids in drinking water for young broilers on *Campylobacter* Infection, volatile fatty acid production, gut microflora and histological cell changes. **Poultry Science**, n. 83, p. 330–334, 2004.

CHAVEERACH, P.; KEUZENKAMP, D. A.; URLINGS, H. A.; LIPMAN, L. J. A.; KNAPEN, F. *In vitro* study on the effect of organic acids on *Campylobacter jejuni/coli* populations in mixtures of water and feed. **Poultry Science**, v. 81, p. 621-628, 2002.

COMPANIES and MARKETS. **Feed acidifiers**: a global strategic business report. Ban on animal feed antibiotics throws spotlight on feed acidifiers. London, United Kingdom, 2012. Disponível em: <<http://www.companiesandmarkets.com/Market/Chemicals/Market-Research/Feed-Acidifiers-A-Global-Strategic-Business>>. Acesso em: 25 mar. 2014.

COOPER, G. L.; NICHOLAS, R. A.; BRACEWELL, C. D. Serological and bacteriological investigations of chickens from flocks naturally infected with *Salmonella* Enteritidis. **Veterinary Record**, v. 125, p. 567-572, 1989.

CORREA, W. M.; CORREA, C. M. Paratífos em geral. In: CORREA, W. M.; CORREA, C. M. **Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos**. 2 ed. Rio de Janeiro: MEDSI 1992. p. 167-174.

COSTA, R. G.; FESTIVO, M. L.; ARAUJO, M. S.; REIS, E. M.; LÁZARO, N. S.; RODRIGUES, D. P. Antimicrobial susceptibility and serovars of *Salmonella* circulating in commercial poultry carcasses and poultry products in Brazil. **Journal of Food Protection**, v. 76, n. 12, p. 2011-2017, 2013.

DDTHA/CVE. ***Salmonella* Enteritidis - Uma importante causa de surtos bacterianos veiculados por alimentos e a necessidade de uma nova regulamentação sanitária para os alimentos implicados, São Paulo, Brasil, 1999-2003**. São Paulo: Divisão de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar (DDTHA), Centro de Vigilância Epidemiológica (CVE), Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, 2004. Disponível em: <http://www.cve.saude.sp.gov.br/agencia/bepa8_salmo9903.html>. Acesso em: 24 mar. 2014.

DIBNER, J. J.; BUTTIN, P. Use of organic acids as a model to study the impact of gut microflora on nutrition and metabolism. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 11, p. 453-463, 2002.

DIBNER, J. J.; RICHARDS, J. D. Antibiotic growth promoters in agriculture: History and mode of action. **Poultry Science**, n. 84, p. 634-643, 2005.

FERNANDES, S. A.; TAVECHIO, A. T.; GHILARDI, A. C. R.; DIAS, A. M. G.; ALMEIDA, I. A. Z. C.; MELO, L. C. V. *Salmonella* serovars isolated from

humans in São Paulo State, Brazil, 1996-2003. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 48, n. 4, p. 179-184, 2006.

FERREIRA, A. J. P.; ITO, N. M. K.; BENEZ, S. M. Infecção natural e experimental por *Salmonella* Enteritidis em pintos. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 1990, Campinas. **Anais...** Campinas, SP: APINCO, 1990. p. 171.

FREITAS, C.G. **Adaptação da técnica de PCR múltipla para a detecção de *Salmonella* sp. e dos sorotipos Typhi, Enteritidis e Typhimurium em carcaças e miúdos resfriados de aves comercializados no Distrito Federal.** 2008, 65 p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Saúde Animal, Universidade de Brasília. 2008.

FREITAS NETO, O. C.; MESQUITA, A. L.; PAIVA, J. B.; ZOTESSO, F.; BERCHIERI JR., A. Control of *Salmonella* enterica serovar Enteritidis in laying hens by inactivated *Salmonella* Enteritidis vaccines. **Brazilian Journal Microbiology**, v. 39, n. 2, p. 390-396, 2008.

FORD, D. J. The effect of the microflora on gastrointestinal pH in the chick. **British Poultry Science**, v. 15, p. 131-140, 1974.

FOSTER, J. W. The acid tolerance response of *Salmonella* typhimurium involves transient synthesis of key acid shock proteins. **Journal Bacteriology**, v. 175, p. 1981-1987, 1993.

GALANIS, E.; WONG, D. M. L. F.; PATRICK, M. E.; BINSZTEIN, N.; CIESLIK, A.; CHALERMCHIKIT, T.; AIDARA-KANE, E.; ELLIS, A.; ANGULO, F. J.; WEGENER, H. C. Web-based surveillance and global *Salmonella* distribution, 2000–2002. **Emerging Infectious Diseases**, v. 3, n. 12, p. 381–388, 2006.

GAMA, N. M. S. Q. ***Salmonella* spp em aves de postura comercial.** 2001. 57 p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, São Paulo. 2001.

GANTOIS, I.; DUCATELLE, R.; PASMANS F.; HAESEBROUCK, F.; GAST, R.; HUMPHREY, T. J.; IMMERSELL, F. V. Mechanisms of egg contamination by *Salmonella* Enteritidis. **FEMS Microbiology Reviews**, n. 33, p. 718-738. 2009.

GANTOIS, I.; DUCATELLE, R.; PASMANS, F.; HAESEBROUCK, F.; HAUTEFORT, I.; THOMPSON, A.; HINTON, J. C.; VAN IMMERSEEL, F. Butyrate specifically down-regulates *Salmonella* pathogenicity island I gene expression. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, p. 946-949, 2006.

GAST, R.K. *Salmonella* infections. In: SAIF, Y. M. **Diseases of Poultry**. 12 ed. Ames, Iowa, Blackwell Publishing 2008. p.619-689.

GAST, R .K.; HOLT, P. S. Assessing the frequency and consequences of *Salmonella* Enteritidis deposition on the egg yolk membrane. **Poultry Science**, v. 80, p. 997-1002. 2001.

GINOCCHIO, C.; PLACE, J.; GALAN, J. E. Identification molecular characterization of *Salmonella* typhimurium gene involved triggering the internalization of salmonellae in cultured epithelial cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America**, v. 89, p. 5976–5980, 1992.

GRAVE, K.; KALDHUSDAL, M.; KRUSE, H.; FEVANGHARR, L. M.; LATLANDSMO, K. What has happened in Norway after the ban of Avoparcin? Consumption of antimicrobials by poultry. **Preventive Veterinary Medicine**, n. 62, p. 59-72, 2007.

GROISMAN, E. A., OCHMAN, H. Pathogenicity islands: bacterial evolution in quantum leaps. **Cell**, v. 87, n. 5, p. 791-794, 1996.

GUARD-PETTERL, J. The chicken, the egg and *Salmonella* Enteritidis. **Environmental Microbiology**, v. 3, p. 421-430. 2001.

HARA-KAONGA, B.; PISTOLE, T. G. OmpD but not OmpC is involved in adherence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium to human cells. **Canadian Journal Microbiology**, v. 50, p. 719–727, 2004.

HEMSEL, M. Evolution of pathogenicity islands of *Salmonella enterica*. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 294, p. 95-102, 2004.

HOFER, E.; REIS, E. M. F. *Salmonella* serovars in food poisoning episodes recorded in Brazil from 1982 to 1991. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 36, n. 1, p. 7-9, 1994.

HOFER, E.; SILVA FILHO, S. J.; REIS, E. M. F. Prevalência de sorovares de *Salmonella* isolados de aves no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 17, n. 2, p. 55-62, 1997.

HOFER, E.; SILVA FILHO, S. J.; REIS, E. M. F. Sorovares de *Salmonella* isolados de matérias-primas e de ração para aves no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 18, n. 1, p. 21-27, 1998.

HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 9 ed. Baltimore, Maryland: Williams and Wilkins, 1994. 787 p.

HOLT, J. G.; MACRI, N. P.; PORTER, R. E. Microbiological analysis of the early *Salmonella* Enteritidis infection in molted and unmolted hens. **Avian Diseases**, v. 39, p. 55-63, 1995.

HUMPHREY, T. J. Public health implications of the infection of egg-laying hens with *Salmonella* Enteritidis phage type 4. **World's Poultry Science Journal**, v. 46, p. 5-13, 1990.

HUMPHREY, T. J., BASKERVILLE, A., CHART, H., ROWE, B. Infection of egg-laying hens with *Salmonella* Enteritidis PT4 by oral inoculation. **Veterinary Record**, v. 125, p. 531-532, 1989.

JIANGGRANG L.; IDRIS, U.; MAURER, J. J.; HARMON, B.; LEE, M. D.; HOFRACRE, C. Diversity and susseccion of the intestinal bacterial community of the maturing broiler chicken. **Applied and Environmental of Microbiology**, v. 69, n. 11, p. 6816-6824, 2003.

KAKU, M.; PERESI, J. T. M.; TAVECHIO, A. T.; FERNANDES, S. A.; BATISTA, A. B.; CASTANHEIRA, I. A. Z.; GARCIA, G. M. P.; IRINO, K.; GELLI, D. S. Surto alimentar por *Salmonella* Enteritidis no Noroeste do Estado de São Paulo, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 29, p. 127-1231, 1995.

KAUFMANN, S. H. E.; RAUPACH, B.; FINLAY, B. B. Introduction: microbiology and immunology: lessons learned from *Salmonella*. **Microbes and Infection**, v. 3, n. 14 e 15, p. 1177-1181, 2001.

KIM, C. J.; NAGARAJA, K. V.; POMEROY, B. S. Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Salmonella* Enteritidis infection in chickens. **American Journal Veterinary Research**, v. 52, p. 1069-1074, 1991.

KOLLANOOR-JOHNYY, A.; MATTSON, T.; BASKARAN, S. A.; AMARALADJOU, M.A.R.; HOAGLAND, T. A.; DARRE, M. J.; KHAN, M.I.; SCHREIBER, D. T.; DONOGHUE, A. M.; VENKITANARAYANAN, K. Caprylic acid reduces *Salmonella* Enteritidis populations in various segments of digestive tract and internal organs of 3- and 6-week-old broiler chickens, therapeutically. **Poultry Science**, v. 7, n. 91, p. 1686-1694, 2012.

LATASA, C.; ROUX, A.; TOLEDO-ARANA, A. GHIGO, J. M.; GAMAZO, C.; PENADES, J. R.; LASA, I. BapA, a large secreted protein required for biofilm formation and host colonization of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. **Molecular Microbiology**, v.58, p. 1322–1339, 2005.

LAWHON, S. D.; MAURER, R.; SUYEMOTO, M.; ALTIER, C. Intestinal short-chain fatty acids alter *Salmonella* Typhimurium invasion gene expression and virulence through BarA/SirA. **Molecular Microbiology**, v. 46, p. 1451-1464, 2002.

LEFFER, A. M.; KUTTEL, J.; MARTINS, L. M.; PEDROSO, A. C.; ASTOLFI-FERREIRA, C. S.; FERREIRA, F.; FERREIRA, A. J. P. Vectorial competence of

larvae and adults of *Alphitobius diaperinus* in the transmission of *Salmonella* Enteritidis in poultry. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 10, n. 5, p. 481-487, 2010.

MALDONADO, A. G. **Ocorrência de *Salmonella* spp em amostras de carcaças e miúdos de frango obtidas em uma feira e um mercado municipal na zona oeste da cidade de São Paulo: análise crítica entre a técnica convencional em meios de cultivo e reação em cadeia pela polimerase – PCR.** 2008. 74 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

MALHEIROS, P. S., PAULA, C. M. D., TONDO, E. C. Cinética de crescimento de *Salmonella* Enteritidis envolvida em surtos alimentares no RS: uma comparação com linhagens de outros sorovares. **Ciência e Tecnologia Alimentar**, v. 27, n. 4, p. 751-755, 2007.

MANI-LÓPEZ, E. M.; GARCÍA, H. S.; LÓPEZ, A. Organic acids as antimicrobials to control *Salmonella* in meat and poultry products. **Food Research International**, v. 45 p. 713-721, 2012.

MARTINS, C. H. G.; SANTOS, V. R.; CASTRO, F. A.; FERNANDES, S. A.; MARTINEZ, R. Ribotyping of *Salmonella* Enteritidis strains reveals the spread of a single genotype in the Brazilian city of Ribeirão Preto. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 42, n. 1, p. 19-23, 2006.

MENDES, A. A. Jejum pré-abate em frangos de corte. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 3, p. 199-209, 2001.

MINGA, U., WRAY, C. Serological tests for *Salmonella* Enteritidis in chickens. **Veterinary Record**, v. 126, p. 20-21, 1990.

MOTA, C. C. S.; VIEIRA, H. R. A.; PUZYNA, I. P.; KALACHE, J.; KONOLSAISEN, J. F.; CAMARGO, N. J. Toxi-infecção alimentar por *Salmonella* Enteritidis: relato de um surto ocorrido em Curitiba-PR, Brasil. **Higiene Alimentar**, v. 2, p. 123-31, 1983.

NAKAMURA, M.; NAGAMINE, N.; TAKAHASHI, T.; SUZUKI, S.; KIJIMA, M.; TAMURA, Y.; SATO, S. Horizontal transmission of *Salmonella* Enteritidis and effect of stress on shedding in laying hens. **Avian Diseases**, v. 38, p. 282-288, 1994.

NICHOLAS, R. A. J.; CULLEN, G. A. Development and application of an ELISA for detecting antibodies to *Salmonella* Enteritidis in chicken flocks. **Veterinary Record**, v. 128, p. 74-76, 1991.

OCHMAN, H., LAWRENCE, J. G., GROISMAN, E. A. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. **Nature**, v. 405, n. 6784, p. 299-304, 2000.

OLIVEIRA, G.H. OLIVEIRA, G. H.; BERCHIERI JR, A.; MONTASSIER, H. J.; FERNANDES, A. C. Assessment of serological response of chickens to *Salmonella* Gallinarum and *Salmonella* Pullorum by ELISA. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 6, n. 2, p. 111-115, 2004.

OLIVEIRA, G. H.; BERCHIERI JR, A.; MONTASSIER, H. J. Chicken serologic response to *Salmonella* enterica serotype Typhimurium assessed by ELISA. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 8, n. 1, p. 51-54, 2006.

OMWHANDO, C. O. A., KUBOTA, T. *Salmonella enterica* serovar Enteritidis: a Mini-review of Contamination Routes and Limitations to Effective Control **JARQ**, v. 44, p. 7-10, 2010.

PARTANEN, K. H.; MROZ, Z. Organic acids for performance enhancement in pig diets. **Nutrition Research Review**, v. 12, p. 117-145, 1999.

PERESI, J. T. M.; ALMEIDA, I. A. Z. C.; LIMA, S. I.; MARQUES, D. F.; RODRIGUES, E. C. A.; FERNANDES, S. A.; GELLI, D. S.; IRINO, K. Surtos de enfermidades transmitidas por alimentos causados por *Salmonella* Enteritidis. **Revista de Saúde Pública**, v. 32, n. 5, p. 477-483, 1998.

PULIDO-LANDÍNEZ, M.; SÁNCHEZ-INGUNZA, R.; GUARD, J.; PINHEIRO DO NASCIMENTO, V. Assignment of serotype to *Salmonella* enterica isolates

obtained from poultry and their environment in southern Brazil. **Letters in Applied Microbiology**, v. 57, n. 4, p. 288-294, 2013.

REVOLLEDO, L.; FERREIRA, A. J. P. Current perspectives in avian salmonellosis: Vaccines and immune mechanisms of protection. **The Journal of Applied Poultry Research**, v. 21 p. 418–431, 2012

REVOLLEDO, L.; FERREIRA, A. J. P., MEAD, G. Prospects in *Salmonella* control: competitive exclusion, probiotics, and enhancement of avian intestinal immunity. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 15, p. 341–351, 2006.

RICKE, S. C. Perspectives on the use of organic acids and short chain fatty acids as antimicrobials. **Poultry Science**, v. 82, p. 632-639, 2003a.

RICKE, S. C. The gastrointestinal tract ecology of *Salmonella* Enteritidis colonization in molting hens. **Poultry Science**, v. 82, p. 1003-1007, 2003b.

SAKATA, T. Stimulatory effect short-chain fatty acids in epithelial cell proliferation in the rat intestine: a possible explanation for trophic effects fermentable fiber, gut microbes and luminal trophic factor. **British Journal of Nutrition**, v. 58, n. 95, p. 95-103, 1987.

SALAZAR, P. C. R.; ALBUQUERQUE, R.; TAKEARA, P.; TRINDADE M. A.; ARAÚJO, L. R. Efeito dos ácidos láctico e butírico, isolados e associados, sobre o desempenho e morfometria intestinal de frangos de corte. **Brazilian Journal Veterinary Research**, v. 45, n. 6, p. 463-471, 2008.

SANTOS, D. M. S.; BERCHIERI JR., A.; FERNANDES, S. A.; TAVECHIO, A. T.; AMARAL, L. A. *Salmonella* em carcaças de frango congeladas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 20, n. 1, p. 39-42, 2000.

SANTOS, L. R.; NASCIMENTO, V. P.; OLIVEIRA, S. D.; RODRIGUES, D. P.; REIS, E. M. F.; SEKI, L. M.; RIBEIRO, A. R.; FERNANDES, S. A. Phage types of *Salmonella* Enteritidis isolated from clinical and food samples, and from broiler carcasses in Southern Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 45, n. 1, p. 01-04, 2003.

SILVA, E. N.; DUARTE, A. *Salmonella* Enteritidis em aves: Retrospectiva no Brasil. **Brazilian Journal Poultry Science**, j. 4, n. 2, p. 85-100. 2002

SILVA, L. C. C. Avaliação de um ácido orgânico como agente inibidor do crescimento de *Salmonella* sp em rações de aves. **Brazilian Journal of Poultry Science**, n.7, p.219, 2005.

SILVEIRA, L.; MARQUES., A.; MACHADO, J. Infecção por *Salmonella* entérica no período entre 2000-2012. Laboratório Nacional de Referência de Infecções Gastrointestinais. Departamento de Doenças Infecciosas. **Boletim Epidemiológico**: Artigos breves n. 6, p. 14-16, 2013.

SKÅNSENG B.; KALDHUSDAL M.; GJEVRE, A. G.; JOHANNESSEN G. S.; SEKELJA, M.; TROSVIK, P.; RUDI, K. Prevention of intestinal *Campylobacter jejuni* colonization in broilers by combinations of in-feed organic acids. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, p. 1265-1273, 2010.

SOUSA, M.A.B.; MENDES, E. N.; PENNA, F. J.; PÉRET-FILHO, L. A.; MAGALHÃES, P. P. Acute diarrhea associated with *Salmonella* enteric in Belo Horizonte-MG: prevalence and characterization of isolates. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 49, n. 1, p. 34-38. 2013.

STERZO, E. V.; PAIVA, J. B.; MESQUITA, A. L.; FREITAS NETO O. C.; BERCHIERI JR. A. Organic acids and/or compound with defined microorganisms to control *Salmonella enteric* serovar Enteritidis experimental infection in chickens. **Brazilian Journal Poultry Science**, v. 9, n. 1 p. 69-73, 2007.

STRALFORD, M.; PLUMRIDGE, A.; NEBEVON-CARON, G.; ARCHER, D. B. Inhibition of spoilage mould condia by acetic acid and sorbic acids involves different moldes of action, requiring modification the classic weak acid theory. **International Journal Food of Microbiology**, v. 136, p. 37-43, 2009.

SUZUKI, S. Pathogenicity of *Salmonella* Enteritidis in poultry. **International Journal of Food Microbiology** v. 21, p. 89-105. 1994.

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**, v. 38, p. 119-129, 1996.

TAVECHIO, A. T.; FERNANDES, S. A.; NEVES, B. C.; DIAS, A. M. G.; IRINO, K. Changing patterns of *Salmonella* serovars: increase of *Salmonella* Enteritidis in São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 38, p. 315-322, 1996.

TAYEB, I. T.; NEHME, P.; JABER, L.; BARBOUR, E. K. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for quantification of *Salmonella* Enteritidis-specific antibodies in egg yolk. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 8, n. 4, p. 257-263, 2006.

THORNS, C. J.; BELL, M.M., SOJKA, G. M., NICHOLAS, R.; Development and Application of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Specific Detection of *Salmonella enteritidis* Infections in Chickens Based on Antibodies to SEF14 Fimbrial Antigen. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 4, p. 792–797, 1996.

TIMONEY, J. F., SIKORA, N.; SHIVAPRASAD, H. L.; OPITZ, M. Detection of antibody to *Salmonella* Enteritidis by a gm flagellin-based ELISA. **Veterinary Record**, v. 127, p. 168-169, 1990.

UBABEF. **Relatório Anual 2014**. Disponível em: <<http://www.ubabef.com.br/files/publicacoes/8ca705e70f0cb110ae3aed67d29c8842>>. MERSEEL, F.; FIEVES, V.; BUCK, J.; PASMANS, F.; MARTEL, A.; HAESEBROUCK, F.; DUCATELLE, R. Microencapsulated short-chain fatty acids in feed modify colonization and invasion early after infection with *Salmonella* Enteritidis in young chickens. **Poultry Science**, v. 83, p. 69-74, 2004.

VAN IMMERSEEL, F.; METHNER, U.; RYCHLIK, B.; NAGY, P.; VELGE, P.; MARTIN, G.; FOSTER, N. ; DUCATELLE, R.; BARROW, P. A. Vaccination and early protection against non-host-specific *Salmonella* serotypes in poultry:

exploitation of innate. **Immunity and Microbial Activity**, v. 133, n. 6, p. 959-978, 2005.

VAN IMMERSEEL, F.; RUSSELL, J. B.; FLYTHE, M. D.; GANTOIS, I.; TIMBERMONT, L.; PASMANS, F.; HAESEBROUCK, F.; DUCATELLE, R. The use of organic acids to combat *Salmonella* in poultry: a mechanistic explanation of the efficacy. **Avian Pathology**, v. 35, n. 3, p. 182-188, 2006.

VANDEPLAS, S.; DUBOIS D. R.; BECKERS, Y.; THONART, P.; THEWIS, A. *Salmonella* in chicken: current and developing strategies to reduce contamination at farm level. **Journal of Food Protection**, v. 73, n. 4, p. 774-785, 2010.

VELGE, P.; WIEDEMANN, A.; ROSSELIN, M.; ABED, N.; BOUMART, Z.; CHAUSSÉ, A. M.; GRÉPINET, O.; NAMDARI, F.; ROCHE, S. M.; ROSSIGNOL, A.; VIRLOGEUX-PAYANT, I. Multiplicity of *Salmonella* entry mechanisms, a new paradigm for *Salmonella* pathogenesis. **Microbiology Open**, v. 1, n. 3, p. 243-258, 2012.

VIOLA, E. S.; VIEIRA, S. L.; TORRES, C. A.; FREITAS, D. M.; BERRES, J. Desempenho de frangos de corte sob suplementação com ácidos láctico, fórmico, acético e fosfórico no alimento ou na água. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, n. 2, p. 296-302, 2008.

WALES, A. D., ALLEN, V. M., DAVIES, R. H. Chemical treatment of animal feed and water for the control of *Salmonella*. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 7, p. 3-15, 2010.

ZANCAN, F. T., BERCHIERI JR., A.; FERNANDES, S. A., GAMA, N. M. S. Q. *Salmonella* spp. investigation in transport boxes of day-old birds. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, p. 230-232, 2000.