



Número mais provável (NMP) de *Salmonella* sp. em cecos de frangos de corte e correlação com a população linfocitária bursal*

Most probable number (MPN) of *Salmonella* sp. from ceca of broilers and bursal lymphocytary population

Vanessa Rodrigues Vieira¹, Vladimir Pinheiro do Nascimento¹,
Anderlise Borsoi¹ & Luciana Ruschel dos Santos²

RESUMO

A contaminação de produtos avícolas por *Salmonella* tem sido um real desafio à avicultura desde o reconhecimento da carne de frango e ovos como importantes fontes de transmissão de salmonelas para humanos. O estado imune das aves tem um papel crítico na defesa contra diferentes patógenos. Lotes de aves com imunossupressão sofrem aumento da incidência de infecções secundárias e têm seu desempenho afetado negativamente. Entre os patógenos virais aviários que têm capacidade imunossupressora encontra-se o vírus da doença infecciosa da bursa ou doença de Gumboro. Neste estudo, avaliou-se a população linfocitária bursal através de exame histopatológico e a contagem de *Salmonella* em cecos de frango de corte através do método do número mais provável (NMP) buscando-se correlacionar estes fatores. Foram coletados os cecos e as bolsas de Fabricius (BF) de 347 frangos de corte com 28 dias de idade. Os cecos foram congelados e analisados pela microbiologia convencional para determinar a presença ou ausência de *Salmonella* sp e as amostras positivas submetidas à técnica de contagem pelo NMP. Foram identificadas duas amostras positivas (0,58%) para *Salmonella* Enteritidis e estas apresentaram 0 e 21 NMP/g, enquanto os cecos correspondentes apresentaram entre 60-70% de depleção linfocitária. Outros gêneros bacterianos identificados foram *Providencia rettgeri*, *Proteus mirabilis* e *E. coli*. Os escores histopatológicos evidenciaram depleção linfocitária moderada a severa nas bursas, porém o isolamento de *Salmonella* Enteritidis em duas amostras não possibilitou maiores inferências a respeito do envolvimento da Doença de Gumboro quanto à persistência de salmonelas no ceco das aves analisadas, sob a presente metodologia.

Descritores: *Salmonella*, doença de Gumboro, frangos de corte, bolsa de Fabricius, cecos.

ABSTRACT

Salmonella in poultry products has been a real threat to poultry industry since the meat and eggs were implicated in salmonella transmission to humans. The immune status play an important role on poultry host defense against pathogens. The increase in bacterial infections susceptibility and poor poultry flock development appears when birds immunosuppression were present. Infectious Bursal disease virus or Gumboro disease remains important immunosuppressive agent on poultry flocks. In this study, we analyze the lymphocytary bursal population and, at the same time, the *Salmonella* presence and quantification on ceca by the most probable number method (MPN). Three hundred and forty seven 28 days old broilers were selected to collect the ceca and bursa. The bursal damage was examined by histopathologic method and the ceca analyzed by conventional microbiology. The positive samples were quantified by MPN method. Two *Salmonella* Enteritidis positive ceca samples (0,58%) were obtained in this study, corresponding from 60 to 70% of lymphocytary depletion and 0 and 21 MPN/g. Also, we found *Providencia rettgeri*, *Proteus mirabilis* and *E. coli* on ceca samples in this work. The bursal lesion scores showed moderate to severe lymphocytary depletion, however, the small *Salmonella* isolation in this study cannot provide data to analyze Gumboro disease and *Salmonella* persistence on ceca correlation.

Keywords: *Salmonella*, doença de Gumboro, broiler, bursa, ceca.

*Trabalho originado da Dissertação de Mestrado do primeiro autor. Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias (PGCV-UFRGS).

¹Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária. Faculdade de Veterinária. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. UFRGS. Porto Alegre, RS. ²Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária. Universidade de Passo Fundo. FAMV – UPF. Passo Fundo, RS. CORRESPONDÊNCIA: [luruschel@upf.br ; Fax: (54) 3316 8485].

INTRODUÇÃO

O estado imune tem um papel crítico na defesa das aves e diversos patógenos imunossupressores são freqüentemente endêmicos em regiões de produção avícola. Lotes de aves com imunossupressão sofrem aumento da incidência de infecções secundárias e têm seu desempenho afetado negativamente. Entre os patógenos virais aviários com capacidade imunossupressora destacam-se os vírus da doença de Gumboro (DG), da anemia das galinhas (CAV), doença de Marek e o reovírus. O vírus da DG foi o mais estudado e seu efeito imunossupressor deve-se ao comprometimento das respostas imune humoral e celular [25]. O vírus tem como alvo o tecido linfóide, principalmente os linfócitos B produtores de IgM, sendo a Bursa de Fabricius (BF) o órgão mais severamente afetado [18]. Aves imunodeprimidas pelo vírus da DG podem apresentar aumento na susceptibilidade a outras infecções, incluindo-se a dermatite gangrenosa, hepatite por corpúsculo de inclusão e infecções por bactérias, tais como *Escherichia coli* e *Salmonella* Typhimurium [1,2,12,13,15,21]. A relativa contribuição da imunossupressão humoral para a infecção por *Salmonella* não está claramente definida [3]. Assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a população linfocitária bursal de frangos de corte e correlacioná-la com a presença e a contagem de *Salmonella* sp. (método do número mais provável – NMP) em cecos de aves.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram selecionados 18 lotes de frangos de corte com 28 dias de idade e destes, 347 aves necropsiadas, das quais foram retiradas as bolsas de Fabricius (BFs) e cecos. No 1º dia de idade as aves receberam vacinas para doença de Marek, bronquite infecciosa e boubá aviária. Nos dias 7, 14 e 21 foram vacinadas via oral para doença de Gumboro (cepa intermediária). As Bolsas de Fabricius (BFs) foram submetidas a bursometria, pesagem e fixação em formalina tamponada 10% para análise histológica. Após a fixação, as BFs foram clivadas transversalmente na região mediana para preservar as pregas bursais. Uma fatia obtida de cada BF foi desidratada, clarificada e impregnada em parafina, seccionada a 5mm e corada pelo método de hematoxilina e eosina (19). Para interpretação dos resultados, utilizou-se o critério de escore histopatológico de BF segundo Muskett et al. [20] adaptado por Pereira [23], variando de 0 a 5, onde o escore acima de 3 (mais de 69% de depleção linfóide) pode ser significativo de

desafio pelo vírus da Doença de Gumboro. Os cecos foram coletados de forma pareada, armazenados em frascos plásticos e congelados a -20°C , sendo posteriormente analisados conforme a técnica microbiológica convencional para determinação de *Salmonella* sp. [5]. As amostras de cecos positivas foram submetidas à contagem de *Salmonella* pela metodologia do NMP modificada [11]. De cada ceco foram pesados 5g de conteúdo e adicionados 45 mL de solução de tampão fosfato (PBS) e as amostras homogeneizadas por 1 minuto. Uma alíquota de 25 ml desta mistura foi retirada e adicionada à 225 mL de água peptonada tamponada (AP) 1%, sendo então novamente homogeneizada por 1 minuto. Após, realizou-se diluições onde foram utilizadas séries de 9 tubos para cada amostra. Em 3 tubos distribuiu-se 50 mL da mistura (conteúdo cecal e água peptonada tamponada 1%), outros 3 tubos receberam 5 mL da amostra e os últimos 3 tubos 0,5 mL da amostra. As três séries de 3 tubos por amostra foram incubadas a 37°C por 24h. Subseqüentemente, 0,1 mL de cada tubo foi repassado para outros nove tubos com caldo seletivo Rappaport Vassiliadis (RV) e 1ml para mais nove tubos com caldo seletivo Tetracionato (TT) ambos incubados à 42°C por 24h. As culturas dos caldos RV e TT foram estriadas em ágar verde brilhante com novobiocina (BGN) e ágar Rambach e incubadas por 24h à 37°C . Foram consideradas positivas as placas que apresentaram colônias compatíveis com *Salmonella* sp. Estas colônias foram submetidas a testes bioquímicos e sorotipagem para confirmação do resultado. Os resultados de positividade nas placas foram transportados para as tabelas a fim de obter-se o NMP para cada amostra [8]. A identificação final das amostras foi realizada no Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro (FIOCRUZ).

RESULTADOS

Dentre as 347 amostras de cecos de frangos de corte analisadas, duas amostras (0,58%) foram positivas para *Salmonella* Enteritidis, sendo possível obtenção do NMP em apenas uma das amostras (21 NMP/g). Foram obtidos 40 isolados de bactérias compatíveis com *Salmonella* sp. em meio seletivo ágar Rambach e ágar BGN, mas posteriormente caracterizadas como *Providencia rettgeri*, *Echerichia coli* (lactose negativa), *Proteus mirabilis* e *Echerichia coli*. Na Tabela 1 estão descritos os resultados histopatológicos (percentagem de depleção linfocitária e escores) e bacteriológico das 40 amostras compatíveis com *Salmonella* sp. encontradas neste estudo.

DISCUSSÃO

No que se refere ao isolamento de salmonelas a partir de cecos, alguns fatores podem interferir nos resultados, como sorovares que apresentam uma fase estacionária adaptativa, mostrando menor crescimento celular e aumentando a termotolerância quando na presença de bactérias competidoras [10,26]. Os microrganismos mantidos em temperaturas de congelamento ou mesmo temperaturas inferiores à sua faixa ótima de crescimento poderiam ser considerados dormentes e, conseqüentemente, não teriam atividade metabólica aparente [22]. Do mesmo modo que o congelamento é prejudicial à integridade da célula bacteriana, o descongelamento sucessivo também atua nas bactérias ao inativar os envoltórios celulares [17]. Os tratamentos térmicos aplicados sobre os microrganismos afetam a viabilidade e sobrevivência das células com injúrias sub-letais em diferentes extensões. Os danos

estruturais decorrentes do estresse térmico, especialmente quanto às barreiras de permeabilidade, podem impossibilitar a formação de colônias pelas células bacterianas. Em salmonelas, o tamanho das cadeias de lipopolissacarídeos parece ter papel na proteção da membrana externa das mesmas, afetando a sensibilidade aos efeitos de aquecimento e congelamento [4].

Além da interferência de temperatura e da presença de flora acompanhante nas amostras de cecos para o isolamento de salmonelas utilizadas no presente trabalho, alguns autores afirmam que a presença do vírus da Doença de Gumboro (DG) resulta em alta excreção de salmonelas nas fezes, mas sem aumento do nível de bactérias nos cecos até seis semanas pós infecção viral [2,3,7,9]. Seqüencialmente, após seis semanas de infecção pelo vírus da DG, altos níveis de salmonelas em cecos e aumento da persistência da bactéria em vários órgãos foram encontrados, confirmando a persistência da infecção prévia por salmonela [3,14].

Tabela 1. Dados histológicos das bolsas de Fabricius e bactérias compatíveis com *Salmonella* sp. isoladas de cecos de frangos de corte.

Nº/40	% Depleção linfocitária	Escore histopatológico	Tipificação
1	<25	2	<i>E. coli</i> (lac. neg)
2	>25	2	<i>E. coli</i> (lac. neg.)
1	30	2	<i>E. coli</i> (lac. neg)
1	30-40	2	<i>E. coli</i> (lac. neg)
1	30-40	2	<i>E. coli</i>
1	40-50	2	<i>P. rettgeri</i>
2	50-60	2	<i>P. mirabilis</i>
1	50-60	3	<i>P. mirabilis</i>
4	50-60	3	<i>E. coli</i> (lac. neg)
1	60	3	<i>E. coli</i>
10	60-70	3	<i>E. coli</i> (lac. neg.)
3	60-70	3	<i>P. mirabilis</i>
1	60-70	3	<i>P. rettgeri</i>
2	60-70	3	<i>S. Enteritidis</i>
4	70-80	4	<i>P. mirabilis</i>
3	70-80	4	<i>E. coli</i> (lac. neg)
1	70-80	4	<i>P. rettgeri</i>
1	70-80	4	<i>E. coli</i>

O exame histopatológico é uma ferramenta importante para classificação da severidade das lesões da bolsa de Fabricius (BF), sendo que tal classificação é feita através de escores que variam de um a cinco [20], ou através da estimativa da percentagem da depleção linfocitária bursal, que pode variar de zero até 100%. Nos três escores de lesões de bolsa de Fabricius encontrados neste trabalho, as bactérias *Providencia rettgeri*, *Echerichia coli* (lactose negativa), *Proteus mirabilis* e *Echerichia coli* foram encontradas nos cecos das respectivas aves. As amostras positivas para *Salmonella* Enteritidis correlacionaram-se com depleção linfocitária nas bursas de 60 a 70%, convertendo em escore histopatológico 3, não significativo de desafio pelo vírus da Doença de Gumboro de acordo com a classificação adotada. A bolsa de Fabricius é indispensável ao desenvolvimento e funcionamento do tecido linfóide periférico e à competência para manutenção da imunidade humoral. Alguns fatores estressantes, infecciosos ou não, podem causar depleção de linfócitos imaturos, principalmente na bolsa de Fabricius devido a intensificação da apoptose [16]. A imunossupressão resultante da infecção pelo vírus da Doença de Gumboro determina implicações na saúde das aves, que não estão bem determinadas até o momento. Contudo, nas pesquisas envolvendo *Salmonella* e Doença de Gumboro, há consenso quanto à falha na soroconversão de IgG contra *Salmonella* e moderada supressão na resposta à vacinas comerciais contra *Salmonella* foi evidenciada após a infecção pelo vírus da Doença

de Gumboro [3,6]. Um grupo de frangos corte infectado com *Salmonella* Typhimurium (ST) e outro com o vírus da DG (variante E/Delaware) e *Salmonella* Typhimurium demonstraram diferenças significativas nos escores de lesões na bursa entre os grupos, atribuídas à habilidade da variante do vírus da Doença de Gumboro induzir lesões na bursa. Os resultados indicaram a co-infecção ST – DG como possível causadora de patologias significativas na bolsa de Fabricius, resultando em falha nos anticorpos de resposta contra ST, especialmente para o isotipo IgG [3]. Danos na bolsa de Fabricius e imunossupressão nas aves podem também ser produzidos pelo estresse ambiental a que as aves são submetidas durante a criação. Temperaturas acima ou abaixo da zona térmica de conforto para cada linhagem estimulam a secreção de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), aumentando a atividade do córtex adrenal e da secreção de hormônios esteróides causadores de apoptose em tecidos linfóides, assim afetando a maturação da bolsa e diminuindo o percentual de parênquima [16].

CONCLUSÕES

Os escores histopatológicos evidenciaram depleção linfocitária moderada a severa nas bolsas de Fabricius, porém o isolamento de *Salmonella* Enteritidis em duas amostras não possibilitou maiores inferências a respeito do envolvimento da Doença de Gumboro quanto à persistência de salmonelas no ceco das aves analisadas, sob a presente metodologia.

REFERÊNCIAS

- 1 **Almassy K. & Kakuk, T. 1976.** Immunosuppressive effect of a naturally acquired sub clinical bursal agent infection on vaccination against newcastle disease. *Veterinary Record*. 99: 435-437.
- 2 **Arnold J.W. & Holt P.S. 1995.** Response to *Salmonella* Enteritidis infection by the immunocompromised avian host. *Poultry Science*. 74: 656-665.
- 3 **Bautista D.A., Elankumaran S. & Heckert R.A. 2004.** Effect of a variant Infectious Bursal Disease virus (E/Del) on *Salmonella* Typhimurium in commercial broiler chickens. *Avian Disease*. 48: 361-369.
- 4 **Boziaris I. S. & Adams M. R. 2001.** Temperature shock, injury and transient sensitivity to nisin in Gram negatives. *Journal of Applied Microbiology*. 91: 715-724.
- 5 **BRASIL. Portaria n.26 de 03 de novembro de 1995.** Normas para credenciamento e monitoramento de laboratórios de diagnóstico das salmonelas aviárias (*S. Enteritidis*, *S. Gallinarum*, *S. Pullorum* e *S. Typhimurium*). Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, n.212, p.1794-1798, 06 de nov. de 1995. Seção I. (1995).
- 6 **Butter C., Sturman T.D.M., Baaten B.J.G & Davison T.F. 2003.** Protection from infectious disease virus (IBVD)-induced immunosuppression by immunization with a fowlpox recombinant containing IBDV-VP2. *Avian Pathology*. 32: 597-604.
- 7 **Corrier D.E., Elissade M.H., Ziprin R.L. & DeLoach J.R. 1991.** Effect of immunosuppression with cyclophosphamide, cyclosporin, or dexamethasone on *Salmonella* colonization of broiler chicks. *Avian Diseases*. 35:40-45.
- 8 **DeMan, J. C. 1983.** MNP tables corrected. *European Journal of Applied Microbiology*. 17: 301-305.

- 9 **Desmidt M., Ducatelle R., Mast J., Goddeeris B.M. & Haesebrouck F. 1998.** Role of the humoral immune system in *Salmonella* Enteritidis phage type 4 infection in chickens. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 63: 355-367.
- 10 **Doyle M. E. & Mazzota A. S. 2000.** Review of studies on the thermal resistance of *Salmonella*. *Journal of Food Protection*. 63: 779-795.
- 11 **Dufrenne J., Ritmeester W., Van Asch E. D. 2001.** Quantification of the contamination of chicken and chicken products in The Netherlands with *Salmonella* and *Campylobacter*. *Journal of Food Protection*. 64: 538-541.
- 12 **Dohms J.E & Jaeger J. S. 1988.** The effect of infectious bursal disease virus infection on local and systemic antibody responses following infection of 3-week-old broiler chickens, *Avian Diseases*. 32: 632-64.
- 13 **Faldy A. M., Winterfield R.W. & Olander H.J. 1976.** Role of the bursa of Fabricius in the pathogenicity of inclusion body hepatitis and infectious bursal disease viruses. *Avian Diseases*. 20: 467-477.
- 14 **Gast R.K. & Beard C.W. 1989.** Age-related changes in the persistence and pathogenicity of *Salmonella* Typhimurium in chicks. *Poultry Science*. 68: 1454-1460.
- 15 **Giambrone J.J., Eidson C.S., Page R.K., Fletcher O.J., Barger B.O. & Kleven S.H. 1976.** Effect of Infectious Bursal Agent on the Response of Chickens to Newcastle Disease Marek's Disease Vaccination. *Avian Diseases*. 20: 534-544.
- 16 **Guimarães E.B., Vasconcelos A.C., Martins N.R.S., Oliveira R.F.M., Moro L., Nunes J.E.S. & Santos F.G.A. 2003.** Porcentagem de parênquima e índice apóptico da bolsa cloacal em frangos de corte em ambiente de conforto e estresse térmico. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 55. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci>
- 17 **Jay J.M. 1994.** Conservación de alimentos a temperaturas bajas y características de los psicrótrofos. In: *Microbiología moderna de los alimentos*. 3. ed. Zaragoza: Acribia, pp.373-391.
- 18 **Lukert P.D. & Saif Y.M. 1997.** Infectious Bursal Disease. In: Calnek B.W., Barnes H. J Beard C.W., McDougald L.R. & Saif Y.M. *Diseases of Poultry*, ed.10, Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA pp.721-739.
- 19 **Luna L.G. 1968.** *Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology*. 13 ed. New York: McGraw-Hill, 258p.
- 20 **Muskett J.C., Hopkins I.G., Edwards K.R & Thornton D.H. 1979.** Comparison of two infectious bursal disease vaccine strains: Efficacy and potential hazards in susceptible and maternally immune birds. *Veterinary Record*. 104: 332-334.
- 21 **Okoye J.O.A., Okeke C. N. & Ezeobele K.O. 1991.** Effect of infectious bursal disease virus infection on the severity of *Aspergillus flavus*, aspergillosis of chickens. *Avian Pathology*. 20: 167-171.
- 22 **Pelczar M., Reid R. & Chan E.C.S. 1980.** Controle dos microrganismos. Fundamentos do controle dos microrganismos. In: *Microbiologia*. São Paulo: MacGraw-Hill, pp.455-467.
- 23 **Pereira R.A. 2002.** Relação entre a população linfocitária bursal e o diâmetro da Bolsa de Fabício em frangos de corte. 50f. Porto Alegre, RS. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- 24 **Rinaldi A., Cessi, D., Servio G. & Lodetti E. 1972.** Attenuazione del Virus della Malattia di Gumboro e Prove di Vaccinazione in Laboratorio e in Pratica. *Nuova Veterinaria*. 48: 216-223.
- 25 **Sharma, J.M. 2005** Imunidade e doenças imunossupressoras de aves. Disponível em: <http://www.avisite.com.br/cet/1/29/index.htm>. Acessado em: 06/2005.
- 26 **Taylor-Robinson J.D., Child M. & Pickup R. 2003.** Cell-cell interactions influence resistance and survival of *Salmonella* serotype Typhimurium to environmental stress. *Journal Applied Microbiology*. 94: 95-102.