

Benefícios na progênie com o uso de vacina oleosa para *Salmonella* Enteritidis em matrizes pesadas

Progeny Benefits by the Use of *Salmonella* Enteritidis Oily Vaccine in Broiler Breeders

Artur Valerio Cony¹, Luciana Ruschel dos Santos², Eduarda Martello² & Vladimir Pinheiro do Nascimento³

ABSTRACT

Background: Bacteria of the genus *Salmonella* spp. are recognized as being one of the most common bacterial causes of foodborne disease. Its presence in chickens and hatching eggs is an important barrier to exports, besides posing a potential risk to human health. Companies producing broiler breeders aim at having excellent quality progeny for good hatching results and for providing healthy chicks. The use of inactivated, oily vaccines is one of the strategies to control *Salmonella* Enteritidis, by providing protection for broiler breeders. This protection can also benefit the progeny, so giving it some protection on the early period post-hatch. Thus, this study aimed at evaluating the benefits on the progeny of the use of inactivated, oily vaccine for *Salmonella* Enteritidis in broiler breeders.

Materials, Methods & Results: Inactivated, oily *Salmonella* Enteritidis vaccine was injected in eight, and 19 weeks old breeder birds. Monitoring for *Salmonella* was performed by the use of drag swabs, two per each house, and 10 cloacal swabs by each poultry house, where each swab represented a pool of three birds sampled. In the hatchery, monitoring for *Salmonella* was performed on each lot, where each sample consisted of 10 pipped eggs per lot (850 samples) and 10 stillbirth chicks (850 samples), totaling 1.700 samples altogether. From the 850 pipped eggs samples, 1.18% were positive in vaccinated batches while 33.88% were positive in non-vaccinated batches. Regarding the 850 samples of stillbirth chicks, 1.88% were positive in vaccinated batches and 24.70% were positive in non-vaccinated batches. The percentage of *Salmonella* positive flocks in drag swabs collected from houses with broilers descending from non-vaccinated mothers was 4.38% (502 swabs), while those originated from vaccinated mothers showed a positivity of 1.26% (475 swabs). Nonparametric test (Chi-square) was used to assess the frequency of *Salmonella* at a significance level of 5% and the results were analyzed by Epi Info software version 7.

Discussion: The administration of inactivated, oily vaccines was able to confer protection to the progeny, reducing its sensitivity to early bacterial infections, through the protection given by maternal antibodies, and as a consequence reducing the *Salmonella* Enteritidis isolation rates in pipped eggs, stillbirth chicks in the hatchery and in drag swabs performed on chicken farms. *Salmonella* was recovered from progenies of unvaccinated lots, either from pipped eggs or stillborn chicks. The stillborn chicks originated from vaccinated breeders showed a lower frequency of *Salmonella* isolation when compared to stillborn coming from non-vaccinated batches. The progenies of breeder birds vaccinated against *Salmonella* Enteritidis (inactivated vaccine) were more resistant to infection by the presence of maternal antibodies. The controlling of the agent through immunization with inactivated vaccines is a measure of utmost importance, since protecting birds against clinical disease reduces contamination of products intended for human consumption. On the other hand, despite vaccination is an important tool for the control of *Salmonella* in poultry, its sole use is deemed insufficient for the complete control of the bacteria, since Salmonellosis have been detected even in a mother vaccinated progeny. Biosecurity practices, adequate management and training of involved personnel are also necessary for the effective control of the bacterial agent.

Keywords: *Salmonella* Enteritidis, broiler chicks, broiler hatchery, immunization, Salmonellosis, vaccination.

Descritores: *Salmonella* Enteritidis, vacinação inativada, pintinhos de um dia, incubatório avícola.

INTRODUÇÃO

Bactérias do gênero *Salmonella* são um dos principais causadores de infecção alimentar em humanos e sua presença na carne de frango é uma importante barreira para exportações do produto [1,10,23]. Existem também barreiras nas exportações de ovos férteis e, caso esses ovos estejam positivos para *Salmonella*, a progênie poderá ser positiva para esta bactéria, gerando problemas para o país importador e, consequentemente, para a empresa que os exportou.

As empresas produtoras de matrizes de frangos de corte objetivam matrizes, ovos e progênies de excelente qualidade para uma boa incubação e provimento de pintos saudáveis, que precisam ser livres de *Salmonella* Enteritidis para atender as exigências dos mercados interno e externo. A utilização de vacinas oleosas inativadas é uma das estratégias para o controle da *S. Enteritidis*, por conferir proteção para as matrizes e, via vertical, para a progênie. Desde novembro de 2003 o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) admite o uso de vacina inativada para *S. Enteritidis* com adjuvante oleoso ou hidróxido de alumínio e o controle desta vacinação é realizado principalmente por meio de exames bacteriológicos [8]. Diferentes pesquisadores apresentaram resultados favoráveis ao uso de bacterinas no controle das salmonelas. Descreveram que, em condições de campo, após um ano com um programa utilizando duas doses de vacinas inativadas, houve uma redução da detecção de *Salmonella* Enteritidis em mecônio de pintos de um dia, de 9-10% para 0% [5,9,12,16,20,24,25,30].

Assim, este trabalho teve por objetivo avaliar os benefícios na progênie com o uso de vacina oleosa inativada para *Salmonella* Enteritidis em matrizes pesadas.

MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi realizado de janeiro a dezembro de 2009 e de janeiro a dezembro de 2010 em uma integração avícola no estado do Paraná. O volume de frangos abatidos é 3.200.000 aves por mês da linhagem COBB 500. Foram analisados 20% dos lotes abatidos, correspondendo a 640.000 aves por mês. O incubatório tem capacidade de produzir 8.500.000 pintinhos ao mês, com seis nascimentos por semana; sendo 283.333 pintinhos ao dia. Não foi utilizado antibiótico nos pintinhos das progênies não vacinadas e vacinadas no período em questão para poder validar o experimento. A vacinação inativada de *Salmonella*

Enteritidis foi realizada na fase de recria, com oito e 19 semanas de idade. A monitoria para *Salmonella* foi realizada com suabes de arrasto, sendo dois suabes por aviário arrastados em forma de X, e 10 suabes de cloaca por aviário (um suabe para cada três aves).

No incubatório, a monitoria para *Salmonella* foi realizada a cada lote, sendo que cada amostra era composta por 10 ovos bicados e 10 pintinhos natimortos, totalizando 850 amostras de pintinhos natimortos e 850 de ovos bicados. Os lotes suspeitos para *Salmonella* Enteritidis eram incubados em máquinas separadas e as amostras enviadas para laboratório certificado pelo MAPA para Controle de Salmoneloses e Micoplasmoses.

Estatística descritiva

Utilizou-se o teste não paramétrico de qui-quadrado (χ^2) para avaliar a frequência de *Salmonella* ao nível de significância de 5% e os resultados foram analisados pelo programa Epi Info versão 7.

RESULTADOS

Os resultados dos ovos bicados oriundos de incubatório provenientes de lotes de matrizes não vacinadas e vacinadas para *Salmonella* Enteritidis estão descritos na Tabela 1. Houve diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos 1 e 2, ou seja, os ovos bicados originados de aves provenientes de matrizes vacinadas apresentaram menor frequência de isolamento quando comparados aos ovos bicados de lotes não vacinados. Os resultados das análises de pintinhos natimortos oriundos do incubatório provenientes de matrizes não vacinadas (T1) e de matrizes vacinadas (T2) estão descritos na Tabela 2. Houve diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos 1 e 2, onde os natimortos originados de aves provenientes de matrizes vacinadas apresentaram menor frequência de isolamento de *Salmonella* quando comparados aos natimortos de lotes não vacinados. Os resultados dos suabes de arrasto em aviários provenientes de matrizes não vacinadas (T1) e de matrizes vacinadas (T2) estão descritos na Tabela 3. Houve diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos 1 e 2. Os suabes de arrasto originados de aves provenientes de matrizes vacinadas apresentaram menor frequência de isolamento quando comparados aos suabes de lotes não vacinados. O percentual de positividade em ovos bicados e pintinhos natimortos de matrizes provenientes de matrizes não vacinadas (T1) e de matrizes vacinadas (T2) constam da Tabela 4.

Tabela 1. Ovos bicados oriundos de incubatório provenientes de lotes de matrizes não vacinadas e vacinadas para *Salmonella* Enteritidis.

Tratamento	Presença de <i>Salmonella</i> spp.	Ausência de <i>Salmonella</i> spp.	Total
Provenientes de matrizes não vacinadas (T1)	288	562	850
Provenientes de matrizes vacinadas (T2)	10	840	850
Total	298	1402	1700

$\chi^2 = 314,4664$; ($P = 0,000$).

Tabela 2. Pintinhos natimortos provenientes do incubatório dos lotes não vacinados e vacinados para *Salmonella* Enteritidis.

Tratamento	Presença de <i>Salmonella</i> spp.	Ausência de <i>Salmonella</i> spp.	Total
Provenientes de matrizes não vacinadas (T1)	210	640	850
Provenientes de matrizes vacinadas (T2)	16	834	850
Total	226	1474	1700

Tabela 3. Suabe de arrasto em aviários de frangos de corte dos lotes não vacinados e vacinados para *Salmonella* Enteritidis.

Tratamento	Presença de <i>Salmonella</i> spp.	Ausência de <i>Salmonella</i> spp.	Total
Provenientes de matrizes não vacinadas (T1)	22	480	502
Provenientes de matrizes vacinadas (T2)	6	469	475
Total	28	949	977

Tabela 4. Ovos bicados e pintinhos natimortos de aves não vacinadas e vacinadas para *Salmonella* Enteritidis em percentagem.

Origem	Aves provenientes de matrizes não vacinadas. Positivas	Aves provenientes de matrizes vacinadas. Positivas
Ovos bicados	288/850 (33,88%)	10/850 (1,17%)
Pintinhos natimortos	210/850 (24,70%)	16/850 (1,88%)

DISCUSSÃO

Os ovos bicados originados de aves provenientes de matrizes vacinadas apresentaram menor frequência de isolamento quando comparados aos ovos bicados de lotes não vacinados. O percentual de contaminação dos lotes originados de matrizes vacinadas foi de 1,26%, inferior ao de matrizes não vacinadas (4,38%). Em concordância com os resultados observados, a vacina induz a produção de anticorpos que são transferidos para a progênie e diminuem a contaminação dos pintinhos [11,13,16, 26,30].

Os pintinhos natimortos originados de aves provenientes de matrizes vacinadas apresentaram menor frequência de isolamento de *Salmonella* quando comparados aos natimortos de lotes não vacinados (Tabela 2) e os suabes de arrasto originados de aves provenientes de matrizes vacinadas apresentaram menor frequência de isolamento quando comparados aos suabes de lotes não vacinados (Tabela 3).

Bacterinas oleosas, principalmente em matrizes, contribuem para o controle da salmonelose e diminuem a pressão infectante da *Salmonella* Enteritidis [3]. As progênies de reprodutoras vacinadas contra *Salmonella* Enteritidis (vacina inativada) mostraram-se mais resistentes à infecção pela presença de anticorpos maternos. Embora a vacinação seja uma boa ferramenta no controle da *Salmonella*, apenas a introdução desta é insuficiente para o controle da bactéria, uma vez que ocorreram casos de salmoneloses mesmo em progênie de lotes vacinados. Práticas de biossegurança, manejo adequado e treinamento das pessoas envolvidas, direta e indiretamente com o processo produtivo, também são necessários para que se obtenha o controle ou redução desta bactéria. Também é lícito supor que, tendo em vista a proteção homóloga da vacina, os eventuais remanescentes sejam de sorovares de grupos distintos do grupo D.

A infecção em aves adultas, na maioria das vezes, é inaparente, mas algumas amostras de *Salmonella* Enteritidis podem causar anorexia, diarreia, e redução de produção de ovos [4]. Os anticorpos das matrizes de corte são transferidos através da gema para a corrente circulatória do embrião na forma de Imunoglobulinas G (IgG) [14,15,21]. A gema dos ovos de aves vacinadas é rica em IgG e a sua administração em aves sensíveis aumenta a resistência a infecção por *Salmonella* Enteritidis [6,15]. Aves vacinadas contêm anticorpos no oviduto [22]. Os anticorpos na forma de

imunoglobulina A (IgA) e Imunoglobulinas M (IgM) são secretados no oviduto das aves reprodutoras e são absorvidos pela albumina na passagem do ovo. Esses anticorpos se difundem no líquido amniótico e são ingeridos pelo embrião atingindo o trato intestinal [27]. A IgA, presente no intestino tem um papel significativo na imunidade adquirida contra *Salmonella*, uma vez que ela inibe a aderência e a colonização da bactéria na mucosa intestinal, que é o sítio primário da infecção [18,19], estando em acordo com os resultados deste trabalho.

A Tabela 4 demonstra que houve recuperação de *Salmonella* nas progênies dos lotes não vacinados e que esta recuperação foi superior a dos lotes vacinados, tanto em ovos bicados (33,17% e 1,17%, respectivamente), como em pintinhos natimortos (24,70% e 1,88%)., concordando com os dados da literatura [16]. A imunidade passiva conferiu maior resistência a infecções por *Salmonella* Enteritidis, mas observou-se em alguns lotes vacinados positividade para a *Salmonella* Enteritidis. A explicação mais provável para esta ocorrência seria falha de biossegurança das granjas ou falha vacinal, mas não se pode ignorar que os anticorpos circulantes são incapazes de agir frente as salmonelas localizadas no interior de macrófagos. Completando-se a imunidade humoral por meio da utilização de vacinas vivas, haveria um estímulo da imunidade celular e, conseqüentemente, ativação dos macrófagos com fatores de proteção contra patógenos intracelulares [2,16,17]. A administração da vacina inativada confere proteção nas progênies, diminuindo significativamente a sensibilidade às infecções precoces pela bactéria, concordando com os resultados observados neste trabalho [16,28].

Assim, o estudo evidenciou, através da proteção dos anticorpos maternos, a redução do isolamento de *Salmonella* Enteritidis em ovos bicados, pintos natimortos no incubatório e suabe de arrasto em granjas de frangos de corte. Levando-se em consideração que a erradicação de *Salmonella* Enteritidis é um processo improvável e que o uso de vacina viva de *Salmonella* Enteritidis não é permitida para matrizes de corte, resta o controle do agente por meio de imunização com vacinas inativadas, uma medida de extrema importância, pois além de proteger as aves contra a doença clínica reduz a contaminação de produtos destinados ao consumo humano.

CONCLUSÕES

O uso de vacina inativada de *Salmonella* Enteritidis em adjuvante oleoso em matrizes de corte mostrou uma diminuição significativa de infecção nas progênies, em ovos bicados, pintinhos natimortos no incubatório e

contaminação nos suabes de arrastos coletados entre 21 e 30 dias nas granjas de frangos de corte.

Declaration of interest. The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

REFERENCES

- 1 Babu U., Scott M., Myersc M.J., Okamurab M., Gaines D., Yancyc H.F., Lillehojb H., Heckertd R.A. & Raybourne R.B. 2003. Effects of live attenuated and killed *Salmonella* vaccine on T-lymphocyte mediated immunity in laying hens. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 91(1): 39-44.
- 2 Back A. 2002. Salmonelose. In: Back A. (Ed). *Manual de Doenças das Aves*. Cascavel: Integração, pp.62-76.
- 3 Back A. 2010. Salmonelose. In: Back A. (Ed). *Manual de Doenças das Aves*. 2.ed. Cascavel: Integração, pp.174-192.
- 4 Barman T.K., Sharma V.D. & Kumar S. 2005. Protective efficacy of maternal antibodies induced by *Salmonella* toxoid (vaccine). *Indian Journal of Experimental Biology*. 43(2): 163-166.
- 5 Berchieri J.A. & Macari M. 2009. Salmoneloses aviárias. In: Berchieri J.A (Ed). *Doença das Aves*. 2.ed. Campinas: Facta, pp.435-454.
- 6 Bermudez A.J. & Stewart-Brown B. 2003. Disease prevention and diagnosis. In: Calnek B.W., Barnes H.J. & Beard C.W. (Eds). *Diseases of Poultry*. 11th edn. Ames: Iowa University Press, pp.17-55.
- 7 Brasil. 1995. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento – MAPA/Secretaria de Defesa Agropecuária. Portaria nº 126, de 03 de novembro de 1995. Normas de Credenciamento e Monitoramento de Laboratórios de Diagnóstico das Salmoneloses Aviárias (*S. Enteritidis*, *S. Gallinarum*, *S. Pullorum* e *S. Typhimurium*). Disponível em: <<http://sistemas-web.agricultura.gov.br>>. [Acesso em fevereiro de 2012].
- 8 Brasil. 2003. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento – MAPA/Secretaria de Defesa Agropecuária. Programa de Redução de Patógenos Monitoramento Microbiológico e Controle de *Salmonella* sp. em Carcaças de Frangos e Perus. Diário Oficial da União. Brasília, Instrução Normativa No. 70 de 06 de outubro de 2003. pp.9-10. Seção 1.
- 9 Brasil. 2008. Programa Nacional de Monitoramento de Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frangos. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (Brasília, DF). p. 186.
- 10 Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2004. Preliminary Food Net data on the incidence of infection with pathogens transmitted commonly through food-10 states, 2007. Disponível em: <<http://www.cdc.gov>>. [Acesso em janeiro de 2012].
- 11 Gama N.M.S.Q., Berchieri J.A. & Fernandes S.A. 2003. Avaliação da ação de bacterinas contra *Salmonella* Enteritidis em poedeiras comerciais. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*. 5(Supl 1): p.139.
- 12 Gast R. K. 1993. Detection of *Salmonella* Enteritidis in experimentally infected laying hens by culturing pools of egg contents. *Poultry Science*. 72(2): 267-274.
- 13 Gast R.K. 2003. Recovery of *Salmonella* Enteritidis from inoculated pools of egg contents. *Journal of Food Protection*. 56(1): 21-24.
- 14 Gortler M., Methner U., Kobilke H. & Fehlhaber K. 2004. Effect of orally administrated egg yolk antibodies on *Salmonella* Enteritidis contamination of hen`s eggs. *Journal of Veterinary Medicine*. 72(3): 129-134.
- 15 Hassan J.O. & Curtiss III R. 1996. Effect of vaccination of hens with an avirulent strain of *Salmonella* Typhimurium on immunity of progeny challenged with-type *Salmonella* strains. *Infection and Immunity*. 64(3): 938-944.
- 16 Inoue A.Y., Berchieri J.A., Bernardino A., Paiva J.B. & Sterzo E.V. 2008. Passive immunity of progeny from broiler breeders vaccinated with oil-emulsion bacterin against *Salmonella* Enteritidis. *Avian Diseases*. 52(4): 567-571.
- 17 Kaufmann S.H. 1993. Immunity to intracellular bacteria. *Annual Review of Immunology*. 11(1): 129-163.
- 18 Majumdar A.S. & Ghose A.C. 1981. Evaluation of the biological properties of different classes of human antibodies in relation to cholera. *Infection and Immunity*. 32(1): 9-14.
- 19 MC Ghee J.R., Mestecky J., Dertzbaugh M.T., Eldridge J.H., Hirasawa M. & Kivono H. 1992. The mucosal immune system: From fundamental concepts to vaccine development. *Vaccine*. 10(1): 75-88.

- 20 **MC Mullin P. 2010.** Programas de monitoria de *Salmonella* na produção de ovos. *Avicultura industrial*. 101(1185): 41-44.
- 21 **Methner U. & Stinbach G. 1997.** Efficacy of maternal *Salmonella* antibodies against oral infection of chicks with *Salmonella* Enteritidis. *Berliner und Munchner Tierarztlliche Wochenschrift*. 110(1): 373-377.
- 22 **Miyamoto T., Kitaoka D., Withanage G.S.K. & Fukata T. 1999.** Evaluation of the efficacy of *Salmonella* Enteritidis oil-emulsion bacterin in an intravaginal challenge model in hens. *Avian Diseases*. 43(3): 497-505.
- 23 **Nakamura M., Nagata T., Okamura S., Takehara K. & Holt P.S. 1994.** Evolution of the efficacy of a bacterin against *Salmonella* Enteritidis infection and the effect of stress after vaccination. *Avian Diseases*. 38(4): 717-724.
- 24 **Nascimento V.P., Santos L.R., Rodrigues L.B., Landinez M.P., Perdoncini G., Sierra Y. & Borsoi A. 2012.** Exigências internacionais de qualidade microbiológica da carne de frango para exportação. In: *XII Simpósio Brasil Sul de Avicultura* (Chapecó, SC). pp.33-38.
- 25 **Soncini R.A. & Back A. 2001.** *Salmonella* Enteritidis em aves: erradicação ou controle por vacinação. In: *Conferência Apinco de Ciência e Tecnologia Avícolas* (Campinas, SP). pp.21-30.
- 26 **Timms L.M., Marshal R.N. & Breslin M.F. 1994.** Laboratory and field trial assessment of protection given by *Salmonella* Enteritidis PT4 inactivated, adjuvant vaccine. *Brazilian Journal of Research and Animal Science*. 150(1): 93-102.
- 27 **Tizard I.R. 2002.** Vacinação e vacinas. *Imunologia Veterinária*. 6th edn. Guanabara: Roca, pp.261-281.
- 28 **Van Immerseel F., Methner U., Rychlik I., Nagy B., Velge P., Martin G., Foster N., Ducatelle R. & Barrow P.A. 2005.** Vaccination and early protection against non-host-specific *Salmonella* Serotypes in poultry: exploitation of innate immunity and microbial activity. *Epidemiology and Infection*. 133(1): 959-978.
- 29 **Woodward M.J., Gettinby G., Breslin M.F., Corkish J.D. & Houghton S. 2002.** The efficacy os Salenvac, a *Salmonella* enterica subsp. Enterica serotype Enteritidis iron-restricted bacterin vaccine, in laying chickens. *Avian Pathology*. 31(1): 383-392.