

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**INOCULAÇÃO DE *Salmonella enterica* SUBESPECIE *enterica* SOROVAR
ENTERITIDIS FAGOTIPO 4 EM OVOS EMBRIONADOS DE DUAS
LINHAGENS DE FRANGO DE CORTE**

Autor: Maria Auxiliadora Andrade
Orientador: Prof. Dr. Albenones José de Mesquita

**GOIÂNIA
2005**



Termo de Ciência e de Autorização para Disponibilizar as Teses e Dissertações Eletrônicas (TE-DE) na Biblioteca Digital da UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás–UFG a disponibilizar gratuitamente através da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações – BDTD/UFG, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: Dissertação Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Autor: **Maria Auxiliadora Andrade** E-mail: **maa@ufg.br**

Seu e-mail pode ser disponibilizado na página? Sim Não

Vínculo Empregatício do autor: **Universidade Federal de Goiás** Agência de fomento: **Goiânia-Go**

País: **Brasil** UF: **Go** CNPJ: Sigla:

Título: **Inoculação de Salmonella enterica subspécie enterica sorovar Enteritidis fagotipo 4 em ovos embrionados de duas linhagens de frango de corte. Goiânia** Palavras-chave: **ISA frango de corte, produção, ovos, órgãos Ross, ISA label**

Título em outra língua: **Effects of experimentally inoculated Salmonella Enteritidis subspécie enterica sorovar Enteritidis phagotipe 4 in incubation of embryonated eggs of in two broiler lines**

Palavras-chave em outra língua: **Chickens, colonization, infection, invasion, genetic resistance, organs.**

Área de concentração: **Sanidade Animal** Data defesa: (dd/mm/aaaa) **16/09/2005**

Programa de Pós-Graduação: **Ciência Animal**

Orientador(a): **Albenones José de Mesquita** E-mail:

Co-orientador(1): **Dr. José Henrique Stringhini** E-mail:

Co-orientador(2): **Dr Luiz Augusto Batista Brito** E-mail:

3. Informações de acesso ao documento:

Liberação para disponibilização? total parcial

Em caso de disponibilização parcial, assinale as permissões:

[] Capítulos. Especifique:

[] Outras restrições:

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.

O Sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.

Goiânia 31 de outubro de 2013


Assinatura do(a) autor(a)

MARIA AUXILIADORA ANDRADE

**INOCULAÇÃO DE *Salmonella enterica* SUBESPECIE *enterica* SOROVAR
ENTERITIDIS FAGOTIPO 4 EM OVOS EMBRIONADOS DE DUAS LINHAGENS DE
FRANGO DE CORTE**

Tese apresentada para a obtenção do grau de Doutor
em Ciência Animal junto à Escola de Veterinária da
Universidade Federal de Goiás

Área de Concentração:
Sanidade Animal

Orientador:
Prof. Dr. Albenones José de Mesquita

Comitê de Orientação:
Prof. Dr. José Henrique Stringhini
Prof. Dr. Luiz Augusto Batista Brito
Profa. Dr. Iolanda Aparecida Nunes

**GOIÂNIA
2005**

A553i Andrade, Maria Auxiliadora.
Inoculação de Salmonella Entérica subespécie
entérica Sorovar Enteritidis fagotipo 4 em ovos
embrionados de duas linhagens de frango de corte /
Maria Auxiliadora Andrade. – 2005.
110 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Goiás,
Escola de Veterinária, 2005.

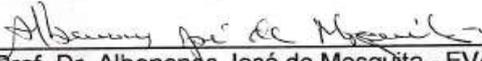
“Orientador: Prof. Dr. Albenones José de
Mesquita”.

1. Frango de corte - produção. 2. Ovos - salmonela
- contaminação. 3. Pintos - Ross - ISA Label -
salmonela - infecção. I. Título.

CDU: 636.5.033
579.62

MARIA AUXILIADORA ANDRADE

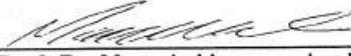
Tese defendida e aprovada em **16/09/2005**, pela Banca Examinadora constituída pelos professores:



Prof. Dr. Albenonês José de Mesquita - EV/UFG
(ORIENTADOR (A))



Profa. Dra. Sandra Regina Pires de Moraes
UEG/Anápolis



Prof. Dr. Marcelo Vasconcelos Meireles
UNESP/Araçatuba



Profa. Dra. Nadja Susana Mogyca Leandro
EV/UFG



Profa. Dra. Valéria de Sá Jayme
EV/UFG

AGRADECIMENTOS

A autora agradece à(s) ao (s):

DEUS que a sustentou-me para realização deste trabalho e colocou ao meu lado pessoas solidárias e amigas;

Escola de Veterinária em especial ao Programa de Pós Graduação, ao Hospital Veterinário, ao Setor de Avicultura, ao Setor de Reprodução, aos Laboratórios de Histopatologia, Bacteriologia; Doenças das Aves pelo oferecimento dos locais experimentais e pela oportunidade de realizar este curso;

Empresas privadas e pessoas que colaboram e contribuíram com o fornecimento de materiais: AVIFRAM, ASA ALIMENTOS, Superfrango, Nutrial; Cíntia Fernandes, Janiara, Mônica;

Maurício Ribeiro de Andrade, que em todo momento, não mediu esforços para auxiliar-me tanto na condução de trabalho, quanto na ajuda financeira e também no estímulo e apoio para não desistir; com companheirismo e amor;

Prof. Dr. Albenones José de Mesquita pela orientação, paciência e apoio na execução deste trabalho, com carinho e amizade;

Prof. Dr. José Henrique Stringhini pela orientação na condução deste trabalho, pelo apoio, pela tolerância em ouvir minhas lamentações e também pela carinho e amizade;

Técnica de Laboratório Maria Aparecida da Costa Batista pela amizade, pelo auxílio na execução dos exames bacteriológicos, pela ajuda na coleta de amostras e principalmente pela compreensão e tolerância;

Prof. Dr. Luiz Augusto Batista Brito pela oportunidade e orientação na condução deste trabalho;

Prof. Marcos Almeida de Souza e Prof. Dra Maria da Conceição pela contribuição no desenvolvimento desta pesquisa;

Prof. Dra Iolanda Aparecida Nunes por gentilmente ceder a *Salmonella* Enteritidis, PT4 , pelos estímulo e sugestões na execução no desenvolvimento deste trabalho;

Prof. Dr. Marcos Barcellos Café, Prof. Dra. Nadja Susana Mogyca Leandro, Profa. Dra Valéria de Sá Jayme pela compreensão, pela paciência em ouvir minhas lamentações, pelo carinho e amizade e ainda por apresentarem sugestões que muito contribuíram para realização deste trabalho;

Aos meus filhos Leandro Andrade, Leonardo Andrade, Ingrid Cristina Maciel e Lucas Salomão Andrade pela força, disponibilidade, na realização de etapas deste trabalho;

Ao diretor do Hospital Veterinário, Médico Veterinário Apóstolo, pela gentileza e boa vontade em ceder os isolamentos

Prof Dra. Elisabeth Gonzáles pelo estímulo e ainda pela disponibilidade em emprestar e doar equipamentos para a realização deste trabalho;

Prof. Dr Jurij Sobestiansky pelas sugestões e apoio sempre trazendo referências novas para o trabalho;

Prof Dra Maria Clorinda S. Fioravante pelo estímulo e pelas sugestões no projeto deste trabalho;

Funcionários Sebastião e Antonio do setor de apoio; Aristóteles do setor de transporte; Euza da sala de esterilização;

Alunos e estagiários Alessandra, Adson, Leandro Chaves, Leandro Dias, Leonardo, Letícia, Maíra, Norma.

Técnico de Laboratório Antonio Souza da Silva pela confecção das lâminas histológicas e amizade;

Colegas do curso de Afonso, Ari, Cíntia Minafra, Francisco, Olízio, Pedrinho e Karine, Henrique, Leonardo, Mônica, Alexandre, Roberto, pelas experiências vivenciadas e pelo convívio agradável e muitas vezes divertido durante o curso;

Em especial à Cíntia Minafra, “colega” e amiga por estar sempre ao meu lado dando-me apoio e contribuindo para eu me tornar “chiquosa;”

Prof. Dra Maria Lúcia M. Gamberini pelo auxílio na pesquisa bibliográfica e sugestões no decorrer do desenvolvimento do estudo;

Dra Adriana Ayres Pedroso pelo carinho e disponibilidade em executar as análise estatística e paciência em orientar-me nas análises dos dados;

A todos que contribuíram com a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1- CONSIDERAÇÕES GERAIS-----	1
CAPÍTULO 2 - EFEITO DA SANITIZAÇÃO DA CASCA COM QUATERNÁRIO DE AMÔNIA E DA VIA DE INOCULAÇÃO NO ISOLAMENTO DE <i>Salmonella</i> ENTERITIDIS DE OVOS EMBRIONADOS DE DUAS LINHAGENS DE FRANGO DE CORTE-----	8
RESUMO-----	8
A BSTRACT-----	8
1. INTRODUÇÃO-----	9
2. MATERIAL E MÉTODOS-----	11
2.1 Locais dos experimentos-----	11
2.2 Experimentos-----	11
2.3 Ovoscopia-----	12
2.4 Embriodiagnóstico-----	13
2.5 Rendimento de incubação-----	13
2.6 Análise de mecônio-----	13
2.7 Preparação do inóculo-----	13
2.8 Inoculação dos ovos-----	14
2.9 Enumeração e pesquisa de <i>Salmonella</i> -----	15
2.10 Análises estatísticas-----	16
3.RESULTADOS-----	16
3.1 Experimento 1- linhagem de crescimento rápido-----	16
3.2 Experimento 2- linhagem de crescimento lento-----	20
4.DISSCUSSÃO-----	23
5.CONCLUSÕES-----	27
REFERÊNCIAS-----	28
CAPÍTULO 3- HISTOMORFOMÉTRIA DO TRATO GASTRINTESTINAL E DESEMPENHO DE DUAS LINHAGENS DE FRANGO DE CORTE ORIUNDOS DE OVOS INOCULADOS COM <i>Salmonella</i> Enteritidis, FAGOTIPO 4-----	32
RESUMO-----	32
ABSTRACT-----	32
1. INTRODUÇÃO-----	33
2.MATERIAL E MÉTODOS-----	35
2.1 Delineamento e tratamentos-----	35
2.2 Exames histomorfométricos-----	37
2.3 Pesquisa de <i>Salmonella</i> -----	38
2.4 Variáveis de desempenho-----	38
2.5 Análises estatísticas-----	39

3. RESULTADOS-----	39
4.DISSCUSSÃO-----	51
5.CONCLUSÕES-----	55
REFERÊNCIAS-----	55

CAPÍTULO 4- INFECÇÕES INAPARENTES EM CONDIÇÕES
EXPERIMENTAIS POR *Salmonella* Enteritidis EM DUAS LINHAGENS DE
FRANGO DE CORTE -----60

RESUMO-----	60
ABSTRACT-----	60
1.INTRODUÇÃO-----	60
2. MATERIAL E MÉTODOS -----	63
2.1 Delineamento e Tratamentos-----	64
2.2 Exames histopatológicos-----	65
2.3 Pesquisa de <i>Salmonella</i> -----	65
2.4 Análises estatísticas-----	66
3.RESULTADOS-----	66
4.DISSCUSSÃO-----	72
5.CONCLUSÕES-----	79
REFERÊNCIAS-----	79

CAPÍTULO5 - ASPECTOS CLÍNICOS E ANATOMOHISTOPATOLÓGICOS
DE DUAS LINHAGENS DE PINTO DE CORTE, ROSS E ISA LABEL,
ORIUNDOS DE OVOS EMBRIONADOS INOCULADOS
EXPERIMENTALMENTE COM *Salmonella* Enteritidis FAGOTIPO 4-----85

RESUMO-----	85
ABSTRACT-----	85
1.INTRODUÇÃO-----	86
2. MATERIAL E MÉTODOS-----	88
2.1 Locais-----	88
2.2 Delineamento e tratamentos-----	88
2.3 Exame histopatológico-----	89
2.4 Pesquisa de <i>Salmonella</i> -----	90
2.5 Análises estatísticas-----	91
3.RESULTADOS E DISCUSSÃO-----	91
5.CONCLUSÕES-----	103
REFERÊNCIAS-----	104

CAPÍTULO 6- CONSIDERAÇÕES FINAIS-----108

CAPÍTULO 1- CONSIDERAÇÕES GERAIS

A preferência por alimentos diferenciados surgiu com a insegurança da população frente a informação de contaminação de ovos e leite pela dioxina, pela ameaça de uma nova variante humana da Encefalopatia Espongiforme Bovina e de uma outra ameaça à saúde pública, representada pelo aumento na freqüência de casos de resistência bacteriana aos antibióticos. Os antibióticos têm ampla utilização na produção animal e estudos têm sugerido que o consumo de alimentos de origem animal constitua uma possível via de transmissão de bactérias resistentes ao homem.

A constatação da presença de resíduos químicos de aditivos em produtos cárneos e o receio da indução da resistência bacteriana vinculada por alimentos de origem animal fizeram com que os aditivos passassem a ser vistos como fatores de risco para a saúde pública (LOPES, 2003). Entretanto, não há evidências, segundo a Federation of Animal Science Societies-(FASS, 2003) de que realmente os alimentos orgânicos sejam mais saudáveis que os alimentos produzidos de forma convencional. Segundo a FASS (2003), talvez ocorra mais risco associado aos produtos orgânicos devido ao potencial da introdução de organismos perigosos para o homem na cadeia alimentar.

Uma das principais características dos mercados no mundo é a vontade do consumidor. Parcelas de consumidores têm exigido alimentos diferenciados, sem resíduos químicos, com segurança sanitária, menos industrializados e produzidos de forma mais natural em consonância com o bem estar do animal, com a preservação ambiental e com a saúde do homem. Esta nova realidade tem dado impulso à criação em sistemas que eliminam a utilização de antibióticos e ingredientes de origem animal.

Neste contexto, as salmoneloses ocupam posição de destaque na saúde pública pelas suas características de endemicidade, morbidade e, em particular, pela dificuldade de controle. Todo esses aspectos decorrem dos múltiplos parâmetros epidemiológicos envolvidos, principalmente pelas inúmeras fontes de infecção e vias de transmissão presentes no ciclo (HOFER & REIS, 1997). Em 2001, registraram-se 2.918 casos de infecções humanas numa população de 5,4 milhões de pessoas por diferentes sorotipos de *Salmonella*. Ocorreu um pico de infecções em 1997, que desde então se

reduziu e em 2002 havia a metade do valor anotado, devido ao efetivo controle em estágios de produção (FISCHER, 2002). No momento, as salmoneloses paratíficas ameaçam a aceitação pública dos produtos avícolas, sendo os mesmos incriminados como as principais fontes de infecção atribuídas às doenças veiculadas por alimentos. O Laboratório FIOCRUZ nos anos 2002, 2003 e 2004 caracterizou a *Salmonella* Enteritidis como o sorovar mais freqüente em aves, registrando maior ocorrência em 2004 (RODRIGUES, 2005).

Os prejuízos com a infecção aviária por *Salmonella* sp. são difíceis de serem medidos, mas compreendem perda de animais, rendimento abaixo do potencial, gastos com medicamentos, e, além disso, a presença do patógeno tem sido apontada como um dos principais problemas sanitários que restringem o comércio de aves e dos subprodutos em todo mundo. Portanto, as infecções aviárias têm trazido enormes prejuízos econômicos (ZANCAN, 1998). Dentro deste enfoque, o Ministério da Agricultura e Abastecimento, através da Portaria Ministerial nº 193, de 19 de Setembro de 1994, instituiu o Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA). Este programa se baseou nas indicações da Office International des Epizooties (O.I.E.), que tem como objetivo geral garantir a disponibilidade, nos mercados interno e externo, de produtos avícolas de qualidade e sanitariamente controlados contra *Salmonella* Enteritidis, entre outros agentes (VILLA, 1998).

As infecções aviárias causadas por *Salmonella* Enteritidis comprometem a produção avícola com grandes perdas econômicas, além de terem significado nos estudos de saúde pública (BARROW, 1993). Entretanto, SILVA & DUARTE (2002) relataram que a ocorrência de *Salmonella* Enteritidis tem pouco ou nenhum impacto na produtividade das granjas. SILVA (2005) reforçou que *Salmonella* em frangos, exceto os sorovares espécie - específicos, geralmente não está relacionada a perdas de produtividade na criação.

As condições naturais de produções de aves alternativas apresentam maior desafio do que as criações de aves convencionais, pois as medidas de biossegurança nem sempre são consideradas. Contribui para isso a diversidade dos sistemas de produção, sendo que uns reproduzem aves na

propriedade e outros adquirem os pintos de um dia nas lojas agropecuárias e em incubatórios (FIGUEIREDO et al., 2001). DEMATEÉ FILHO & MENDES (2001) afirmam que os maiores problemas de sanidade em produção alternativa referem-se ao desequilíbrio microbiano nos locais de criações (galpões), o que tem acarretado doenças, contrariando o principal objetivo deste sistema que é o estado de saúde das aves.

A enfermidade é mais comum em aves jovens, contudo, *Salmonella* pode viver em equilíbrio no organismo e não ser identificada, a menos que um programa de controle rigoroso seja realizado (BARROW, 2000; BERCHIERI JUNIOR, 2000). A constatação de que os produtos de origem aviária representam a principal fonte de infecção alimentar para o homem tem contribuído para a intensificação de pesquisas na área. A situação se agravou com o surgimento de alguns sorovares que são patogênicos para as aves e muito patogênicos para o homem. Tais sorovares podem se envolver na cadeia alimentar do homem determinando quadros de infecções.

A indústria avícola mantém um sistema altamente rigoroso na higiene e na desinfecção de incubatórios, entretanto ZANCAN (1998) e ROCHA (2001) detectaram a *Salmonella* Enteritidis em forros de caixas de pintos de um dia, oriundos de vários incubatórios, sugerindo a veiculação deste agente do incubatório para o galpão de criação. REZENDE (2002) detectou 75% dos lotes de frango de corte de agroindústrias goianas positivos para a *Salmonella* sp., o que de certa forma traz preocupação para as produções alternativas, já que pesquisas não têm sido conduzidas nestas criações e nelas os desafios por agentes patogênicos talvez sejam maiores. Acrescenta-se também a intensidade da comercialização de produtos avícolas entre o meio urbano e rural, que pode propiciar maior circulação deste patógeno.

Por outro lado, YALÇIN et al. (1997) demonstraram em aves de crescimento lento, uma relação entre as aves que possuem o gene *Na*, “pescoço pelado”, e tolerância ao calor, estas aves apresentaram melhores índices produtivos em ambientes tropicais. A rusticidade de aves “caipiras” ou “caipiras melhoradas”, ou criações “coloniais”, propiciam a esses animais maior resistência à manifestação de determinadas doenças. E no caso das infecções por *Salmonella* Enteritidis em “caipiras melhoradas”, os aspectos

epidemiológicos envolvidos são mais complexos e muitos ainda não são conhecidos neste segmento de produção de carne.

A produção alternativa de frango de corte vem crescendo no Brasil desde a década de 90. Além da questão cultural envolvida, este tipo de produção tem se tornado uma esperança para os pequenos e médios produtores de qualquer região do país, tanto para o consumo familiar como para a produção comercial. ZANUSSO (2004) relatou que o mercado para produtos diferenciados encontra-se em expansão com uma fatia de 3% em relação aos produtos oriundos de frangos criados em sistema convencional, setor em o Brasil assumiu o primeiro lugar no comércio internacional (ABEF, 2005).

Criar linhagens de aves mais resistentes a *Salmonella* Enteritidis pode ser uma alternativa para pequenos e médios produtores com o intuito de atender consumidores com perfil diferenciado e que pagam mais por produtos seguros. Segundo VAROLI JUNIOR et al. (2000) não se sabe porque o gen *Na* presente nas aves pescoço pelado determina ausência de penas, porém a presença deste gen afeta características de crescimento, eficiência alimentar e resistência ao calor. Vale registrar que nos atendimentos de rotina no Setor de Doenças das Aves da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás as aves ISA Label não têm sido diagnosticado infecções por *Salmonella* Enteritidis.

Esforços devem ser realizados no sentido de buscar o aprimoramento tecnológico, identificar problemas sanitários, produzir com mais eficiência e, se possível, com maior produtividade e rentabilidade.

Segundo GONZÁLES (2002), “produção alternativa é um sistema produtivo para a obtenção de um alimento com atributo diferenciado que apresenta qualidade que se sobrepõe aos requisitos básicos de sanidade e de inocuidade”.

As técnicas de produção utilizadas na criação de frango de corte podem ser classificadas em quatro categorias, de acordo com a mesma autora em: convencional, alternativa, caipira ou colonial, orgânica ou ecológica ou biológica.

A produção convencional caracteriza-se por ser uma criação intensiva, que utiliza genética selecionada para alta taxa de crescimento, recursos de manejo e alimentação que buscam a máxima eficiência com menor custo e adota critérios sanitários compatíveis para a manutenção da saúde animal e do homem. O abate dessas aves ocorre entre 42-48 dias de vida.

A produção alternativa apresenta características de produção semelhantes à convencional, sem restrições a linhagens, utiliza recursos de manejo e alimentação sem promotores de crescimento, antibióticos e anticoccidianos, dieta sem produtos de origem animal e adota critérios estabelecidos para respeitar a saúde e o bem estar das aves e do homem. O abate dessas aves ocorre após 50 dias de vida. Acrescenta-se que em junho de 2001 foi fundada, em São Paulo, a Associação de Avicultores Alternativos (AVAL), que tem procurado fortalecer esse segmento de mercado.

A produção caipira ou colonial caracteriza-se por utilizar linhagens de crescimento lento, sendo vedado o uso de linhagem comercial. As aves são criadas no sistema semi-intensivo, mantidas em confinamento até 28 dias e após este período são soltos a campo. O abate ocorre após 85 dias de vida. As rações são livres de antibióticos, anticoccidianos e ingredientes de origem animal e as aves devem ter abrigo noturno (BRASIL, 1999).

A experiência com produções alternativas é relativamente pequena no Brasil. Existem poucas informações técnico-científicas sobre linhagens de crescimento lento e sobre a *Salmonella* Enteritidis nestas criações. Baseando no exposto pretendeu-se a realização do presente estudo com o objetivo de contribuir para o crescimento e fortalecimento deste segmento da avicultura nacional.

REFERÊNCIAS

1. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS PRODUTORES E EXPORTADORES DE FRANGOS (ABEF) ed. 69. 7p. 2005. Disponível www.abef.com.br, acesso em 22 de maio de 2005.
2. BARROW, P. A. *Salmonella* control – past, present and future. **Avian Pathology**, v.22, n.3, p 651-69,1993.

3. BARROW, P. A. The paratyphoid salmonellae. **Rev. Sci Tec.** v.19,n.2,p 351-75, 2000.
4. BERCHIERI JUNIOR, A. Salmoneloses aviárias. In: BERCHIERI JUNIOR, A.; MACARI, M. **Doenças das aves**. Campinas: FACTA, 2000. p. 185-195
5. BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria Nacional da Defesa Agropecuária. Departamento Nacional de Defesa Animal. **Ofício Circular DOI/DIPOA n^o 008/99** de 19/05/1999.12 p. 1999
6. DEMATTÊ FILHO, L. C., MENDES, C. M. I. Viabilidade técnica e econômica na criação alternativa de frangos. In: CONFERÊNCIA APINCO 2001 DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS AVÍCOLAS, Campinas. **Anais...**Campinas, v.2, 2001, p.254-266.
7. FEDERATION OF ANIMAL SCIENCE SOCIETIES-FASS. Organic meat, milk and eggs. **State of the Science**, 2003, p 1-2.
8. FIGUEIREDO, E. A P., PAIVA, D. P., ROSA, P. S., ÁVILA, V. S., TALAMIN, D. J. D. Diferentes denominações e classificações brasileiras de produção alternativa de frangos. In: CONFERÊNCIA APINCO 2001 DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS AVÍCOLAS, SIMPÓSIO SOBRE PRODUÇÃO ALTERNATIVA. Campinas. **Anais...**Campinas, v.2, 2001 p.209 -22.
9. FISCHER, M. Experience on poultry production, zoonose and animal welfare. In: EUROPEAN POULTRY CONFERENCE, 11., 2002, Bremen. **Abstracts...** Bremen: European Federation World's Poultry Service Association, 2002. p.6.
10. GONZALES, E. Produção alternativa de aves.**(Palestra)**. 2002
- 11.HOFER, E., REIS, E. M. F. Sorovares de Salmonella isolados de matérias primas e de rações para aves no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.18, n.1, p.233-43, 1997.
- 12.LOPES, C. A. **Riscos Alimentares e Medos Humanos**. Coleção Veterinária XXI n. 4. Publicações Ciência e Vida: Lisboa , 2002, 319 p.
- 13.ROCHA, P. T. **Ocorrência de Salmonella spp. em granjas de integrações de frango de corte no Estado de Goiás**. Goiânia, 2001. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária – Sanidade Animal) Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás. 57p.
- 14.RODRIGUES, D. P. Ecologia e prevalência de Salmonella spp.em aves e materiais avícolas. In: CONFERÊNCIA APINCO 2005 DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS AVÍCOLAS, Campinas. **Anais...** Santos-SP, 2005, p.223-228

15. REZENDE, C. S. M. **Ocorrência de Salmonella em lotes de frangos de corte de agroindústrias goianas:** identificação bacteriológica e perfil de sensibilidade a antimicrobianos. Goiânia, 2002. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária – Sanidade Animal). Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás. 73p.
16. SILVA, E. N.; DUARTE, A. Salmonella Enteritidis em aves: retrospectiva da situação atual. In: CONFERÊNCIA APINCO 2002 DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS AVÍCOLAS, Campinas. **Anais...** 2002, p.215-232.
17. SILVA, E. N. Medidas gerais de controle de *Salmonella* em frangos de corte. In: CONFERÊNCIA APINCO 2005 DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS AVÍCOLAS, Campinas. **Anais...**Santos-SP. 2005, p.229-237.
18. VAROLI JÚNIOR, J. C.; GONZALES, E.; ROÇA, R. O.; MENDES, A. A.; MORCELI, L. Desempenho e qualidade de carcaças de frangos com o gen *Na*. **Ars. Veterinária**, v.16, n. 2, p. 122-129, 2000
19. VILLA, M. F. G. Programa Nacional de Sanidade Avícola 1994 a 1998. In: CONFERÊNCIA APINCO 1998 SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE SANIDADE AVÍCOLA, Campinas. 1998. Fundação de Ciências e Tecnologias Avícolas. **Anais...** 1998, p.73-86.
20. ZANCAN, F.T. **Pesquisa de Salmonella em caixas de transportes de pintos de um dia de vida.** Jaboticabal. 1998. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária – Medicina Veterinária Preventiva). Faculdade de Ciência de Agronomia e Veterinária do Campus de Jaboticabal. Universidade Estadual Paulista. 46p.
21. ZANUSSO, J. T. Perspectiva para os sistemas de produção alternativos de aves e suas dificuldades para a transição. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, Simpósio sobre agricultura familiar e produção orgânica, 41, Campo Grande, 2004. **Anais...** Campo Grande, SBZ/ EMBRABA/ CNPGC, 2004, Campo Grande, p.100-110.
22. YALÇIN, S.; TESTIK, A.; OSKAN, S; SETTAR, P.; ÇELEN, F.; CAHANER, A. Performance of naked neck and normal broilers in hot, warm, and temperature climates. **Poultry Science**, v. 76, p. 930-7, 1997.

CAPÍTULO 2 – EFEITO DA SANITIZAÇÃO DA CASCA COM QUATERNÁRIOS DE AMÔNIA E DA VIA DE INOCULAÇÃO NO ISOLAMENTO da *Salmonella enterica* SOROVAR ENTERITIDIS FAGOTIPO 4 EM OVOS EMBRIONADOS DE DUAS LINHAGENS DE FRANGO DE CORTE

RESUMO: Foram conduzidos dois experimentos para avaliar os efeitos de quaternários de amônia sobre *Salmonella* Enteritidis inoculados na casca e a capacidade de penetração deste patógeno na casca e para verificar sua habilidade em infectar os ovos inoculados pela casca e cavidade alantóide, determinar mortalidade embrionária, infectar os pintos eclodidos e afetar os parâmetros de incubação em duas linhagens de frango de corte. Utilizaram-se, respectivamente, 302 e 290 ovos férteis das linhagens Ross e ISA Label, distribuídos em seis tratamentos: ovos sanitizados e inoculados com o placebo (tratamento 1- PC) ou com quaternários de amônio inoculados na casca com *Salmonella* Enteritidis fagotipo 4 (tratamento 2-PI); ovos não sanitizados e inoculados na casca com placebo (tratamento 3-NPC) ou com *Salmonella* Enteritidis (tratamento 4-NPI); ovos inoculados na cavidade alantóide com placebo (tratamento 5-CAC) ou com *Salmonella* Enteritidis (tratamento 6-CAI). Imediatamente após a inoculação, os ovos foram incubados e a mortalidade embrionária avaliada após 96, 432 e 528 horas. As respostas qualitativas foram analisadas pelos testes não paramétricos de qui-quadrado e de Kruskal-Wallis. Constatou-se que a sanitização dos ovos não eliminou a *Salmonella* Enteritidis inoculada na casca sendo que o agente manteve-se viável na casca durante todo o período de incubação e migrou para o interior dos ovos em três das 20 amostras analisadas. Os parâmetros de incubação não foram afetados quando o patógeno foi inoculado na casca. Constatou-se também que a *Salmonella* Enteritidis inoculada na cavidade alantóide determinou mortalidade embrionária tardia nas linhagens Ross de 17,02% e ISA Label de 13,04%, assim como os ovos inoculados nesta cavidade originaram pintos com maior frequência de colonização intestinal pela *Salmonella* Enteritidis de 76,67% e 26,67% para Ross e ISA Label, respectivamente.

Palavras-Chaves: ISA Label, mortalidade embrionária, patógeno, Ross, sanitizante.

EFFECT OF THE USE OF QUATERNARY AMMONIA AND VIA INOCULATION IN EGG SHELL ON *Salmonella enterica* SOROVAR ENTERITIDIS PHAGOTYPE 4 ISOLATION IN FERTILIZED EGGS OF TWO BROILER LINES

ABSTRACT: Two experiments were carried out to evaluate the use of quaternary ammonia on *Salmonella* Enteritidis inoculated in eggshell and its penetration capacities, verify the ability to infect the egg inoculated in eggshell, determine embryo mortality, infect hatched chicks and affect incubation parameters of two broiler lines. A total of 302 and 290 fertile eggs of Ross and

ISA Label, respectively, were distributed in six treatments: eggs sanitized with placebo (Treatment 1- PC) quaternary ammonia inoculated with *Salmonella* Enteritidis (Treatment 2-PI); eggs non-sanitized and inoculated placebo (Treatment 3- NPC) with *Salmonella* Enteritidis (Treatment 4- NPI); eggs inoculated in allantoidal cavity with placebo (Treatment 5-CAC) or *Salmonella* Enteritidis (Treatment 6- CAI). Immediately after inoculation, the eggs were hatched and embryo mortality was evaluated after 96, 432 and 528 hours. The qualitative results were analyzed by non-parametric tests of chi-square and Kruskal-Wallis. The incubation parameters were not affected when the pathogen was inoculated in eggshell. It was observed that *Salmonella* Enteritidis inoculated in allantoidal cavity determined late embryo mortality in fast growing 17,02% and slow growing 13,04% lines, and eggs inoculated in allantoidal cavity originated chicks with high frequency of intestinal colonization by *Salmonella* Enteritidis of 76,67% and 26,67% Ross and ISA Label, respectively.

Key words: embryo mortality, ISA Label, pathogen, Ross, sanitizers.

INTRODUÇÃO

Um ovo fertilizado contém um embrião em fase inicial de desenvolvimento, protegido pela casca, sendo esta, portanto, a principal linha de defesa do blastoderme contra o desafio do meio ambiente (GONZALES & CAFÉ, 2003).

Os ovos podem se contaminar com *Salmonella* como resultado da infecção do tecido reprodutivo da galinha durante a formação do folículo da gema e/ ou formação do albume no oviduto, antes da formação da casca, resultando em transmissão vertical. Os ovos contaminam-se também após a formação da casca, durante a passagem pela cloaca ou pelo contato com as fezes na cama, no material de ninho, mãos do tratador, água, bandejas, cama, piso ou em qualquer local contaminado, inclusive incubatórios, caracterizando-se a transmissão horizontal (HUMPREY, 1994; MIYAMOTO et al., 1997; COX et al., 2000; GUSTIN, 2003; PATRICIO, 2003).

O ovo é um meio propício para desenvolvimento de microrganismos e possui barreiras intrínsecas de defesa contra a sua multiplicação. A cutícula é formada por uma camada delgada de glicoproteína que reveste a casca e protege 99% dos poros em curto período. A penetração de bactérias é limitada pela casca, que se constitui em barreira física, pelas membranas da casca, que

servem como filtros e retêm os microrganismos e o albume que possui mecanismos químicos e físicos que impedem a multiplicação e o deslocamento bacteriano (BOARD & TRANTER, 1986; MORRIS, 1990).

Essa proteção é importante, pois de acordo com BAYLE et al. (1998), um único ovo contaminado com *Salmonella* na incubadora pode disseminar a bactéria no ambiente. Todas as fontes potenciais de contaminação são importantes, mas o ovo fértil é crítico na cadeia de produção (LEITÃO, 2001).

A porosidade, qualidade da cutícula, espessura da casca, rachadura e trincas favorecem a penetração bacteriana no ovo (SONCINI & BITTENCOURT, 2003). No entanto, a penetração pode ocorrer em ovos íntegros antes do estabelecimento cuticular protéico. A contaminação externa da casca de um ovo íntegro pode resultar no estabelecimento da infecção durante a incubação (BOARD, 1968).

GAST (1997) descreveu que a penetração da *Salmonella* na casca do ovo e na membrana da casca pode resultar em transmissão direta do agente para o embrião em desenvolvimento ou expor o pinto durante a eclosão. Porém, esses valores são baixos, como constatado por WILDING & BAXTER-JONES (1985), quando isolaram *Salmonella* de um entre 10.000 ovos examinados.

Métodos de desinfecção química dos ovos procuram reduzir o número de microrganismos da casca e devem ser realizados imediatamente após a coleta (MARQUES, 1994). Embora possa ocorrer contaminação dos ovos após esta higienização foi demonstrado que o manuseio de ovos comerciais pode propiciar um alto nível de contaminação com *Salmonella* Enteritidis e que o embandejamento manual dos ovos é um ponto de recontaminação (HENZLER et al., 1999; SONCINI & BITTENCOURT, 2003).

Neste estudo, foram avaliados os efeitos dos compostos quaternários de amônia na eliminação de *Salmonella* Enteritidis fagotipo 4 (PT4) inoculada na casca de ovos sanitizados e na sua capacidade de penetração através da casca. Avaliaram-se ainda, os efeitos da *Salmonella* Enteritidis inoculada na casca não sanitizada e na cavidade alantóide quanto à habilidade de migrar para outros componentes dos ovos e de alterar os índices

de incubação, de determinar mortalidade embrionária e de infectar o trato gastrointestinal dos pintos ao nascimento de duas linhagens de frango de corte.

MATERIAL E MÉTODOS

Locais

Foram realizados dois experimentos variando apenas as linhagens de frango estudadas, o primeiro com ovos de frangos de crescimento rápido (Ross) e o segundo com ovos de aves de crescimento lento (ISA Label, “pescoço pelado”).

Os experimentos foram conduzidos no Setor de Doenças de Aves e no Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Medicina Veterinária da Escola de Veterinária (EV) da Universidade Federal de Goiás (UFG).

Experimentos

Foram utilizados 302 ovos férteis da linhagem Ross e 290 da linhagem ISA Label obtidos de matrizes de 42 e 36 semanas de idade, respectivamente, provenientes de duas granjas localizadas na região Centro-Oeste, Brasil. Nestas granjas, o controle de *Salmonella* sp., era realizado rotineiramente análises de resíduos de incubação.

Os ovos foram transportados em condições ambientais ao laboratório de doenças de aves, onde foram pesados, identificados e distribuídos em seis tratamentos, sendo quatro submetidos à inoculação pelo manuseio e dois pela cavidade alantóide, assim discriminados:

Tratamento 1 (PC) - constituído de 50 ovos da linhagem Ross e 48 ovos da ISA Label. Aproximadamente quatro horas após a coleta e chegada ao laboratório fez-se a pulverização dos ovos com um composto derivado de quaternária de amônia, na concentração de 1 000 ppm. Os ovos foram mantidos em temperatura ambiente, em torno de 18 horas, até o momento de serem inoculados. Foram inoculados na casca com 0,1 mL de solução salina, tamponada e esterilizada a 0,85% (placebo), constituindo-se assim o grupo controle (PC) do tratamento pulverizado e inoculado com a *Salmonella* Enteritidis PT4 (PI).

Tratamento 2 (PI) - constituído de 50 ovos da linhagem Ross e 48 da ISA Label que foram pulverizados com compostos derivados de quaternária de amônia na diluição de 1000ppm, mantidos nas mesmas condições do tratamento 1(PC) e inoculados na casca com 0,1mL de solução salina a 0,85% contendo aproximadamente $1,5 \times 10^2$ unidades formadoras de colônia - UFC/mL de *Salmonella* Enteritidis PT4.

Tratamento 3 (NPC) - constituído de ovos não pulverizados, sendo 50 da linhagem Ross e 48 ovos da ISA Label. Os ovos foram mantidos por 18 horas à temperatura ambiente e inoculados com 0,1 mL de placebo na casca - grupo controle do NPI.

Tratamento 4 (NPI) - composto de ovos não pulverizados e inoculados, sendo 50 da linhagem Ross e 48 ovos da ISA Label. Os ovos foram mantidos a temperatura ambiente por 18 horas e inoculados na casca com 0,1mL de solução salina a 0,85%, tamponada, contendo $1,5 \times 10^2$ UFC/mL do patógeno.

Tratamento 5 (CAC) - constituído de 50 ovos da linhagem Ross e 48 ovos da ISA Label, mantidos a temperatura ambiente por 18 horas, e inoculados no albume, denominado em todo o trabalho de cavidade alantóide, com 0,1mL do placebo. Constituiu-se assim o grupo controle dos ovos inoculados com o patógeno na cavidade alantóide (CAI).

Tratamento 6 (CAI) - constituído de 50 ovos da linhagem Ross e 48 ovos da ISA Label não pulverizados, mantidos a temperatura ambiente por 18 horas, e inoculados na cavidade alantóide com 0,1mL de solução salina, tamponada a 0,85% contendo $1,5 \times 10^2$ UFC/mL de *Salmonella* Enteritidis PT4.

Com 24 horas de incubação, dois ovos de cada tratamento foram retirados e submetidos à análise bacteriológica.

Ovoscoopia

Cada ovo foi examinado por ovoscoopia após 96h e 438h de incubação. Os ovos que não apresentaram embriões viáveis foram retirados do processo e analisados quanto ao período de mortalidade embrionária e dois, por tratamento, encaminhados para análise bacteriológica.

Aos 19 dias de incubação, os ovos foram colocados em embalagens individuais para se obter o peso de cada pinto em relação ao ovo.

Embriodiagnóstico

O embriodiagnóstico foi realizado quebrando ovo por ovo pela metade e vertendo o conteúdo em uma placa de Petri. O período da mortalidade foi anotado em fichas próprias. Leu-se como infértil o ovo com um denso ponto branco; férteis e mortos até quatro dias (mortalidade precoce); férteis e mortos de cinco até 18 dias (mortalidade intermediária); férteis e mortos de 19 a 22 dias (mortalidade tardia).

Dois ovos por subgrupo, às 96h, 432h e 528h de incubação foram colhidos para pesquisa e quantificação da *Salmonella* Enteritidis na casca, nas membranas da casca, na gema/saco da gema, assim como nos albumes/líquidos da cavidade alantóide e nos embriões (a partir de 15 dias de incubação).

Rendimento de incubação

A eclodibilidade de ovos férteis foi calculada pelo número de ovos eclodidos multiplicado por 100, dividido pelo número de ovos férteis. A eclodibilidade total foi calculada pelo número de ovos eclodidos multiplicado por 100, dividido pelo número de ovos totais incubados. A fertilidade foi calculada pelo número de ovos fertilizados multiplicado por 100, dividido pelo número total de ovos.

Análise do mecônio

Após a eclosão, os pintos provenientes de ovos inoculados e controles foram pesados e o mecônio foi colhido por *swab* cloacal ou por compressão na região dorso-ventral dos cecos. Empregou-se a metodologia de análise bacteriológica descrita em BRASIL (1999).

Preparação do inóculo

O inóculo foi preparado com *Salmonella* Enteritidis PT 4 isolada de amostras oriundas de frangos de corte cedida pela Prof^a Dra. Iolanda Aparecida

Nunes, da Escola de Veterinária da Universidade de Goiás. A concentração do inóculo foi de $1,5 \times 10^2$ UFC/mL, conforme descrito em BRADSHAW et al. (1990).

Para obtenção do inóculo a cepa foi repicada em ágar verde brilhante e incubada a 37°C , por 18-20h. Em seguida, as células foram suspensas em solução salina tamponada a 0,85%, mantidas a 4°C e concentração de $1,5 \times 10^2$ UFC/mL ajustada com auxílio da escala de Mac Farland (FERNÁNDEZ et al., 2001). A concentração foi confirmada pelo plaqueamento das diluições decimais seriadas em ágar verde brilhante, com posterior incubação a 37°C e contagem das UFC de *Salmonella*.

Inoculação dos ovos

Todos os procedimentos de inoculação foram realizados com material esterilizado e em Câmara Asséptica com grau de segurança nível II. Os ovos dos tratamentos PI e NPI foram expostos aos inóculos de *Salmonella* Enteritidis PT 4 por contato com as mãos revestidas com luvas descartáveis, simulando possível contaminação cruzada após o processo de sanitização dos ovos.

Cada luva foi umedecida com 0,1 mL de uma solução salina tamponada a 0,85%, contendo $1,5 \times 10^2$ UFC/ mL. Com auxílio de uma seringa de tuberculina, 0,1 mL da solução foi depositada nas mãos revestidas com as luvas. Cada ovo embrionado foi mantido por um período de 20 segundos nas mãos contaminadas, sendo sua superfície totalmente molhada pela solução. Imediatamente após a inoculação os ovos foram encaminhados às incubadoras. O mesmo procedimento foi realizado com os tratamentos controles PC e NPC, empregando-se solução salina a 0,85%.

Os ovos dos tratamentos CAC e CAI foram inoculados na cavidade alantóide. Inicialmente, cada ovo foi desinfetado com uma solução de tintura de iodo a 10% no local da perfuração da casca. O ovo foi perfurado com auxílio de uma furadeira com broca de calibre 15 mm na região da câmara de ar. Inoculou-se, com auxílio de uma seringa de tuberculina de 1 mL, 0,1 mL de uma solução salina a 0,85%, tamponada e esterilizada, contendo $1,5 \times 10^2$ UFC por mL. A agulha, de calibre 12,7 X 0,33 mm, foi introduzida na câmara de

ar e o conteúdo colocado na cavidade alantóide, num ângulo aproximado de 30°. Após a inoculação, os orifícios foram vedados com parafina e os ovos transferidos para a incubadora.

Os ovos do grupo controle foram submetidos aos mesmos procedimentos empregando solução salina a 0,85%, tamponada e esterilizada (placebo). Os ovos inoculados e controles foram encaminhados imediatamente para incubadoras, de viragem automática a cada quatro horas onde a temperatura foi ajustada para 37,5 °C e a umidade relativa para 60%. A temperatura e a umidade foram registradas duas vezes ao dia.

Enumeração e Pesquisa de *Salmonella*

a)Preparação das amostras

Imediatamente após a ovoscopia, dois ovos de cada tratamento foram retirados, colocados em sacos esterilizados e mantidos a 4 °C por um período máximo de 24h quando foram processados.

Com tesouras e pinças esterilizadas, a casca foi cuidadosamente quebrada e fragmentos foram colocados em placas de Petri para a pesagem de 0,5 g em balança com precisão de 0,001 g. Após a pesagem, as amostras foram transferidas para tubos de ensaio de 14x140 cm contendo 4,5 mL de caldo selenito cistina (CS).

O conteúdo do ovo foi vertido em outra placa, deixando o albume e o líquido alantóide escorrer o máximo possível. As membranas externas e internas foram retiradas e transferidas para uma terceira placa. Pesaram-se 0,5 g do conjunto de membranas que imediatamente foram transportados para um tubo de ensaio de 14x140 cm contendo 4,5 mL de CS. Com auxílio de pipetas volumétricas de 1mL, 0,5 mL do albume ou líquido alantóide, assim como 0,5 mL do conteúdo da gema ou do saco vitelínico foram transferidos para tubos de ensaio de 14x140 cm contendo 4,5 mL de CS.

O mesmo procedimento foi realizado com os embriões, depois de separá-los de seus anexos e com o mecônio.

b) Quantificação e identificação de *Salmonella*

A quantificação do patógeno foi realizada de acordo com a técnica de BRADSHAW et al. (1990) com modificações. Porções de 0,5 g da casca e 0,5 g do conjunto de membranas da casca dos ovos foram pesadas separadamente e colocadas em 4,5 mL de CS. Diluições decimais seriadas sucessivas foram realizadas até 10^{-5} , utilizando-se água peptonada a 0,1%. Realizaram-se plaqueamentos, em duplicata, de 0,1 mL de diferentes diluições em ágar MacConkey, ágar verde brilhante e ágar Hektoen os quais foram incubados a 37 °C por 24 h.

A leitura foi realizada selecionando-se e contando as unidades formadoras de colônias com características morfológicas de *Salmonella*. Os tubos inoculados contendo CS também foram incubados a 37 °C por 24h e, caso não houvesse crescimento sugestivo de *Salmonella* nos meios de ágar verde brilhante e de Hektoen, alíquotas do caldo foram transferidas para os meios seletivos, incubados a 37 °C por 24h e registrados com crescimento $<10 \times 10^0$. De três a cinco unidades formadoras de colônias por placa foram transferidas para tubos contendo o tríplice açúcar ferro (TSI), os quais foram incubados a 37 °C por 24 h.

Tubos de TSI com crescimento sugestivo de *Salmonella* foram submetidos ao teste da urease, produção do indol, vermelho metila, motilidade, teste do malonato e lisina descarboxilase. Aqueles que apresentaram reações bioquímicas compatíveis com *Salmonella* foram submetidos ao teste sorológico com soro polivalente anti-O de *Salmonella*. Amostras positivas à sorologia foram remetidas à Fundação Osvaldo Cruz (FIOCRUZ) para confirmação do sorovar isolado.

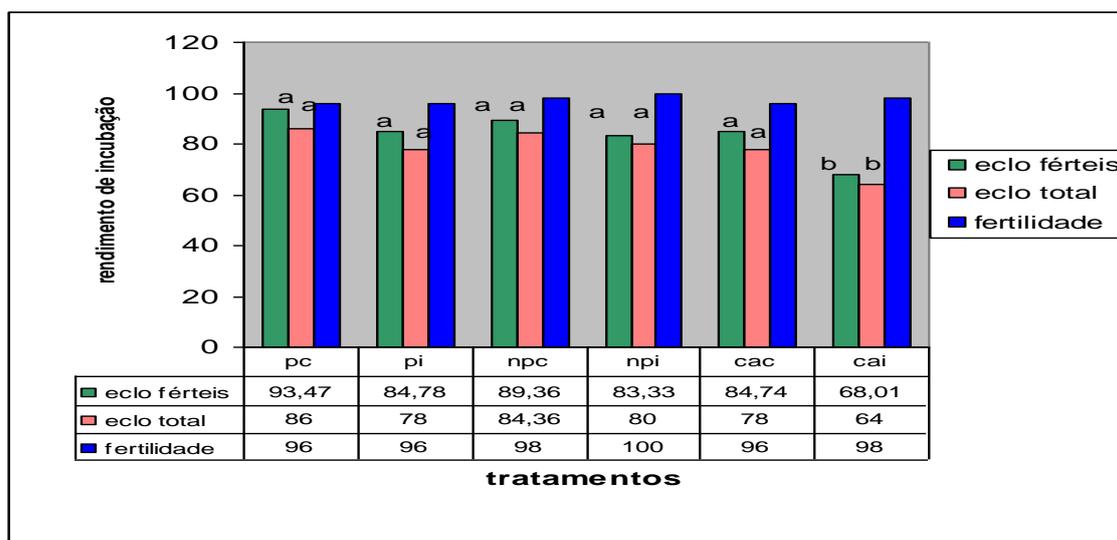
Análises estatísticas

O teste não paramétrico do qui-quadrado (X^2) foi empregado para avaliar a freqüência da mortalidade embrionária, rendimento de incubação e de pintos nascidos infectados. Para avaliar o efeito dos compostos quaternários de amônia na casca quanto à presença da *Salmonella* Enteritidis nas duas linhagens, utilizou-se o teste do Kruskal - Wallis (SAMPAIO, 1998).

RESULTADOS

Experimento 1 - Linhagem de crescimento rápido-Ross

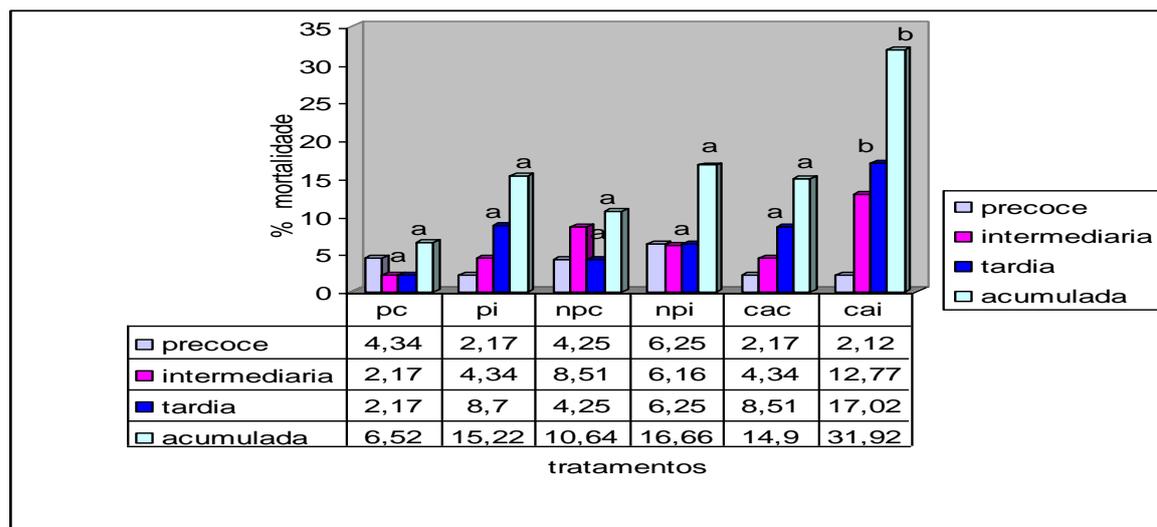
Visualiza-se na Figura 1, que, os tratamentos não apresentaram diferenças significativas para as variáveis de fertilidade para a linhagem Ross. O mesmo aconteceu com a eclodibilidade total e a eclodibilidade de ovos férteis dos ovos sanitizados controle (PC), e inoculados (PI), em relação aos não sanitizados.



*Letras diferentes nas colunas de mesma cor indicam diferença ($P < 0,05$); pc=ovos pulverizados inoculados na casca com placebo, pi=ovos pulverizados na casca inoculados com *Salmonella* Enteritidis(SE), npc=ovos não pulverizados inoculados na casca com placebo, npi=ovos não pulverizados inoculados na casca com SE, cac=ovos inoculados na cavidade alantóide com placebo, cai=ovos inoculados na cavidade com SE

FIGURA 1 –Rendimento da incubação segundo os tratamentos na Ross

Quando se analisa a inoculação via casca, não se observa diferença ($P > 0,05$) entre os agentes inoculados nos diferentes tratamentos. Para inoculação pela via alantóide (CAI), nota-se menor eclodibilidade total e dos ovos férteis ($P < 0,05$) em relação aos ovos inoculados via casca.



Letras diferentes em colunas da mesma cor indicam diferenças significativas ($P < 0,05$); pc=ovos pulverizados inoculados na casca com placebo, pi=ovos pulverizados na casca inoculados com *Salmonella* Enteritidis (SE), npc=ovos não pulverizados inoculados na casca com placebo, npi=ovos não pulverizados inoculados na casca com SE, cac=ovos inoculados na cavidade alantóide com placebo, cai=ovos inoculados na cavidade alantóide com SE

FIGURA 2 –Mortalidade embrionária em função dos tratamentos.

Quando *Salmonella* Enteritidis foi inoculada via cavidade alantóide (CAI), a mortalidade tardia e a acumulada se manifestaram de forma diferente ($P < 0,05$) em relação aos demais tratamentos (Figura 2). No entanto, a mortalidade precoce e as intermediárias não diferiram ($P > 0,05$) entre os tratamentos.

Analisando os valores das UFC (Tabela 1), observa-se que *Salmonella* Enteritidis esteve presente ($P > 0,05$), durante o processo de incubação, tanto nos tratamentos onde os ovos foram sanitizados como naqueles não sanitizados. Após 528h de incubação, ocorreu maior multiplicação da *Salmonella* Enteritidis, sendo que, nos ovos sanitizados e inoculados (PI), em duas amostras a *Salmonella* Enteritidis esteve presente no albume e gema às 96h e 528h de incubação. Ressalta-se que não ocorreu recuperação da *Salmonella* Enteritidis em ovos férteis, durante o período de incubação, nos grupos-controle.

TABELA 1 -Valores médios da contagem em log de *Salmonella* Enteritidis nos componentes dos ovos, no período de incubação, submetidos ou não à sanitização com Compostos Quaternários de Amônia

Componentes dos ovos	Casca sanitizada	Casca não sanitizada
	Inoculada	Inoculada
	24h de incubação	
	UFC(log)	UFC(log)

Casca	0,903	1,716
Membranas	1,103	1,505
96h de incubação		
Casca	1,653	3,191
Membranas	1,000	2,201
432h de incubação		
Casca	0,301	1,000
Membranas	A	<10
528h de incubação		
Casca	6,778	3,447
Membranas	6,954	3,602

pi= sanitizada com CAQ e inoculado com a *Salmonella* Enteritidis (SE) ;npi = não sanitizada com CAQ e inoculado com a SE; A= ausência de UFC de SE, Valor K-Wallis p=7,810

Para a inoculação na cavidade alantóide, que simula a transmissão vertical, notou-se que a maioria das amostras e estruturas analisadas foi positiva para *Salmonella* Enteritidis, mostrando que esta se manteve e disseminou para todos os componentes do ovo desde o início da incubação. *Salmonella* Enteritidis se manteve viável ($P < 0,05$) em 5/8 (62,50%) das cascas sanitizadas e em 7/8 (87,5%) das não sanitizadas (Tabela 2). Em 1/8 (12,50%) e 3/8 (37,50%) das amostras dos tratamentos que foram inoculados nas cascas, sanitizadas e não sanitizadas, com a *Salmonella* Enteritidis (PI) e (NPI) o patógeno migrou para a cavidade alantóide ($P < 0,05$).

TABELA 2 - Frequência de isolamento de *Salmonella* Enteritidis nos componentes de ovos férteis durante a incubação.

Componentes dos ovos	casca				Cavidade	
	sanitizada -pi		não sanitizada-npi		cai	
	n ^o	%	n ^o	%	n ^o	%
Cascas e membranas	5/8	62,50 ^a	7/8	87,50 ^b	7/8	87,50 ^b
Albume/Líquido alantóide	1/8	12,50 ^a	3/8	37,50 ^b	7/8	87,50 ^c
Gema / saco vitelínico	1/8	12,50 ^a	1/8	12,50 ^a	7/8	87,50 ^b
Embriões	1/4	25,00	2/4	50,00	4/4	100,00

letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística ($P < 0,05$); pi= sanitizada com CAQ e inoculado com a *Salmonella* Enteritidis (SE) ;npi = não sanitizada com CAQ e inoculado com a SE; CAI=inoculado na cavidade alantóide com a SE

Por outro lado, na comparação com os ovos que receberam o agente infeccioso na cavidade alantóide, notou-se a diferença ($P < 0,05$) em relação aos inoculados na casca, mostrando que a bactéria por esta via migrou para os componentes dos ovos com mais facilidade do que quando inoculados na casca sanitizada ou não.

Verifica-se na Tabela 3 que a relação ovo/pinto esteve entre 67,74% e 72,14% , porém sem diferença ($P > 0,05$) entre os diferentes tratamentos.

TABELA 3- Relação peso médio do ovo / peso médio segundo os tratamentos e a vias de inoculação de pintos Ross

Tratamentos	Casca não sanitizadas					
	Casca sanitizadas		Cavidade alantóide			
	Controle	Inoculada	controle	Inoculada	controle	Inoculada
Peso ovo	65,83	71,72	66,07	67,65	66,80	66,52
Peso pinto	47,37	48,18	47,66	45,68	46,86	46,39
Relação (%)	71,96	67,18	72,14	76,52	70,15	69,74

Os ovos inoculados com *Salmonella* Enteritidis na casca, sanitizada ou não, apresentaram diferença ($P < 0,05$) em relação ao número de pintos nascidos com colonização intestinal positiva (Tabela 4), o sanitizante reduziu a contaminação dos mecônios. Também, houve diferença ($P < 0,05$) quando a inoculação foi via alantóide, simulando a contaminação durante formação do ovo, com os tratamentos que simularam a transmissão horizontal, via casca, tanto dos ovos sanitizados quanto dos ovos não sanitizados.

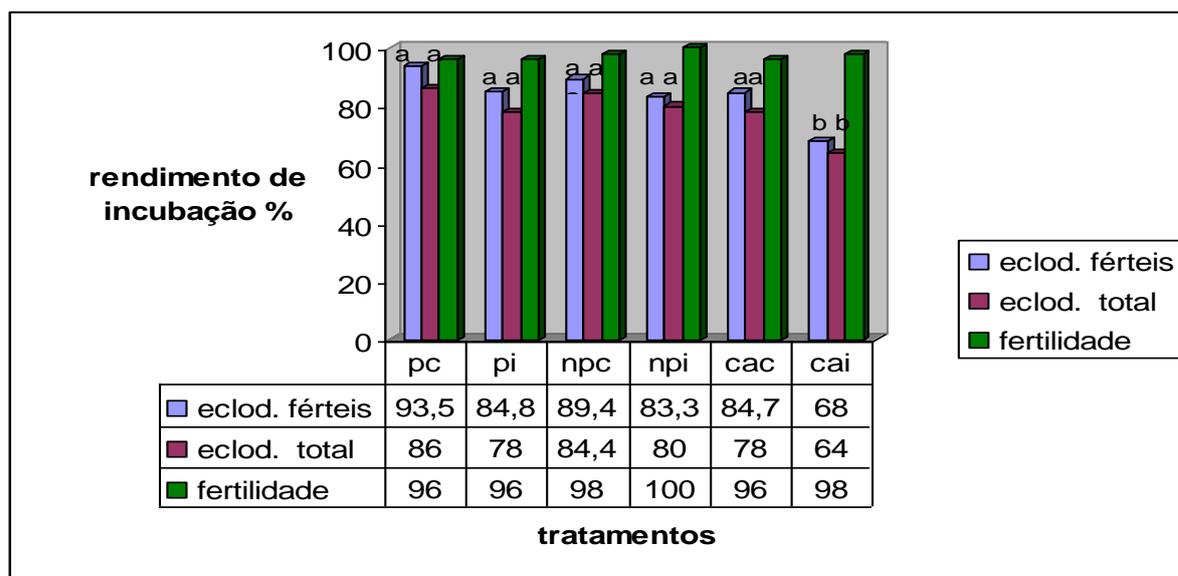
TABELA 4 - Resultado bacteriológico dos swabs de mecônios de 180 pintos com 15h de nascimento oriundos de ovos experimentalmente inoculados na casca e na cavidade alantóide.

Tratamentos	Examinados		Positivos	
	n ^o	n ^o	n ^o	%
Casca sanitizada – PI	30	09		30,00a
Casca não sanitizada -NPI	30	15		50,00b
Inoculação cavidade-CAI	30	23		76,67c
total pintos / inoculados	90	47		52,22
total pintos/ controles	90	0		0

*letras diferentes na mesma coluna indicam diferença de $P < 0,05$

Experimento 2 - linhagem de crescimento lento- ISA Label

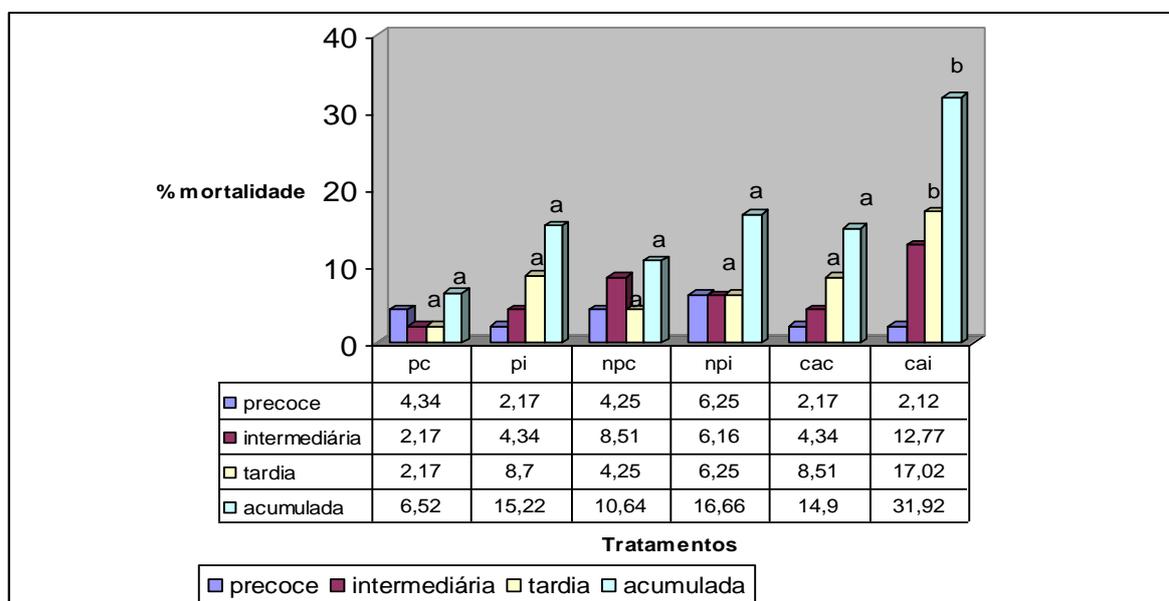
A eclodibilidade total e de ovos férteis sanitizados e não sanitizados não apresentaram diferença significativa (Figura 3). Contudo, quando se avaliou a via de inoculação, observou-se diferença ($P < 0,05$) entre as variáveis de eclodibilidade tanto dos ovos férteis como totais. Ocorreu uma menor eclodibilidade ($P < 0,05$) quando o patógeno foi o inóculo utilizado.



Letras diferentes nas colunas de mesma cor indicam diferenças significativas ($P < 0,05$); pc=ovos pulverizados inoculados na casca com placebo, pi=ovos pulverizados na casca inoculados com *Samonella* Enteritidis (SE), npc=ovos não pulverizados inoculados na casca com placebo, npi=ovos não pulverizados inoculados na casca com SE, cac=ovos inoculados na cavidade alantóide com placebo, cai=ovos inoculados na cavidade alantóide com SE

FIGURA 3- Rendimento de incubação em função dos tratamentos na ISA Label

As freqüências de mortalidade embrionária (Figura 4) entre os tratamentos durante a incubação PC, PI, NPC, NPI e CAC não foram diferentes ($P > 0,05$). Todavia, a freqüência da mortalidade ocorrida no grupo CAI apresentou diferenças ($P < 0,05$) em relação ao controle e demais tratamentos.



Letras diferentes nas colunas de mesma cor indicam diferenças significativas ($P < 0,05$); pc=ovos pulverizados inoculados na casca com placebo, pi= pulverizados na casca inoculados com *Samonella* Enteritidis (SE), npc = ovos não pulverizados inoculados na casca com placebo, npi= não pulverizados inoculados na casca com SE, cac=ovos inoculados na cavidade alantóide com placebo, cai= inoculados na cavidade alantóide com SE

FIGURA 4- Mortalidade embrionária em função dos tratamentos

Analisando os resultados da contagem de *Salmonella* Enteritidis (Tabela 5), observou-se que esta esteve presente tanto na incubação dos ovos sanitizados como dos não sanitizados. O patógeno foi isolado da casca e das membranas da casca do grupo dos ovos sanitizados e não sanitizados às 24h de incubação.

Mesmo os ovos sanitizados e, posteriormente, inoculados com *Salmonella* Enteritidis, a solução de quaternária de amônia (1000 ppm) não impediu a penetração do patógeno e não evitou a contaminação dos ovos. Houve um aumento da população do patógeno na casca e nas membranas ao final da incubação nos ovos sanitizados.

Ressalta-se que nos tratamentos controles a *Salmonella* Enteritidis não foi isolada nos componentes dos ovos examinados.

TABELA 5 -Valores médios da Contagem em log de *Salmonella* Enteritidis nos componentes dos ovos, no período de incubação, submetidos ou não à sanitização com Compostos Quaternários de Amônia na ISA Label

Componentes dos ovos	Casca sanitizada	Casca não sanitizada
	Inoculada-PI	Inoculada-NPI
24h de incubação		
	UFC(log)	UFC(log)
Casca	1,000	1,518
Membranas	A	A
96h de incubação		
Casca	0,854	A
Membranas	<10	<10
432h de incubação		
Casca	A	<10
Membranas	<10	1,301
528h de incubação		
Casca	5,146	A
Membranas	4,041	A

Valor de K-Wallis=7,810 (A) = ausência de UFC da *Salmonella* Enteritidis

De acordo com a Tabela 6, *Salmonella* Enteritidis manteve-se viável em 3/8 (37,50%) das cascas sanitizadas e em 5/8 (62,50%) das não

sanitizadas. Em 1/8 (12,50%) e 2/8 (25,00%) das amostras examinadas dos tratamentos PI e NPI, respectivamente, o patógeno migrou para o líquido alantóide. E em 1/8 (12,50%) das cascas sanitizadas e não sanitizadas, o patógeno atingiu o saco vitelínico. Entretanto, as diferenças registradas entre os tratamentos sanitizados e não sanitizados não foram significativas.

TABELA 6 -Frequência de isolamento de *Salmonella* Enteritidis nos componentes de ovos férteis durante a incubação.

Componentes dos ovos	Vias de Inoculação					
	Casca sanitizada e inoculada		Casca não sanitizada e inoculada		Cavidade alantóide	
	n ^o	%	n ^o	%	n ^o	%
Cascas e membranas	3/8	37,50	5/8	62,50	5/8	62,50
Líquido alantóide	1/8	12,50a	2/8	25,00a	7/8	87,50b
Gema / saco vitelínico	1/8	12,50a	1/8	12,50a	5/8	87,50b
Embriões	1/4	25,00	0/4	0,00	2/4	50,00

*letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística (P<0,05)

Quando se compara com os tratamentos nos quais os ovos receberam o agente infeccioso na cavidade alantóide (CAI) notou-se diferença (P<0,05) em relação aos grupos inoculados na casca. Portanto, a bactéria nesta via suplantou as defesas dos ovos com maior facilidade do que quando inoculada na casca. Os quatro embriões de ovos não sanitizados não foram atingidos (Tabela 6).

A relação de peso ovo/pinto (Tabela 7) se situou entre 65,85% e 72,53%, identificando uma menor relação dos inoculados na cavidade alantóide *Salmonella* Enteritidis.

TABELA 7 - Relação peso médio do ovo / peso médio dos pintos segundo os tratamentos e a vias de inoculação de pintos ISA Label.

	Cascas				Cavidade alantóide	
	Sanitizadas		Não sanitizadas		CAC	CAI
Tratamentos	PC	PI	NPC	NPI		
Peso ovo	61,95	62,10	61,54	62,50	62,30	62,90
Peso pinto	44,53	44,44	44,64	44,55	44,35	41,42
Relação (%)	71,32	71,56	72,53	71,28	71,19	65,85

Os ovos inoculados com *Salmonella* Enteritidis na casca, sanitizados ou não (Tabela 8), originaram 6,67% e 10,00% de pintos nascidos com colonização intestinal positiva (P>0,05), respectivamente. Porém, os ovos inoculados na cavidade alantóide, simulando a transmissão vertical,

apresentaram 26,67% de mecônios positivos. As frequências de isolamentos positivos entre pintos oriundos de ovos inoculados na casca e cavidade alantóide foram diferentes ($P < 0,05$).

TABELA 8 - Resultado bacteriológico dos mecônios de 180 pintos após 15h de nascimento para a *Salmonella* Enteritidis

Tratamentos	Examinados		Positivos	
	n°	n°	n°	%
Casca Pulverizada Inoculada -PI	30	2	2	6,67 ^{a*}
Casca não pulverizada inoculada-NPI	30	3	3	10,00 ^a
Cavidade alantóide Inoculada -CAI	30	8	8	26,67 ^b
Total de pintos / inoculados	90	13	13	14,45
Total de pintos / controles	90	0	0	0

*letras diferentes na mesma coluna indicam diferença de $P < 0,05$

DISCUSSÃO

A produção de pintos saudáveis é um dos principais objetivos dos incubatórios. No presente ensaio, os ovos apresentaram alto índice de fertilidade em todos os tratamentos e linhagens, ou seja, acima de 95%. Dentre os parâmetros de incubação avaliados, a fertilidade é um dos mais importantes, sendo aceitável uma taxa de 90% de fertilidade (HEIR & JARP, 2001). Os pesos médios dos ovos incubados foram de 60 a 74g estando de acordo com PATRICIO (2003). O pinto ao nascer representa 65 a 72% do peso do ovo. Neste sentido, embora os ovos tenham sido inoculados na casca e cavidade alantóide antes de serem incubados, os dados estão de acordo com as condições normais do processo de incubação artificial, sugerindo que a inoculação não interferiu na relação ovo / pinto.

A eclodibilidade total e dos ovos férteis inoculados na casca não foi afetada pela *Salmonella* Enteritidis tanto na linhagem Ross como na ISA Label, embora o agente infeccioso estivesse presente durante todo o processo. Experimentos anteriores também não indicaram efeito de *Salmonella* Typhimurium (CASON et al., 1994) e *Salmonella* Enteritidis (LISTER, 1988) para os índices de incubação.

Por outro lado, a eclodibilidade foi afetada quando a via de inoculação foi a cavidade alantóide. Ao final da incubação, a *Salmonella*

Enteritidis propiciou aumento da mortalidade embrionária ($P < 0,05$) para as linhagens Ross e ISA Label de 17,02% e 13,04%, respectivamente, o que resultou naturalmente em menores taxas de eclodibilidade de ovos férteis (68,01% e 67,39%) e de ovos totais (64% e 65,69%) para aves Ross e ISA Label. As salmonelas foram provavelmente inibidas e algumas mortas pelas substâncias antibacterianas do ovo (lisozimas e ovotransferrinas) e ao final da incubação entraram em fase log o que determinou mortalidade de 17,02% e 13,04% para as linhagens Ross e ISA Label, respectivamente.

Considerando que a bactéria foi depositada no albume no início da incubação e este componente apresenta baixo teor de ferro, mas suficiente para permitir o desenvolvimento de quatro gerações de *Salmonella* Enteritidis a 25 °C. (CLAY & BOARD, 1991). Quando a reserva de ferro se esgota, a bactéria entra na fase lag (HUMPHREY, 1994) e por algum fato nas últimas horas de incubação entrou em fase log.

A bactéria inoculada tanto na casca sanitizada como não sanitizada permaneceu viável durante todo o período de incubação. O patógeno manteve-se em baixos níveis de unidades formadoras de colônias no início do processo, mas ao final notou-se aumento da população bacteriana. Este achado discorda de WILLIAM & DILLAR (1968) que relataram que o desenvolvimento embrionário torna o ambiente desfavorável para multiplicação bacteriana. Altos números de unidades formadoras de colônias na casca e nas membranas, neste estudo, podem ser explicados pelo tempo entre a morte embrionária e a coleta das amostras (528h).

A sanitização dos ovos com compostos quaternários de amônia (1.000ppm) e posteriormente inoculação com a *Salmonella* Enteritidis não impediu a contaminação da casca e a sua penetração nas membranas da casca. Do mesmo modo, HIMATHONGKLHAM et al. (1999) contaminaram experimentalmente cascas de ovos com *Salmonella* Enteritidis e posteriormente promoveram a desinfecção com várias substâncias químicas. Estes pesquisadores concluíram que os desinfetantes utilizados não foram eficientes para descontaminar a casca e a membrana da casca. Por outro lado, MARTINEZ et al. (1999) esclareceram que a variação nos resultados de eficácia destes compostos pode ser decorrente da concentração dos produtos.

A concentração utilizada do sanitizante, no presente estudo, não destruiu completamente o patógeno, pois na eclosão observaram-se 30% e 50% de mecônios positivos nos tratamentos inoculados na casca sanitizada e não sanitizada, respectivamente. BAYLE et al. (1992) demonstraram que um único ovo contaminado por *Salmonella* Enteritidis pode contaminar outros ovos durante a eclosão e determinar a colonização de outras aves por contaminação cruzada.

Verificou-se que, em todos períodos da incubação, ocorreu a migração da *Salmonella* Enteritidis para as membranas das cascas, independentemente do uso do sanitizante. Uma vez que o patógeno atinge a casca e as membranas, não há mecanismo de eliminá-lo e, em conseqüência, ocorrerá a sua participação no processo de incubação com possibilidade de contaminar os pintos ao nascimento.

SONCINI & BITTENCOURT (2003) afirmaram que a porosidade, a qualidade da cutícula, a espessura da casca e a presença de rachadura e trincas são fatores que influenciam a penetração bacteriana no ovo. HUTCHISON et al. (2003) apontaram vários fatores que aumentam a sobrevivência das bactérias na superfície da casca ou que reduzem os seus sistemas de defesa. Dentre esses, podem ser relacionadas às condições físicas da cutícula e a integridade da casca, a presença de água na casca, a concentração de ferro na água que entra em contato com o ovo e a presença de material orgânico. MESSENS et al. (2005), em artigo de revisão, relataram que existem fatores extrínsecos e intrínsecos que podem afetar a penetração da *Salmonella* na casca. Dentre os extrínsecos, destacaram a cepa e a concentração de bactérias, a temperatura, a umidade e a presença de matéria orgânica. Em relação aos intrínsecos, a cutícula, as características da casca (integridade, espessura, porosidade, defeitos) e propriedades das membranas.

Os mecanismos de defesa dos ovos foram suplantados em poucas amostras quando a via de inoculação foi a casca. A bactéria permaneceu na superfície e invadiu as membranas da casca na maioria das amostras, no entanto, poucas amostras colonizaram o saco vitelínico, o líquido alantóide e, ainda poucos embriões foram positivos para *Salmonella* Enteritidis.

As membranas internas da casca são compostas de queratina, fibras de mucina com albume nos interstícios e agem como filtros de microrganismos. A ligação entre as membranas é descrita como tênue e com falhas, dispostas de forma irregular, apresentando distâncias entre elas que podem permitir a permanência de bactérias que, pelo acesso à água, podem se reproduzir e destruir a função das membranas principalmente quando se tem um inóculo bacteriano e os ovos são mantidos a 37 °C (NASCIMENTO & SALLE, 2003).

CASON et al. (1993) observaram que imediatamente após a inoculação de *Salmonella*, 100% das amostras da casca e membranas foram positivas para o patógeno. Após 17 e 21 dias de incubação ocorreu uma redução de positividade para 38%, o que levou os autores a suspeitar de que a bactéria morreu ou o número reduziu-se a ponto de não ser detectado. Segundo os autores, o ambiente da casca e membranas pode ser hostil ao desenvolvimento bacteriano, dado que em 62% das amostras o patógeno desapareceu, mas ao mesmo tempo pode ser favorável ao desenvolvimento uma vez que alguns ovos proporcionaram contagem acima de 10⁶ UFC de *Salmonella* Typhimurium. Os mesmos autores comprovaram que muitas aves adquirem a *Salmonella* de suas próprias cascas e membranas ao nascimento. Os dados obtidos no presente trabalho referentes aos componentes dos ovos e mecônios 15h após eclosão confirmaram estes resultados.

Em relação à migração da *Salmonella* Enteritidis, ovos inoculados na cavidade alantóide apresentaram diferenças significativas quando comparados àqueles inoculados na casca. Nesta via, o patógeno migrou para os componentes dos ovos na maioria das amostras desde o início da incubação. Há diferentes opiniões a respeito da presença da bactéria no interior do ovo. MULIARI & ZAVANELLA (1994) relataram que o albume não é um substrato apropriado para o desenvolvimento da *Salmonella* Enteritidis, o que foi confirmado por OLIVEIRA & SILVA (2000). Quando a bactéria penetra no ovo atingindo o albume, pode se multiplicar por curto período de tempo, e de forma rápida ser reduzida numericamente, pois os componentes do albume e o pH são desfavoráveis ao seu desenvolvimento (BOARD, 1968).

Constatou-se, em ambas as linhagens, diferença significativa entre as freqüências de pintos positivos para o patógeno inoculado na casca

sanitizada em relação aos não sanitizados e aos inoculados na cavidade alantóide ao avaliar-se o número de pintos positivos para *Salmonella* Enteritidis. Tal resultado indica que os pintos se infectaram em momentos diferentes. No caso dos ovos inoculados na casca, provavelmente, ocorreu a infecção na incubadora durante a eclosão, dados que concordam com CASON et al. (1993) e BAYLE et al. (1998).

Já no caso da inoculação pela cavidade alantóide, verificou-se que a bactéria esteve presente durante o período de incubação em fase lag. Ao final da incubação, a bactéria passou à fase log por algum motivo, se disseminou no organismo e determinou alta colonização intestinal dos pintos que eclodiram. De acordo com BOLELI (2003), por menor que seja o número de ovos contaminados nos nascedouros, a sobrevivência de bactérias patogênicas, como as salmonelas, pode causar infecção das aves recém eclodidas no processo de incubação.

CONCLUSÕES

Pode-se concluir que:

1. a sanitização dos ovos com compostos de quaternários de amônia na concentração utilizada, não foram eficientes para eliminar a *Salmonella* Enteritidis inoculada na casca e impedir sua migração para os componentes dos ovos;
2. o rendimento de incubação foi influenciado pela inoculação da *Salmonella* Enteritidis na cavidade alantóide;
3. *Salmonella* Enteritidis determinou alta mortalidade embrionária tardia nas linhagens Ross e ISA label quando foi simulada a infecção do oviduto através da inoculação na cavidade alantóide;
4. a colonização intestinal pelo patógeno ocorreu naqueles pintos oriundos da inoculação experimental na casca e na cavidade alantóide;
5. a via que simulou a transmissão vertical originou pintos com a maior colonização intestinal.

REFERÊNCIAS

1. BAYLE, J. S.; COX, N. A.; BLANKENSHIP, L. C.; STERN, N. J. Hatchery contamination reduces the effectiveness of competitive treatments to control *Salmonella* colonization of broiler chicks. **Poultry Science**, v. 71(Suplement 1), p.6, 1992.
2. BAYLE, J. S.; CASON, J. A.; COX, N. A. Effect of *Salmonella* in young chicks on competitive treatment. **Poultry Science**, v. 77, p.394-399, 1998.
3. BOARD, R. G. **Egg Quality a Study of the Hens's Eggs**. Edinburg: Oliver and Boyd.1968. p.133.
4. BOARD, R. G.,TRANTER, H.S. The microbiology of eggs. In: STADELMAN,W.J., COTTERILL,O.J. (ed.). 3. ed. **Egg Science and Technology**. Edinburg: Oliver and Boyd. 1986, p.75-96.
5. BOLELI, I.C. Estresse, mortalidade e malformações embrionárias. In: MACARI. M.; GONZALES, E. **Manejo da Incubação**, Campinas:FACTA,2003 p.394-434.
6. BRADSHAW, J. G., SHAH, D.B., FORNEY, E., MADDEN, J. H. Growth of *Salmonella* Enteritidis in shell eggs from normal and seropositive hens. **Journal of Food Protection**, v.53, n.12.,p 651-69, 1990.
7. BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria Nacional da Defesa Agropecuária. Departamento Nacional de Defesa Animal. Coordenação Geral de Laboratório Animal. **Métodos de Análises Microbiológicas para Alimentos**, Brasília: MAPA, 1999, 226p.
8. CASON, J. A.; BAILEY, J.S.; COX, N. A. Location of *Salmonella typhimurium* during incubation and hatching of inoculated eggs. **Poultry Science**, v. 72, p.2064-2068, 1993.
9. CASON, J. A., COX, N. A., BAILEY, J. S. Transmission of *Salmonella typhimurium* during hatching of broiler chicks. **Avian Diseases**, v.38 p 583-588, 1994.
10. CLAY, C. E.; BOARD, R. G. Growth of *Salmonella enteritidis* in artificially contaminated hen's shell eggs. **Epidemiology and Infection**, v.106, p. 271-281, 1991.
11. COX, N. A., BERRANGE, M. E., CASON, J. A. *Salmonella* penetration of egg shells and proliferation in broiler hatching eggs. **Poultry Science**, v. 79, n.11, p. 1571-1574, 2000.
12. FERNÁNDEZ, A.; LARA, C.; LOSTE, A.; CALVO, S.; MARCA, M.C. Control of *Salmonella enteritidis* phage type 4 experimental infection by fosfomicin

- in newly hatched chicks. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Disease**. v.24, p.207-216, 2001.
13. GAST, R. K. Paratyphoid infection. In: CALNEK, B. W. **Diseases of Poultry**, 10 ed. Ames: Iowa University Press, 1997. p. 97-121.
 14. GONZALES, E.; CAFÉ, M. B. Produção de pintos com qualidade total. In: MACARI, M.; GONZALES, E. **Manejo da incubação**, Campinas:FACTA,2003 p.515-526.
 15. GUSTIN, P. C. Biossegurança no incubatório. In: MACARI, M.; GONZALES, E. **Manejo da incubação**, Campinas:FACTA,2003 p.297-349.
 16. HEIR, B. T.; JARP, J. An epidemiological study of the hatchability in broiler breeder flocks. **Poultry Science**, v.80, p 1132- 1138, 2001.
 17. HENZLER, D.J., KRADEL, D.C., SIRCHO, W.M. Management and environmental risk factors for *Salmonella* Enteritidis contamination of eggs. **American Journal Veterinary**, v.59, n.7824-7829,1999.
 18. HIMATHONGKLHAM, S., RIEMANN, H., ERNST, R. Efficacy of shell eggs external contaminated with *Salmonella enteritidis*. Implications for egg testing. **International Journal of Food Microbiology**, v.49 n.3, p.161-167,1999.
 19. HUMPREY, T. J. Contamination of eggshell and contents with *Salmonella enteritidis*: a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 21, p. 31-40,1994.
 20. HUTCHISON, M. L.; GITTINS, J.; WALKER, A.; MOORE, A.; BURTON, C.; SPARKS, N. Washing table eggs: a review of the scientific and engineering issues. **World's Poultry Science Journal**, v. 59, n. 2, p. 233-248, 2003.
 21. LEITÃO, M. F., Qualidade e segurança alimentar em produtos avícolas. In: CONFERÊNCIA APINCO 2001 DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA AVÍCOLAS. 2001 Campinas. **Anais...**v.1, FACTA: Campinas p.181-190, 2001.
 22. LISTER, S. A. *Salmonella enteritidis* infection in broilers and broiler breeders. **The Veterinary Record**, v.123, n.13, p.350. 1988.
 23. MARQUES, D. **Fundamentos Básicos de Incubação Industrial**. 2 ed. São Paulo CASP S/A Industria e Comércio. 1994. 143p.
 24. MARTINEZ, F.; BERCHIERI JUNIOR, A.; PAULILO, A.C. Ação de desinfetantes sobre *Salmonella* na presença de matéria orgânica. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v.1, n.1, p.17-25, 1999.
 25. MESSENS, W.; GRIJSPEERDT, K.; HERMAN, L. Eggshell penetration by *Salmonella*: a review. **World's Poultry Science Journal**, v.61, n.1, p.71-85, 2005.

26. MIYAMOTO, T.; BABA, E.; TAKANA, T.; SASAI, K.; FUKATA, T.; ARAKAWA, A. *Salmonella enteritidis* contamination of eggs from hens inoculated by vaginal, cloacal, and intravenous routes. **Avian Diseases**, v.41, p.296-303, 1997.
27. MORRIS, G. K. *Salmonella enteritidis* and eggs: assessment of risk. **Dairy, Food and Environmental Sanitation**, v.10, n.5, p.279-281, 1990.
28. MULIARI, R.; ZAVANELLA, M. Influence of temperature on *Salmonella enteritidis* growth in hens' eggs components. **The Veterinary Record**, n.28, p. 583, 1994.
29. NASCIMENTO, V. P., SALLE, C. P. O ovo. In: MACARI, M., GONZALES, E. (Ed). **Manejo da incubação**. , Campinas: FACTA, 2003 p. 34-50.
30. OLIVEIRA, D.; SILVA, E. N. *Salmonella* em ovos comerciais: ocorrência, condições de armazenamento e desinfecção da casca. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.52, n.6, p.655-661, 2000.
31. PATRICIO, I. S. Manejo do ovo incubável da granja ao incubatório. In: MACARI, M.; GONZALES, E. **Manejo da Incubação**, Campinas: FACTA, 2003 p.163-179.
32. SAMPAIO, I. B. M. **Estatística Aplicada à Experimentação Animal**. Belo Horizonte: Fundação de ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 1998. 221p.
33. SONCINI, R. A., BITTENCOURT, F. L. Contaminação dos ovos após a postura. In: MACARI, M., GONZALES, E. (Ed). **Manejo da incubação**, Campinas: FACTA 2003 p.433-453.
34. TODD, E. C. D. Risk assessment of use of cracked eggs in Canada. **International Journal of Food Microbiology**, v.30, p. 1255-143, 1996.
35. WILDING, G. P.; BAXTER-JONES. **Eggs borne salmonellas: is prevention feasible**. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON *SALMONELLA*, 1985, New Orleans. Snoeyenbos, G. H. (ed.), Proceedings..., Kennett Square: American Association Avian Pathologists, University of Pennsylvania, 1985. p.126-133.
36. WILLAMS, J. E., DILLARD, L. H. *Salmonella* penetration of fertile and infertile chicken eggs at progressive stages of incubation. **Avian Diseases**, v.12, p.629-635, 1968.

CAPÍTULO 3- HISTOMORFOMETRIA DO TRATO GASTRINTESTINAL E DESEMPENHO DE DUAS LINHAGENS DE FRANGO DE CORTE ROSS E ISA LABEL PROVENIENTES DE OVOS INOCULADOS com *Salmonella* Enteritidis FAGOTIPO 4

RESUMO: No presente estudo foram conduzidos dois experimentos utilizando 256 pintos, sendo 128 da linhagem Ross e 128 da ISA Label, nos quais os objetivos foram avaliar os efeitos da *Salmonella* Enteritidis Fagotipo 4 “in ovo” sobre a frequência de pintos infectados, alterações morfológicas da mucosa do intestino delgado com um e 21 dias de idade e desempenho aos sete, quatorze e 21 dias de vida. Utilizou-se um delineamento inteiramente casualizado, fatorial 2x2 (vias *versus* agentes). Na linhagem Ross constatou-se que a *Salmonella* Enteritidis inoculada na cavidade alantóide apresentou frequência de colonização intestinal alta ao nascimento, que se reduziu com a idade. A análise histomorfométrica evidenciou com um dia de vida (15h de eclosão) redução dos valores médios das alturas dos vilos ($P<0,05$) e maiores profundidades de criptas ($P<0,05$) no duodeno e íleo. Aos 21 dias, evidenciou-se altura média semelhante aos controles e maior profundidades de criptas ($P<0,05$). Registrou-se ainda menor ganho de peso ($P<0,05$) aos 14 e 21 dias e pior conversão alimentar aos 14 dias. Os resultados das alturas dos vilos e profundidades de criptas da linhagem ISA Label à eclosão foram semelhantes ao Ross, acrescentando-se que o jejuno manifestou aumento de profundidades de criptas ($P<0,05$). Aos 21 dias não se observou diferença significativa entre os parâmetros da mucosa intestinal avaliados, assim como não se notaram diferenças significativas entre o ganho peso e conversão alimentar nas aves inoculadas pela *Salmonella* Enteritidis na cavidade alantóide para o padrão da linhagem de crescimento lento durante o experimento. Pelos resultados obtidos pode-se concluir que as alterações dos parâmetros histomorfométricos do intestino foram mais pronunciados na linhagem Ross e promoveram menor ganho de peso aos 14 e 21 dias do experimento. A ISA Label à eclosão apresentou maior injúria pela *Salmonella* Enteritidis, entretanto recuperou-se mais rapidamente e este patógeno não promoveu alterações nos parâmetros de produção.

Palavras-Chave: conversão alimentar, frango de corte, incubação, patógeno.

HISTOMORPHOMETRICAL OF GASTRINTESTINAL TRACT AND PERFORMANCE OF BROILER ROSS AND ISA LABEL HATCHED FROM EGGS INOCULATED WITH *Salmonella* Enteritidis PHAGOTYPE 4

ABSTRACT: Two experiments were carried out with 256 day-old chicks, 128 Ross and 128 ISA Label, in which the objectives were to evaluate the effects of *Samonella* Enteritidis Fagotype 4 inoculated “in ovo” on frequency of infected chicks, small intestinal mucosa morphological alterations with one and 21 days

of age and performance at 7, 14 and 21 days of age. Chicks were allotted in a completely randomized design in a factorial arrangement 2 x 2 (inoculation via and treatments). On Ross line, *Salmonella* Enteritidis inoculated in allantoic cavity showed high frequency of intestinal colonization at hatch, but reduced with age. The histomorphometrical evaluation indicated reduction in villus height ($P < 0,05$) and highest crypt depth in duodenum and ileum 15 hours after hatch. At 21 days of age, villus height and crypt depth were similar for both control and inoculated groups. The lowest performance ($P < 0,05$) was observed at 14 and 21 days of age. Similar results for ISA Label line were observed for villus height and crypt depth at hatch, but jejunum depth were higher for ISA Label in this period ($P < 0,05$). For this line, no difference was detected for the mucosa variables evaluated, and performance was similar for both groups, control and inoculated in allantoic cavity at 21 days of age. It is possible to conclude that the histomorphometrical parameters alterations were higher in Ross line and reduced performance at 14 and 21 days of age. The ISA Label line was strongly affected at hatch with *Salmonella* Enteritidis, but chicks recovered fastly which resulted in non-altered performance results.

Key words: broiler, feed-to-gain ratio, incubation, pathogen

INTRODUÇÃO

Nos últimos 15 anos as infecções paratíficas têm sido priorizadas como de alto risco para a produção avícola nacional. Muito deste destaque se relaciona com a importância na saúde pública dos sorovares *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium presentes nas aves (SESTI, 2001).

A *Salmonella* Enteritidis é considerada como um dos mais sérios patógenos para o homem e também para a indústria avícola (SUZUKI, 1994). O fagotipo 4 (PT 4), de maior circulação no Brasil, encontra-se entre as fontes que foram estudadas por NUNES (1999) e SANTOS et al. (2003).

Em 2001, registraram-se 2.918 casos de infecções humanas, numa população de 5,4 milhões de pessoas, atribuídas a sorotipos de *Salmonella*. Após um pico de infecções em 1997, observou-se redução à metade em 2002 devido ao efetivo controle efetuado em diferentes estágios de produção (FISCHER, 2002).

O trato gastrointestinal (TGI) possui uma característica única entre os diferentes tecidos do frango de corte. Apresenta a mais alta taxa de renovação de todos os tecidos do corpo (MACARI & MAIORKA, 2000). Embora esteja completo anatomicamente à eclosão, possui ainda desenvolvimento pós-

eclosão, pois a superfície de absorção e a proliferação de enterócitos aumentam (MORAN, 1985, FRIEDMAN et al., 2003) e as funções da absorção e digestão podem ser afetadas (MAIORKA et al., 2002).

O desenvolvimento morfológico do intestino nas duas primeiras semanas incluiu a diferenciação básica e a definição de criptas com aumento da área de superfície de absorção intestinal (ZHAO et al., 1998, SKLAN, 2001). O frango de corte está sujeito a uma série de fatores que podem alterar as características morfofuncionais da mucosa do TGI. Dentre os vários fatores que parecem influenciar a cinética epitelial das mucosas, FOGAÇA (2001) citou a composição da microbiota bacteriana, a motilidade intestinal, o suprimento vascular, a nutrição e a função imunológica das células imunocompetentes da mucosa.

O intestino é colonizado por complexa microbiota, que em conjunto com o epitélio intestinal, age como uma barreira natural contra as bactérias patogênicas e desempenha papel importante na digestão de nutrientes e no desenvolvimento do sistema imune. Lesões por microrganismos, enterites inespecíficas e lesões mecânicas, podem afetar o *turnover* celular e qualquer alteração neste processo de crescimento é fator de indução de alterações funcionais (NITSAN, 1995; MAIORKA et al., 2002).

DESMIDT et al. (1997) observaram a penetração da *Salmonella* Enteritidis PT 4 através da parede intestinal em estágios iniciais da infecção. A presença da bactéria no organismo das aves não resultou necessariamente em sinais clínicos. No entanto, a alta percentagem de pintos com colonização do TGI na primeira semana pode resultar em alterações intestinais nos primeiros dias de vida e modificar o desempenho, como verificado por ANDREATTI FILHO & CROCCI (2002) para *Salmonella* Enteritidis que, em condições experimentais, reduziu o ganho de peso. Anteriormente, BARROW (2000) relatou que algumas disfunções do TGI por *Salmonella* podem ser notadas, as quais têm sido caracterizadas pelo acúmulo de alimentos e fluidos ao redor da cloaca.

De acordo com BUTOLO (2001), a absorção de nutrientes depende da integridade do TGI e infecções intestinais não afetam igualmente todas as aves de um lote.

Além deste aspecto, parcelas de consumidores têm exigido alimentos diferenciados, sem resíduos químicos, com segurança sanitária, menos industrializados, produzidos de forma mais natural em consonância com o bem estar do animal, a preservação ambiental e a saúde do homem. Esta nova realidade tem dado impulso à criação em sistemas que eliminam a utilização de antibióticos e ingredientes de origem animal.

Para entender os processos fisiológicos e a capacidade de absorção dos alimentos, os ensaios morfométricos têm sido utilizados como ferramenta para avaliar o desenvolvimento da mucosa do TGI. Considerando a possibilidade de bactérias lesionarem a mucosa intestinal e a escassez de dados de literatura que corroborem a capacidade invasiva da *Salmonella* Enteritidis PT 4 em aves de crescimento lento e rápido, a mensuração dos efeitos na histomorfometria do TGI, bem como a constatação da grande circulação da *Salmonella* Enteritidis no estado (REZENDE, 2002; ROCHA et al., 2003), propôs-se o presente trabalho.

O presente estudo avaliou a suscetibilidade de duas linhagens de frango de corte proveniente de ovos inoculados na casca e cavidade alantóide no momento da incubação à *Salmonella* Enteritidis PT 4 quanto à colonização intestinal, a biometria, a morfohistometria intestinal, o ganho de peso e a conversão alimentar.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no setor de Doenças de Aves, nos Laboratórios de Bacteriologia e de Histopatologia do Departamento de Medicina Veterinária, no Isolamento do Hospital Veterinário e Setor de Reprodução da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás (UFG).

Delineamento e Tratamentos

Foram conduzidos dois experimentos com frangos de corte, sendo um com linhagem de crescimento rápido e outro de crescimento lento, criados em sistemas de produção convencional ou alternativa.

Foram utilizados 256 pintos de corte, sendo 128 da linhagem Ross (Experimento 1) e 128 da linhagem ISA Label “pescoço pelado” (Experimento 2). As aves foram distribuídas de acordo com os tratamentos dos ovos embrionados. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado e os tratamentos distribuídos em esquema fatorial 2 x 2 (via de inoculação x agentes inoculados).

Em ambos experimentos, o tratamento A₁ foi constituído por 32 pintos oriundos de ovos inoculados na casca com 0,1mL de uma solução contendo $1,5 \times 10^2$ unidades formadoras de colônia (UFC) de *Salmonella* Enteritidis PT 4 e o grupo controle, A₂, foi inoculado da mesma maneira, mas com placebo (solução salina esterilizada tamponada a 0,85%). O Tratamento B₁ constituiu-se de 32 pintos inoculados na cavidade alantóide com 0,1mL com a mesma solução do tratamento A₁ e o grupo controle, B₂, inoculado da mesma maneira com o placebo.

Após o nascimento, os grupos experimentais foram distribuídos em cinco parcelas de seis pintos cada; alojados em baterias aquecidas de aço galvanizado, equipadas com comedouros e bebedouros tipos lineares e bandejas para a retirada de excretas. Cada bateria continha cinco andares. Foi utilizada uma lâmpada incandescente de 60W por andar até os 21 dias de idade. Água e ração foram disponibilizados *ad libitum*. A ração vegetal a base de milho e farelo de soja, sem antibióticos promotores de crescimento, foi elaborada segundo exigências nutricionais preconizadas por ROSTAGNO (2000).

Com um (15 horas de nascidos), oito e 22 dias de vida, coletaram-se o mecônio e/ou excretas de cada pinto por compressão da região dorso-ventral da cloaca ou por *swab* cloacal.

As parcelas foram pesadas e cada ave recebeu um número de identificação colocado no tarso-metatarso. No primeiro, sétimo, 14^o e 21^o dias de vida, os pintos foram pesados e duas aves, ao acaso, por grupo foram encaminhadas para o Laboratório de Doenças de Aves, onde permaneceram em jejum por um mínimo de seis e máximo de oito horas.

Os pintos foram pesados e sacrificados por secção interna dos vasos do pescoço, necropsiados, o trato intestinal removido e pesado (g) e o

comprimento da alça intestinal foi medido (cm). Todos os pesos obtidos foram utilizados para calcular o peso relativo do intestino = (peso do órgão /100g peso vivo) x 100, de acordo com GRIEVES (1991).

Após pesagem e medição do intestino, foram retirados fragmentos de aproximadamente 3,0 cm de comprimento de cada uma das três regiões do intestino delgado (porção inicial do duodeno; jejuno: dois cm acima do divertículo de Meckel e íleo: próximo da junção ileocecal) de cada unidade experimental. Estas amostras foram seccionadas longitudinalmente, abertas e suas extremidades presas com grampos em um pedaço de madeira. Cada peça foi colocada em frascos previamente identificados contendo formol tamponado a 10%. Paralelamente, o conteúdo cecal de cada animal foi coletado para análises bacteriológicas.

Exames histomorfométricos

Foram processadas 96 amostras de acordo com a metodologia convencional de LUNA (1968) adotada pelo Laboratório de Histologia da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás.

As peças anatômicas colhidas foram fixadas em solução de formalina neutra tamponada a 10%. Após 24h da fixação, os fragmentos foram recortados em 5,0 mm de diâmetro e acondicionados em cassetes e identificados. Em seguida, foram lavados em água de torneira para retirada de excessos de pigmentos de formol e posteriormente desidratados em álcool etílico em série crescente, desde 70% até álcool absoluto. Posteriormente, procedeu-se à clarificação com xilol e impregnação em parafina histológica com ponto de fusão a 56^o C. Os fragmentos foram incluídos em blocos de parafinas histológicas, seccionados a cinco micrômetros em micrótomo rotativo (American-Optical, modelo Spencer-820), utilizando navalhas descartáveis, laminados, e corados pelo método de Hematoxilina - Eosina (HE).

Os Índices morfométricos do duodeno, jejuno e íleo foram determinados utilizando o *software* Axion Vision 3.0. As imagens das lâminas foram digitalizadas do microscópio óptico de campo claro (Carl Zeiss modelo JENAVAL) para o computador, por meio da câmera de vídeo analógica e a

placa de captura, e posteriormente, procedeu-se a histometria quantificada em micra.

Esta foi conduzida adotando-se os critérios propostos por UNI et al (1998): as alturas dos vilos foram medidas usando a base da junção do vilos com a cripta até o ápice do vilos e a profundidade da cripta foi definida como a profundidade da invaginação da cripta com os vilos adjacentes.

Foram feitas cinco leituras por fragmento de cada tecido sempre da direita para a esquerda do corte, executando-se 60 leituras por lâmina para altura dos vilos e profundidade de criptas.

Pesquisa de *Salmonella*

A pesquisa da *Salmonella* Enteritidis foi realizada nos conteúdos do ceco e nas excretas, de acordo com GEORGIA POULTRY LABORATORY (1997), com modificações. Imediatamente após colheita, realizada com materiais e equipamentos esterilizados, aproximadamente 1,0 g de cada amostra foi transferida para o caldo selenito cistina, ágar verde brilhante, ágar Hektoen e ágar MacConkey e incubados por 24h a 37⁰ C. Caso não ocorresse crescimento sugestivo de *Salmonella* nos meios seletivos utilizados, alíquotas do caldo eram transferidas para os mesmos meios, incubados no mesmo tempo e mesma temperatura.

Isolados com características morfológicas de *Salmonella*, três a cinco unidades formadoras de colônias por placas, foram transferidas para tubos contendo o ágar tríplice açúcar ferro (TSI), incubados a 37⁰ C por 24h.

Tubos de TSI com crescimento sugestivo de *Salmonella* foram submetidos ao teste da urease, indol, motilidade, H₂S, reação de vermelho metila, malonato e lisina descarboxilase. Aqueles que apresentaram reações bioquímicas compatíveis com *Salmonella* foram submetidos ao teste sorológico com antissoros polivalentes somáticos. Amostras positivas à sorologia foram remetidas a Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) em meio ágar nutriente para confirmação do sorovar inoculado e recuperado.

Variáveis de desempenho

As aves foram pesadas no primeiro, sétimo, 14⁰ e 21⁰ dias de vida, bem como as rações utilizadas e as sobras encontradas. Foram anotados,

diariamente, os pesos das aves mortas e a mortalidade o que permitiu a correção do consumo alimentar e do índice de conversão alimentar. O ganho de peso foi calculado pela diferença entre os pesos médios das aves obtidos pelas pesagens no período; o consumo de ração foi obtido pela diferença entre os valores de ração oferecida no início e as sobras, corrigidos pela mortalidade. Já o índice de conversão alimentar foi calculado pela relação entre o consumo de ração e o ganho de peso corrigido pelo peso das aves mortas.

Análises estatísticas

O teste não paramétrico do X^2 foi utilizado para avaliar a frequência de pintos nascidos infectados entre as duas linhagens e das vias de inoculação pela *Salmonella* Enteritidis (SAMPAIO, 1998). Para as análises estatísticas das variáveis quantitativas utilizou-se o programa SAS com o procedimento *General Linear Models* e as médias foram comparadas pelo teste de Turkey (5%) (SAS, 1998).

RESULTADOS

Experimento 1- linhagem de crescimento rápido

Após serem pesados e antes de serem alojados, os pintos foram submetidos á análise bacteriológica através de seus mecônios e excretas e os resultados são apresentados na Tabela 1.

TABELA 1 - Resultados bacteriológicos dos mecônios e excretas de 120 pintinhos oriundos de ovos inoculados na casca e cavidade alantóide com aproximadamente um, oito e 22 dias de vida.

	Placebo			<i>Salmonella Enteritidis</i>		
	Total	n° pintos positivos	%	Total	n° pintos positivos	%
1 dia de vida(15h de nascido)						
Casca	30	0	0	30	15	50,00a*
Cavidade alantóide	30	0	0	30	23	76,66b
Total	60	0	0	60	38	63,33
8 dias de vida						
Casca	28	0	0	26	19	73,08
Cavidade alantóide	28	0	0	25	15	60,00
Total	56	0	0	51	34	66,66
22 dias de vida						
Casca	26	0	0	20	5	25,00
Cavidade alantóide	26	0	0	13	3	23,07
Total	52	0	0	33	8	24,24

*letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística em nível de 5% pelo χ^2

Os ovos inoculados através da casca com as mãos contaminadas resultaram em 50,00% (15/30), 73,08% (19/26) e 25% (5/20) de pintos infectados aos um, oito e 22 dias de vida, respectivamente. Já os ovos inoculados através da cavidade alantóide, simulando a transmissão vertical, manifestaram excreção fecal positiva em 76,66% (23/30), 60,00% (15/25) e 23,07% (3/13) em pintos Ross com um, oito e 22 dias de vida, respectivamente.

A via de inoculação influenciou significativamente ($P < 0,05$) na excreção da *Salmonella Enteritidis* no dia da eclosão (Tabela 1). Observa-se também que os pintos inoculados na casca apresentaram maior freqüência de excreção fecal com oito dias, indicando que ocorreu a transmissão lateral nas baterias até a segunda semana de vida. Os mecônios, assim como as excretas dos tratamentos controle, foram bacteriologicamente negativos.

Observa-se na Tabela 2 que a via de inoculação não influenciou o peso relativo (g/100g de peso vivo) e os comprimentos dos intestinos de frangos à eclosão. Quando se analisa o efeito dos agentes inoculados verifica-se que houve diferença ($P < 0,05$) aos sete dias de vida no comprimento do intestino, ficando com maior tamanho o intestino dos frangos inoculados pela *Salmonella Enteritidis* ($P < 0,05$). Aos 21 dias ($P < 0,05$) notou-se maior peso dos intestinos dos frangos inoculados pela *Salmonella Enteritidis*.

TABELA 2 - Peso relativo (g/100 g de peso vivo) do intestino (I), comprimento do intestino (IC) de frangos Ross com um dia, sete, 14 e 21 dias de idade.

Via inoculação (V)	1 dia		7 dias		14 dias		21 dias	
	I	IC, cm	I	IC, cm	I	IC, cm	I	IC, cm
Casca	4,18	39,87	8,78	84,92	6,29	101,50	4,86	108,25
Cavidade alantóide	3,61	39,00	9,22	76,62	7,22	97,50	5,47	116,50
Agente inoculado (A)								
S. Enteritidis	4,00	39,00	8,82	87,92a	7,38	97,75	6,17 a	114,87
Placebo	3,78	39,87	9,19	76,62b	6,13	101,50	4,16b	109,87
Fator de variação (%)								
V	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
A	ns	ns	ns	*	ns	ns	*	ns
V x A	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
CV(%)	19,3	4,93	6,35	3,56	11,31	4,65	48,50	45,19

a, b - letras maiúsculas (minúsculas) diferentes na mesma coluna (linha) diferem estatisticamente pelo teste de Turkey

As alturas dos vilos do duodeno (Tabela 3) diferiram ($P < 0,05$) quando se considerou a via de inoculação aos 21 dias de idade, observando-se menor valor quando a via de inoculação foi a cavidade alantóide. Já quando a variável estudada foi o agente inoculado, verificou-se um valor mais alto, com diferença ($P < 0,05$) nas profundidades das criptas dos frangos originados da inoculação com a *Salmonella* Enteritidis.

TABELA 3 – Alturas dos vilos (AV) e profundidade de cripta (PC) do duodeno (μm) de frangos da linhagem Ross de um e 21 dias de idade.

Valores médios	1 dia		21 dias	
	AV (μm)	PC (μm)	AV (μm)	PC (μm)
Via de inoculação (V)				
Casca	369,60	69,67	1327,71a	106,35
Cavidade	226,11	70,99	1165,98b	99,61
Agente inoculado (A)				
<i>Salmonella</i> Enteritidis	280,10	76,79	1241,09	106,03a
Placebo	414,11	63,96	1352,61	84,09b
Fator de variação (%)				
Via de inoculação	0,01	ns	0,001	ns
Agente de inoculação	0,01	ns	ns	0,001
V x A	0,01	0,13	ns	ns
CV (%)	27,77	24,86	18,84	28,63

a, b - letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente pelo χ^2

Como demonstrado na Tabela 4, a altura dos vilos e a profundidade das criptas do duodeno da linhagem Ross foram influenciadas ($P < 0,05$) pela via de inoculação e pelo agente inoculado, onde se constataram menor valor

para as alturas dos vilos e maior profundidade de criptas para os pintos inoculados na cavidade alantóide pela *Salmonella* Enteritidis.

TABELA 4 - Desdobramento das interações significativas entre a via de inoculação *versus* agente inoculado do duodeno para frangos Ross com um dia de idade.

	Via de inoculação	
	Casca	Cavidade alantóide
Agente inoculado	Altura dos vilos (μm)	
<i>Salmonella</i> Enteritidis	338,91Aa	236,66Ab
Placebo	409,64Ba	428,07Ba
	Casca	Cavidade alantóide
Agente inoculado	Profundidade de criptas(μm)	
<i>Salmonella</i> Enteritidis	78,06Aa	89,61Aa
Placebo	63,96Bb	50,36Bb

a, b - letras maiúsculas (minúsculas) diferentes na mesma coluna (linha) diferem estatisticamente

Os valores médios das alturas dos vilos dos jejunos não mostraram diferenças significativas (Tabela 5), entretanto o patógeno, nos dias um e 21 aumentou as profundidades de criptas ($P < 0,05$).

TABELA 5—Alturas de vilos (AV) e profundidade de cripta (PC) do jejuno (μm), de frangos Ross de um e 21 dias de idade.

Valores médios	1 dia		21 dias	
	AV (μm)	PC (μm)	AV (μm)	PC (μm)
Via de inoculação (V)				
Casca	166,35	67,55	863,34	162,53
Cav. alantóide	164,67	64,50	941,24	166,81
Agente inoculado (A)				
S. Enteritidis	168,10	80,50a	890,38	182,14 a
Placebo	162,68	51,50b	914,21	147,20 b
Fator de variação (%)				
V	ns	ns	ns	ns
A	ns	0,01	ns	0,001
V x A	ns	ns	ns	ns
CV (%)	24,75	42,84	24,88	23,19

a, b - letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente

Ao nascimento, os valores médios da altura dos vilos foram afetados ($P < 0,05$) pela *Salmonella* Enteritidis (Tabela 6), ou seja, os íleos de pintos oriundos da inoculação da cavidade alantóide com a *Salmonella* Enteritidis apresentaram menores valores ($P < 0,05$).

TABELA 6 - Alturas de vilos (AV) e profundidade de cripta (PC) do íleo (μm), de frangos Ross de um e 21 dias de idade.

Idade	1 dia		21 dias	
	AV (μm)	PC (μm)	AV (μm)	PC (μm)
Valores médios				
Via de inoculação (V)				
Casca	158,11	71,58	550,70	141,64
Cav. alantóide	162,01	64,18	577,46	176,11
Agente inoculado (A)				
S. Enteritidis	153,00b	76,70	559,20	193,77
Placebo	166,43a	59,18	568,95	123,99
Fator de variação (%)				
V	ns	ns	ns	0,001
A	3,60	0,03	ns	0,001
V x A	ns	0,02	ns	0,12
CV (%)	32,62	38,43	18,35	23,67

a, b: Letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente.

À eclosão (Tabela 7), notou-se que a maior profundidade de criptas ocorreu quando *Salmonella* Enteritidis foi inoculada através da via alantóide. Observa-se também que houve interação significativa entre as vias de inoculação e o agente inoculado quanto à profundidade de cripta do íleo na linhagem Ross aos 21 dias de idade. A maior profundidade de cripta ($P < 0,05$) foi verificada quando o agente inoculado foi a *Salmonella* Enteritidis, tanto na casca como na cavidade alantóide aos 21 dias de vida.

TABELA 7 - Desdobramento das interações entre via de inoculação e agente inoculado para o íleo de frangos Ross aos um e 21 dias de idade.

Via de inoculação	Casca	Cavidade alantóide
Agente inoculado		
Profundidade de cripta (μm) a um dia		
<i>Salmonella</i> Enteritidis	63,88Aa	89,51Bb
Placebo	64,49Aa	54,20Aa
Agente inoculado		
Profundidade de criptas (μm) aos 21 dias		
<i>Salmonella</i> Enteritidis	160,51 Bb	163,71 Bb
Placebo	122,38 Aa	119,58 Aa

Letras maiúsculas (minúsculas) diferentes na mesma coluna (linha) diferem estatisticamente

Observa-se que a via de inoculação influenciou o peso médio dos frangos aos 14 e 21 dias de idade, sendo que aqueles que foram inoculados pela via alantóide apresentaram menor ganho de peso médio (Tabela 8). Quando se analisou o efeito dos agentes inoculados, verificou-se, também, que houve efeito significativo aos 14 dias e 21 dias ($P < 0,05$) de vida pela *Salmonella* Enteritidis.

TABELA 8 - Peso médio (PM) de frangos Ross ao primeiro (PM1), sétimo (PM7), décimo-quarto (PM14) e vigésimo-primeiro (PM21) dia de idade.

Via de inoculação (V)	PM1	PM7	PM14	PM21
Casca	47,04	144,83	322,53 a	586,37
Cavidade alantóide	46,65	145,43	304,24 b	512,23
Agente inoculado (A)				
<i>Salmonella</i> Enteritidis	46,74	145,25	274,70 b	490,51
Placebo	46,95	145,01	352,06 a	608,09
Fator de variação (%)				
V	ns	ns	2,60	0,22
A	ns	ns	0,001	0,01
V x A	ns	ns	ns	3,98
CV(%)	2,08	6,22	5,31	11,08

a, b - Letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente

Ao avaliar-se a interação entre agentes e as vias de inoculação (Tabela 9), notou-se que os frangos oriundos da inoculação pela cavidade alantóide apresentaram menor peso médio ($P < 0,05$) quando a *Salmonella* Enteritidis foi o agente inoculante, sem diferença para placebo inoculado na mesma via.

TABELA 9 - Desdobramento das interações via de inoculação e agente inoculado para peso médio aos 21 dias de idade para Ross.

	Via de inoculação	
	Casca	Cavidade alantóide
Agente inoculado		
<i>Salmonella</i> Enteritidis	547,48 Aa	433,53 Bb
Placebo	605,26 Aa	610,92 Aa

Letras maiúsculas (minúsculas) diferentes na mesma coluna (linha) diferem estatisticamente

A conversão alimentar (Tabela 10) diferiu ($P < 0,05$) quando se considerou a via de inoculação e o agente inoculado aos 14 e 21 dias de vida. Constatou-se piora na conversão alimentar quando se utilizou a cavidade alantóide como via de inoculação e a *Salmonella* Enteritidis como agente inoculado.

TABELA 10 - Conversão alimentar (CA) de frangos da linhagem Ross ao sétimo (7), décimo-quarto (14) e vigésimo-primeiro (21) dia de idade.

Via de inoculação (V)	CA 7	CA 14	CA 21
Casca	1,04	1,16a	1,55 a
Cavidade alantóide	1,12	1,79b	1,83 b
Agente inoculado (A)			
<i>Salmonella</i> Enteritidis	1,07	2,21 b	1,84b
Placebo	1,08	1,29 a	1,55a
Fator de variação(%)			
V	ns	0,63	0,001
A	ns	0,01	0,01
V x A	ns	ns	ns
CV(%)	4,21	10,16	12,01

a, b - Letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente

Notou-se que, dos 16 conteúdos de cecos analisados 14 (87%) foram positivos para *Salmonella* Enteritidis (Tabela 11).

TABELA 11 -Resultados bacteriológicos de 16 amostras de conteúdo cecal de aves de um, sete, 14 e 21 dias de vida oriundas de ovos inoculados com a *Salmonella* Enteritidis.

Via de inoculação (V)	1 dia	7 dias	14 dias	21 dias
Casca	2/2	1/2	2/2	2/2
Cavidade alantóide	2/2	2/2	2/2	1/2
Total positivo	4/4	3/4	4/4	3/4

Experimento 2- linhagem de crescimento lento-ISA Label

Os ovos inoculados Na casca (Tabela 12) com as mãos contaminadas resultaram em 10,00% (3/30), 15,34% (4/26) e 0%(0/24) de pintos infectados aos um, oito e 22 dias de vida. A via de inoculação influenciou ($P < 0,05$) na excreção da *Salmonella* Enteritidis no dia da eclosão. Os ovos inoculados pela cavidade alantóide, simulando a transmissão vertical, apresentaram 26,66% (8/30), 14,81% (4/27) e 4,35% (1/23) de pintos de crescimento lento infectados.

TABELA 12- Resultados bacteriológicos das excretas de 120 pintos da linhagem ISA Label oriundos de ovos inoculados através da casca e da cavidade alantóide com um, oito e 22 dias de vida.

	Placebo			<i>Salmonella</i> Enteritidis		
	Total	n° pintos positivos	%	Total	n° pintos positivos	%
1 dia de vida(15h de nascido)						
Casca	30	0	0	30	3	10,00a
Cavidade alantóide	30	0	0	30	8	26,66b
Total	60	0	0	60	11	18,33
8 dias de vida						
Casca	28	0	0	26	4	15,34
Cavidade alantóide	28	0	0	27	4	14,81
Total	56	0	0	53	8	15,09
22 dias de vida						
Casca	26	0	0	24	0	0
Cavidade alantóide	26	0	0	23	1	4,35
Total	52	0	0	47	1	2,13

Letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente

Observou-se também (Tabela 12) que os pintos oriundos de ovos inoculados na casca apresentaram maior freqüência de excreção fecal com oito dias de vida, indicando que ocorreu a transmissão lateral nas baterias até a segunda semana de vida. Após este período ocorreu um declínio da infecção. As excretas dos tratamentos controle foram bacteriologicamente negativos.

Analisando a Tabela 13, visualiza-se que a via de inoculação influenciou apenas no peso relativo (g/100g de peso vivo) dos intestinos de frangos da linhagem ISA Label no primeiro dia de idade, ficando com um valor maior aqueles inoculados pela cavidade alantóide com *Salmonella* Enteritidis.

TABELA 13 -Peso relativo (g/100 g de peso vivo) do intestino (I) e comprimento do intestino (IC) de frangos ISA Label com um, sete, 14 e 21 dias de idade.

Via inoculação (V)	1 dia		7 dias		14 dias		21 dias	
	I	IC, cm	I	IC, cm	I	IC, cm	I	IC, cm
Casca	5,19	36,50	8,02	75,75	6,62	89,25	5,57	104,22
Cavidade alantóide	5,96	40,75	7,54	74,87	6,21	88,87	5,10	102,87
Agente inoculado (A)								
S. Enteritidis	6,65	40,40	8,06	77,75	6,33	94,00	5,46	106,85
Placebo	5,59	38,85	7,50	72,87	6,50	84,12	5,21	100,25
Fator de variação (%)								
V	0,59	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
A	0,02	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
V x A	1,63	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
CV(%)	3,63	12,52	6,20	3,87	11,21	6,27	6,87	3,86

a, b - letras maiúsculas (minúsculas) diferentes na mesma coluna (linha) diferem estatisticamente

No desdobramento das interações entre as vias de inoculação e o agente inoculado observou-se que no primeiro dia de idade ocorreu diferença ($P < 0,05$) quando se inoculou a *Salmonella* Enteritidis, independente da via (Tabela 14).

TABELA 14 -Desdobramento das interações significativas via de inoculação e agente inoculado para peso relativo intestino de frangos ISA Label com um dia de idade.

Agente inoculado	Via de inoculação	
	Casca	Cavidade alantóide
<i>Salmonella</i> Enteritidis	6,46 Aa	6,66 Aa
Placebo	5,93 Ba	5,26 Ba

Letras maiúsculas (minúsculas) diferentes na mesma coluna (linha) diferem estatisticamente

Como mostra a Tabela 15, a altura dos vilos do duodeno, assim como as profundidades de criptas aos 21 dias de vida não apresentaram diferenças significativas entre as vias de inoculação e os agentes inoculados.

TABELA 15—Alturas de vilos (AV) e profundidade de cripta (PC) do duodeno (μm), de frangos ISA Label de um e 21 dias de idade.

Idade Valores	1 dia		21 dias	
	AV (μm)	PC (μm)	AV (μm)	PC (μm)
Via de inoculação (V)				
Casca	395,02	89,40b	998,27	106,32
Cav. Alantóide	367,54	100,08a	1004,25	105,15
Agente inoculado (A)				
S. Enteritidis	332,88	97,80	972,72	108,80
Placebo	358,04	91,75	977,80	101,75
Fator de variação (%)				
V	0,01	1,60	ns	ns
A	0,02	ns	ns	ns
V x A	1,55	0,76	ns	ns
CV (%)	20,79	25,43	22,57	16,91

Letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (5%).

Ao analisar o desdobramento das interações da altura dos vilos do duodeno (Tabela 16) da ISA Label, observou-se menor altura para os inoculados na casca com a *Salmonella* Enteritidis, enquanto a maior profundidade de criptas foi registrada nas aves oriundas da inoculação com o patógeno independente da via de inoculação.

TABELA 16 - Desdobramento das interações para altura de vilos (AV) e profundidade de criptas (PC) de frangos ISA Label com um dia de idade provenientes de ovos com diferentes vias de inoculação e agentes inoculados para o duodeno

Via de inoculação	Casca	Cavidade alantóide
Agente inoculado	Altura do duodeno AV (μm)	
<i>Salmonella</i> Enteritidis	251,08 Bb	358,75 Aa
Placebo	335,64 Ba	376,59 Aa
Via de inoculação	Profundidade de criptas PC (μm)	
Agente inoculado	Profundidade de criptas PC (μm)	
<i>Salmonella</i> Enteritidis	98,36 Ba	103,06 Ba
Placebo	80,43 Aa	84,28 Aa

Letras maiúsculas (minúsculas) diferentes na mesma coluna (linha) diferem estatisticamente

Ocorreu, no dia da eclosão, diferença significativa na altura dos vilos e na profundidade das criptas do jejuno de frangos da linhagem ISA Label aos um e 21 dias de idade quando os elementos estudados foram a via de inoculação e o agente infeccioso (Tabela 17).

TABELA 17–Alturas de vilos (AV) e profundidade de cripta (PC) do jejuno (μm), ISA Label um e 21 dias de idade.

Idade	1 dia		21 dias	
	AV (μm)	PC (μm)	AV (μm)	PC (μm)
Via de inoculação (V)				
Casca	167,76 B	98,52 b	660,58	94,08
Cav. alantóide	294,37 A	79,51 a	672,80	94,80
Agente inoculado (A)				
S. Enteritidis	213,69 B	91,36 b	668,58	94,08
Placebo	230,12 A	86,79 a	664,23	95,04
Fator de variação (%)				
V	0,01	0,01	ns	ns
A	2,95	2,50	ns	ns
V x A	ns	ns	ns	ns
CV (%)	29,24	13,92	20,70	19,61

Letras maiúsculas (minúsculas) iguais na mesma coluna (linha) não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (5%).

Os valores médios das alturas dos vilos e profundidade de cripta do íleo de frangos da linhagem ISA Label aos um e 21 dias de idade estão na Tabela 18. Constatou-se que no dia da eclosão ocorreu diferença significativa na profundidade das criptas do íleo quando o elemento estudado foi o agente infeccioso.

TABELA 18– Alturas de vilos (AV) e profundidade de cripta (PC) do íleo (μm), ISA Label um e 21 dias de idade.

Idade	1 dia		21 dias	
	AV (μm)	PC (μm)	AV (μm)	PC (μm)
Via de inoculação (V)				
Casca	158,11	71,58	457,91	137,13
Cav. alantóide	162,01	64,18	464,91	137,35
Agente inoculado (A)				
S. Enteritidis	153,00	76,70a	462,63	137,71
Placebo	166,43	59,26b	459,56	136,76
Fator de variação (%)				
V	ns	Ns	ns	ns
A	3,60	0,03	ns	ns
V x A	0,02	Ns	ns	ns
CV (%)	32,62	38,43	20,42	18,42

Letras maiúsculas (minúsculas) iguais na mesma coluna (linha) ($P > 0,05$) pelo teste de Turkey

Pelos dados apresentados na Tabela 19, constataram-se diferenças significativas na altura dos vilos do íleo quando a variável estudada foi a via de inoculação, ficando a altura do mesmo com menor valor quando a via foi a casca.

TABELA 19- Desdobramento das interações significativas entre a via de inoculação *versus* agente inoculado, do íleo, a um dia de vida

Agente inoculado	Via de inoculação	
	Casca	Cavidade alantóide
	Altura vilos -AV (μm) um dia	
<i>Salmonella</i> Enteritidis	176,27Aa	177,27Aa
Placebo	147,70Bb	156,05Ba

Letras maiúsculas (minúsculas) iguais na mesma coluna (linha) não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (5%).

Verifica-se na Tabela 20, que a via de inoculação influenciou ($P < 0,05$) o peso médio apenas aos 14 dias de idade, sendo que os frangos originados da inoculação da casca apresentaram menor ganho de peso. Quanto ao agente inoculado, não se observou nenhum efeito no ganho de peso, assim como nenhuma interação significativa entre a *Salmonella* Enteritidis e a via de inoculação.

TABELA 20 -Peso médio de frangos ISA Label ao primeiro (PM1), sétimo (PM7), décimo-quarto (PM14) e vigésimo-primeiro (PM21) dia de idade.

Via de inoculação (V)	PM1	PM7	PM14	PM21
Casca	42,40	107,28	222,73 b	368,48
Cavidade alantóide	42,94	111,98	240,19 a	390,15
Agente inoculado (A)				
<i>Salmonella</i> Enteritidis	42,97	109,03	230,78	377,18
Placebo	42,38	110,22	232,15	382,26
Fator de variação				
V	ns	ns	0,02	ns
A	ns	ns	ns	ns
V x A	ns	ns	ns	ns
Coefficiente de variação	4,64	6,72	3,49	6,34

a, b - Letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente

A conversão alimentar (Tabela 21) não apresentou diferença significativa nos períodos estudados quanto aos agentes inoculados e vias de inoculação.

TABELA 21 - Conversão alimentar (CA) de frangos ISA Label ao sétimo (7), décimo-quarto (14) e vigésimo-primeiro (21) dia de idade.

Via de inoculação (V)	CA7	CA14	CA21
Casca	1,61	1,66	2,19
Cavidade alantóide	1,70	1,64	2,19
Agente inoculado (A)			
<i>Salmonella</i> Enteritidis	1,63	1,69	2,21
Placebo	1,67	1,71	2,17
Fator de variação(%)			
V	ns	ns	ns
A	ns	ns	ns
V x A	ns	0,04	ns
CV(%)	7,61	6,36	7,92

a, b - Letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente

Aos 14 dias (Tabela 22) quando se analisou a interação entre as vias e os agentes o maior valor foi observado quando se inoculou o placebo na casca (P<0,05).

TABELA 22 - Desdobramento das interações entre as vias de inoculação e os agentes inoculados para conversão alimentar aos 14 dias de idade ISA Label

Agente inoculado	Via de inoculação	
	Casca	Cavidade alantóide
	Conversão alimentar aos 14 dias de idade	
<i>Salmonella</i> Enteritidis	1,68Aa	1,65 Aa
Placebo	1,70Ab	1,66 Aa

Letras maiúsculas (minúsculas) diferentes na mesma coluna (linha) diferem estatisticamente

Conforme demonstrado na Tabela 23, registrou-se que dos 16 conteúdos dos cecos analisados por cultura bacteriológica convencional, quatro (25%) amostras foram positivas para *Salmonella* Enteritidis.

TABELA 23- Resultados bacteriológicos de 16 amostras de conteúdos cecais aos um, sete, 14 e 21 dias de vida dos pintos sacrificados oriundo de ovos inoculados com a *Salmonella* Enteritidis.

Via de inoculação (V)	1 dia	7 dias	14 dias	21 dias
Casca	1/2	0/2	0/2	0/2
Cavidade alantóide	2/2	1/2	0/2	0/2
Total positivo	3/4	1/4	0/4	0/4

DISCUSSÃO

A colonização do intestino se inicia antes e imediatamente após a eclosão, por bactérias presentes nas incubadoras, nos resíduos de incubação e nos locais de criação. A composição da microbiota do TGI pode ser benéfica ou maléfica para o hospedeiro. Os microrganismos que colonizam o intestino nos primeiros dias de eclosão tendem a permanecer no TGI, compondo a microbiota, durante toda a vida da ave. Entretanto, o estabelecimento da microbiota intestinal benéfica nas primeiras semanas de vida e o desenvolvimento do sistema imune (CORRIER et al., 1991) pode reduzir o nível de colonização intestinal para o gênero *Salmonella*.

No presente estudo, aves recém nascidas foram altamente suscetíveis à infecção pela *Salmonella* Enteritidis, independentemente da via de inoculação no ovo e da linhagem. A linhagem selecionada para crescimento rápido foi mais sensível à infecção (63,33%) do que a de crescimento lento (18,33%). Os pintos ISA Label mostraram maior resistência à *Salmonella* Enteritidis, tanto pelo contato quanto pela contaminação semelhante a infecção que ocorre via oviduto. Observou-se maior excreção cecal ($P < 0,05$) da linhagem Ross, o que encontra sustentação nos experimentos de BARROW (1994) e KINGSLEY & BAUMLER (2000), os quais relataram que a habilidade deste sorovar de colonizar o intestino parece estar relacionada ao patrimônio genético da espécie e com a imunidade inata. BERTHELOT-HÉRAULT et al. (2003) registraram diferenças de colonização do ceco em quatro linhagens estudadas e as atribuíram ao envolvimento das respostas imunes sistêmicas e locais das aves.

Os pintos oriundos da inoculação da casca, de ambas as linhagens, apresentaram frequência mais elevada de colonização intestinal aos oito dias em relação ao dia da eclosão, reduzindo posteriormente. Estes achados correspondem aos de CORRIER et al. (1991) e de HONJO et al. (1993), que relataram que a estrutura e as funções do TGI ocorrem concomitantemente com o desenvolvimento dos tecidos linfóides associados às mucosas. Estas, por sua vez, estão constantemente expostas a antígenos e ainda são as primeiras linhas de defesa acionadas em uma infecção intestinal. O aumento da frequência do dia um aos sete deve-se a veiculação do patógeno de aves infectadas para as susceptíveis nas baterias.

Bactérias ou outros agentes infecciosos são capazes de quebrar as barreiras naturais no lúmen intestinal, provocando distúrbios nas células epiteliais e alterando a permeabilidade da mucosa. A mucosa encontra-se em condições dinâmicas. A manutenção da capacidade funcional do epitélio intestinal é assegurada pelo equilíbrio entre a perda e a proliferação celular. Porém, quando o intestino responde a um estímulo, a favor de um deles, devem ocorrer modificações na altura dos vilos (UNI et al., 2000).

Ressalta-se que o trato gastrintestinal de pintos é submetido a alterações drásticas nos primeiros dias de vida, destacando-se o crescimento em massa, o aumento do número de enterócitos, da altura e do número de vilos, bem como da profundidade de criptas (SKLAN, 2001).

Concomitantemente, ao desenvolvimento da estrutura e das funções do TGI, ocorre o desenvolvimento dos tecidos linfóides associados à mucosa. O gradual desenvolvimento da função linfóide coincide com o desenvolvimento dos vilos. Nos primeiros dias de vida, a defesa é realizada pelos anticorpos maternos do saco da gema no lúmen e pelo sistema imune inato (HONJO et al., 1993). Embora o envolvimento do sistema imune inato na primeira semana de vida da ave não seja objeto de um grande número de estudos experimentais, HENDERSON et al. (1999) mostraram que a fagocitose foi aumentada pela inoculação oral com a *Salmonella* Enteritidis em aves de um dia de vida. Isto confirmou o envolvimento deste sistema de defesa na redução da infecção causada pela *Salmonella* Enteritidis com a idade, embora esta diminuição tenha sido mais evidente na linhagem ISA Label.

Pelo exame biométrico do intestino da linhagem Ross, observaram-se maior comprimento relativo do intestino aos sete dias e maior peso relativo aos 21 dias das aves oriundas da inoculação com o agente infeccioso. Na ISA Label, registrou-se maior peso somente no primeiro dia de vida.

Para as variações observadas na biometria do intestino, verificou-se maior capacidade de recuperação da linhagem ISA Label comparada a Ross. Vale ressaltar, como descrito por MADI et al. (2001) que, quando se expressam em medidas valores numéricos e proporções, é preciso ter em mente que a estrutura do intestino é muito elástica e sujeita a interferências como manipulação e temperaturas baixas. Mesmo assim, o maior peso relativo pode

ser explicado pelo estímulo antigênico da *Salmonella* Enteritidis no intestino no primeiro dia de vida, sendo que nos estudos de KRINKE & JAMROZ (1996) observou-se redução do peso do TGI quando se utilizaram aditivos alimentares.

Ao se comparar os exames histomorfométricos dos segmentos do intestino avaliados, evidenciaram-se no duodeno e íleo valores médios menores ($P < 0,05$) na altura dos vilos e maiores para profundidade de criptas ($P < 0,05$), tanto na linhagem de crescimento rápido quanto na de crescimento lento à eclosão. As alturas dos vilos foram menores ($P < 0,05$) e a profundidade de cripta maior no tratamento que recebeu o patógeno na cavidade alantóide. Estas alterações reduziram-se com a idade da ave, assim como a presença do patógeno. Observou-se, no entanto, maior recuperação da linhagem ISA Label. A linhagem Ross aos 21 dias ainda apresentava alterações principalmente em relação à profundidade de criptas.

No presente estudo, os hospedeiros reagiram de forma semelhante aos estímulos na mucosa do trato gastrointestinal no dia da eclosão pela *Salmonella* Enteritidis. Dados do trabalho sugeriram que o aumento da profundidade de cripta foi diretamente relacionado com o *turnover* das células epiteliais durante a infecção, sugerindo resposta compensatória das células aos efeitos da *Salmonella* Enteritidis, concordando com MORRIS et al. (2004).

A hiperplasia de cripta é uma alteração histológica resultante do aumento da atividade metabólica para compensar a destruição celular (ROSE et al., 1992). Durante a infecção, este processo pode ser aumentado para evitar a exposição da lâmina própria e para recuperar as células lesionadas pela *Salmonella* Enteritidis. MACARI & MAIORKA (2000) relatou que a manutenção do número de células e a capacidade funcional do epitélio intestinal são asseguradas pelo equilíbrio entre a perda (extrusão) e a proliferação de células. Se o estímulo levar a uma maior taxa de extrusão, havendo manutenção ou redução na taxa de proliferação, o intestino deverá responder com uma redução na altura dos vilos. LODDI (2003) mostrou que, se os vilos reduzem seu tamanho em decorrência do aumento da taxa de perda celular, ocorrerá conseqüentemente aumento na produção de células da cripta e na profundidade de cripta.

Por outro lado, aos 21 dias, os pintos Ross não apresentaram as alturas dos vilos dos jejunos e íleos alteradas, entretanto, ocorreu aumento das profundidades de criptas nos grupos inoculados pela *Salmonella* Enteritidis. Esta hiperplasia de criptas provavelmente seja resultante da atividade metabólica compensatória à destruição celular (ROSE et al., 1992). Em contrapartida, na linhagem de crescimento lento os parâmetros foram normais, o agente não foi recuperado nestas aves. Na Ross, as injúrias causadas pelo patógeno induziram a pior conversão alimentar aos 14 e 21 dias, entretanto o aumento de profundidade de criptas sugere regeneração epitelial. Estes resultados, provavelmente, estão relacionados com a recuperação da integridade intestinal, que demora de 90 a 96 horas para se completar (FURLAN et al., 2004).

O menor ganho de peso médio aos 14 e 21 dias dos pintos Ross inoculados com *Salmonella* Enteritidis podem ser atribuídos à presença do agente infeccioso no TGI, devido provavelmente a alterações histomorfométricas nos vilos e criptas à eclosão e aos 21 dias de vida. Esta injúria na mucosa pelo patógeno afetou a digestão e a absorção adequadas dos nutrientes, pois ocorreu perda de peso médio aproximado de 19% para os pintos inoculados pela *Salmonella* Enteritidis na cavidade alantóide. Estes resultados têm suporte nos trabalhos de GORHAN et al. (1994), que observaram menor ganho de peso em aves com infecções inaparentes, com *Salmonella* Enteritidis, nas primeiras semanas de vida. Já DHILLON et al. (1999) verificaram que aves Hubbard inoculadas com a *Salmonella* Enteritidis PT4 apresentaram perdas de 13 a 19% no ganho de peso, enquanto neste trabalho encontrou 21,98% e 16,71% aos 14 e 21 dias para Ross, respectivamente. Esta diferença no percentual de perda de peso pode ser atribuída também à ração, visto que neste estudo não se utilizou promotor de crescimento.

Na linhagem ISA Label, diferenças entre os pesos médios foram verificadas apenas aos 14 dias de idade para as aves inoculadas pela casca, que apresentaram maior conversão alimentar, entretanto, o inóculo infeccioso não afetou o desenvolvimento corporal em nenhum dos períodos estudados.

Os valores de conversão alimentar da linhagem Ross e ISA Label foram diferentes, sendo compatíveis com as genéticas das linhagens, mesmo tendo a *Salmonella* Enteritidis causado lesões nas células epiteliais do intestino das aves Ross até os 21 dias. A capacidade de estar sempre ocorrendo renovação do epitélio intestinal é fator importante que explica porque não se podem detectar alterações do processo de absorção intestinal quando a injúria não é persistente e profunda. Lesões discretas podem causar redução temporária da absorção conseqüentemente, piora a conversão alimentar (ITO et al., 1998). Além disso, DEMATTÊ FILHO & MENDES (2001) relataram que o índice de conversão alimentar para o sistema alternativo é aproximadamente 10 a 15% maior que os métodos convencionais de criação que se amparam na utilização de promotores de crescimento.

CONCLUSÕES

Constatou-se que:

- 1- aves oriundas de ovos inoculados experimentalmente “in ovo” pela *Salmonella* Enteritidis apresentaram alta freqüência de pintos infectados, sendo que os pintos Ross oriundos da inoculação da cavidade alantóide manifestaram maior índice de infecção;
- 2- ocorreu, com a idade, recuperação da integridade intestinal bem como a redução da colonização cecal pelo patógeno em ambas linhagens, sendo que a linhagem ISA Label apresentou recuperação mais rápida.
- 3- o ganho peso médio e a conversão alimentar foram afetados pela *Salmonella* Enteritidis na linhagem Ross; entretanto o mesmo não ocorreu na linhagem de crescimento lento.

REFERÊNCIAS

1. ANDREATTI FILHO, R.L.; CROCCI, A. J. Efeito protetor da microbiota congelada e liofilizada sobre a infecção experimental de frangos de corte por *Salmonella* entérica sorovar Enteritidis. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.54, n. 5, p. 457-461, 2002.
2. BARROW, P. A., HUGGINS, M. B., LOVELL, M. A. Host specificity of *Salmonella* infectious in chickens and mice is expressed in vivo primarily

- at the level of the reticuloendothelial systema. **Infection and Immunity** n. 62, p 4602-10,1994.
3. BARROW, P. A. The paratyphoid salmonellae. **Rev. Sci Tec.** v.19, n.2.p 351-75, 2000.
 4. BERTHELOT-HÉRAULT, F.; MOMPART, F.; Z. Y.; GMUNT, M.Z.; DUBRAY, G.; DUCHET-SUCHAUX, M. Antibody responses in the serum and gut of chickens lines differing in cecal carriage of *Salmonella enteritidis*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 96, p. 43-52, 2003.
 5. BUTOLO, J. E. Fatores ligados à alimentação e nutrição de reprodutores. In: CONFERÊNCIA APINCO 2001 DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS AVÍCOLAS, SIMPÓSIO SOBRE PRODUÇÃO ALTERNATIVA, 2001. Campinas. **Anais...** Campinas: FACTA: FACTA:, 2001, v.1, p.125-146.
 6. CORRIER, D. E.; HARGIS, B.; HINTON, A. Jr.; LINDSEY, D.; CALDWELL, D.; MANNIG, J.; DELOACH, J. Effect of anaerobic cecal microflora and dietary lactose on colonization resistance of layer chickens to invasive *Salmonella enteritidis*. **Avian Diseases**, v.35, p.357-343, 1991.
 7. DESMIDT, M.; DUCALETTE, R.; HAESBROUCK, F. Pathogenesis of *Salmonella* Enteritidis phage types four after experimental infection of young chickens. **Veterinary Microbiology**, v.56, p.99-109.1997.
 8. DEMATTÊ FILHO, L. C., MENDES, C.M.I. Viabilidade técnica e econômica na criação alternativa de frangos, In: CONFERÊNCIA APINCO 2001 DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS AVÍCOLAS Campinas, **Anais...** Campinas; FACTA, 2001, v.2, p.254-266.
 9. DHILLON, A N SN; ALISANTOSA, B. N; SHIVAPRASAD, H. L.; JACK, O.; SCHABERG, D.; BANDLI, D. Pathogenicity of *Salmonella* Enteritidis Phage Types 4, 8 and 23 in broiler chicks. **Avian Diseases**. n. 43, p.506-515,1999.
 10. FISCHER, M. Experience on poultry production, zoonose and animal welfare. In: EUROPEAN POULTRY CONFERENCE, 11., 2002, Bremen. **Abstracts...** Bremen: European Federation World's Poultry Service Association, 2002. p.6.
 11. FRIEDMAN, A. BAR-SHIRA, E. SKLAN. Ontogeny of gut associated immune competence in the chick. **World's Poultry Science Journal**, v.59, n. 2, p.209-219, 2003.
 12. FURLAN, R. L.; MACARI, M.; LUQUETTI, B. C. Como avaliar os efeito do uso de prebióticos, probióticos e flora de exclusão competitiva. 2004. SIMPÓSIO TÉCNICO DE INCUBAÇÃO, MATRIZES DE CORTE E NUTRIÇÃO, 5, ACAV, 2004 Balneário Camboriu, SC. **Anais...** Concórdia: EMBRAPA suínos e aves; p.6-28.

13. FOGAÇA, H. S. Desnutrição. In: ELIA, C. C.; SOUZA, H. S. P. **Imunologia da mucosa intestinal da bancada ao leito**. São Paulo: Atheneu, 2001. Cap.7.8,p.159-63.
14. GEORGIA POULTRY LABORATORY. **Monitoring and detection of *Salmonella* in poultry and poultry environments**. Oakwood: Georgia Poultry Laboratory, 1997.293p. [Workshop].
15. GORHAM, S.L.; KADAVIL, K.; VAUGAHAN, E.; LAMBERT, H.; PERT, B.; ABEL, J. Gross and microscopic lesions in young chickens experimentally with *Salmonella enteritidis*. **Avian Diseases**, v.38, p.816-821, 1994.
16. GRIEVES, D. B. Inmunologia aviar y aplicacionnes practices. In: XX Congresso Latino Americano de Avicultura. 1991, Quito, Equador. **Anais...** Quito:ACA,1991, p. 1-16.
- 17.HENDERSON, S.C., BOUNOUS, D.I., LEE, M.D. Early events in the pathogenesis of avian salmonellosis. **Infectotion and Immunity**,v.67, n.7 p.3580-3586,1999.
18. HONJO, K.; HAGIWARA, T.; ITOH, K.; TAKAHASHI, E. and HIROTA, Y. Immunohistochemical analysis of tissue distribution of B and T cells in germfree and conventional chickens. **Journal Veterinary Medicine Science**, 55:1031-1034. 1993.
19. ITO, N. M. K.; MIYAJI, C. I.; LIMA, E. A.; OKABAYASHI, S. Fisiopatologia do sistema gastroentérico. In: **Patologia do Trato Gastroentérico**. Paulínea: Elanco Saúde Animal, 1998.117p.
20. KRINKE, A. L.; JAMROZ, D. Effect of feed antibiotic avoparcine on organ morphology in broiler chickens. **Poultry Science**, v.75, n.6, p.705-710, 1996.
21. KINGSLEY, R. A., BAUMLER, A. J. Host adaptation and the emergence of infectious disease: the *Salmonella* paradigm. **Molecular Microbiology**, v. 36, n. 5, p.1006-1014. 2000.
23. LODDI, M. M. **Probióticos, prebióticos e acidificante orgânico para frangos de corte**. Jaboticabal: UNESP, 2003. Tese (Doutorado). Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias São Paulo, 1999.Tese (Doutorado). Instituto de Ciências biomédicas da Universidade de São Paulo. 52p.
24. LUNA, L.G. Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology. 3ed. New York: McGraw-Hill, 1968. 258p.
25. MACARI, M. ; MAIORKA, A. Função gastrintestinal e seu impacto no rendimento avícola. In: CONFERÊNCIA APINCO 2001 DE CIÊNCIAS E

- TECNOLOGIAS AVÍCOLAS, Campinas, 2000. **Anais...** Campinas: FACTA, 2001, p.161-174.
26. MADI, K.; ZALTMAN,C.; TAKIYA, C.M.Arquitetura da mucosa intestinal e sua plasticidade. p.11-39. In: ELIA, C. C.;SOUZA,H. S. P. **Imunologia da Mucosa Intestinal da Bancada ao Leito**. São Paulo: Atheneu, 2001.187p.
27. MAIORKA, A. Efeitos da idade da matriz, do jejum, da energia da ração e da glutamina sobre o desenvolvimento da mucosa intestinal e a atividade enzimática do pâncreas de pinto de corte. Jaboticabal: UNESP, 2002.Tese (Doutorado). Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias. 103p.
28. MAIORKA, A.; BOLELI, I. C.; MACARI,M. Desenvolvimento e reparo da mucosa intestinal. In: MACARI, M.; FURLAN, R. L.; GONZALES, E. (Ed) **Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte**. Jaboticabal: FUNEP/ UNESP, 2002, p.113-123.
29. MORAM Jr., E. T. Digestion and absorption of carbohydrates in fowl and events through perinatal development. **Journal Nutrition**, v.115, p.665-71, 1985.
30. MORRIS, B. C.; DANFORTH, H. D.; CALDWELL, D. J.; PIERSON, F. W.; McELROY, A. P. Intestinal mucosal mast cell immune response and pathogenesis of two *Eimeria acervulina* isolates in broiler chickens. **Poultry Science**, v.83, p. 1667-1674, 2004.
31. NITSAN, Z. The development of digestive tract in posthatched chicks.In: EUROPEAN SYMPOSIUM ON POULTRY NUTRITION 10,1995, Antalya. **Proceedings...** Antalya: WPSA, 1995, p.21-28.
32. NUNES, I., A. *Salmonella* Enteritidis-fagotipos, susceptibilidade a drogas a antimicrobianas e epidemiologia molecular baseada na sonda complementar ao rRNA. São Paulo, 1999. Tese (Doutorado). Instituto de Ciências biomédicas da Universidade de São Paulo. 119p.
33. REZENDE, C. S. M. Ocorrência de *Salmonella* em lotes de frangos de corte de agroindústrias goianas: identificação bacteriológica e perfil de sensibilidade a antimicrobianos. Goiânia, 2002. .Dissertação (Mestrado). Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás. 73p.
34. ROCHA, P. T.; MESQUITA, A. J.; ANDRADE, M. A.; LOULY,P. R.; NASCIMENTO, M. N. *Salmonella* spp. em forros de caixa de transporte e órgãos de pintos de um dia. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária**, v. 55, n. 6, p 672-676, 2003.
35. ROSE, M. E.; MILLARD, B. J; HESKETH. Intestinal changes associated with expression of immunity to challenge with *Eimeria vermiformis*. **Infection and Immunology**, v. 60, p.5283-5290,1992.

36. ROSTAGNO, H. S **Tabelas brasileiras para aves e suínos**; composição de alimentos e exigências nutricionais. Viçosa: UFV, Departamento de Zootecnia, 2000.141p.
37. SAMPAIO, I. B. M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. Belo Horizonte: Fundação de ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 1998. 221p.
38. SANTOS, L. R.; NASCIMENTO, W. 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 Instituto Medicina Tropical S. Paulo**, v. 45, n. 1, p.1-4, 2003.
39. SAS ®.1998. **User's Guide: Statistics**, Version 8th. SAS Institute Inc., Cary, NC.
40. SESTI, L.A.C. Filosofias e conceitos de biosseguridade e doenças com potencial de risco para avicultura brasileira. In: CONFERÊNCIA APINCO 2001 DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS AVÍCOLAS, Campinas, 2001. **Anais...**Campinas: FACTA, 2001, Simpósio sobre produção alternativa. v.1 p.47-91.
41. SKLAN, D. Development of the digestive tract of poultry. **World's Poultry Science Journal**, v.57, p.415-28, 2001.
42. SUZUKI, S. Pathogenicity of *Salmonella enteritidis* in poultry. **International Journal of Food Microbiology**, n.21, p. 89-105, 1994.
43. UNI, Z.; NOY, Y.; SKLAND, D. Posthatch development of small intestinal function. **Poultry Science**, v.78, p.215-22, 2000.
44. ZHAO, F.; OKINE, E. K.; CHEESEMAN, C.I. Glucose transport gene expression in lactating bovine gastrointestinal tract. **Animal Science**. v. 76, p.2921-2929, 1998.

CAPÍTULO 4- INFECÇÕES INAPARENTES EM CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS POR *Salmonella* Enteritidis EM FRANGOS DE CORTE ROSS E ISA LABEL

RESUMO: Avaliou-se, neste estudo, a capacidade invasiva do patógeno no saco vitelínico, papo, coração, fígado e ceco em aves aparentemente saudáveis de duas linhagens de frango criadas sem antibióticos promotores de crescimento na ração e oriundas de ovos inoculados na casca ou na cavidade alantóide com *Salmonella* Enteritidis. Foram realizados exames histológicos e bacteriológicos com um, sete, 14 e 21 dias pós-eclosão em aves de crescimento rápido ou lento. Constataram-se diferentes respostas entre as duas linhagens. O saco vitelínico foi mais persistente na linhagem de desenvolvimento rápido. Em ordem de colonização, detectou-se a *Salmonella* em 87,50% (14/16) e 38,12% (5/16) dos cecos; em 81,25% (13/16) e 12,50% (2/16) dos inglúvios; em 50% (8/16) e 6,25% (1/16) dos fígados; em 31,25% (5/16) e 6,25% (1/16) dos corações das linhagens de crescimento rápido e crescimento lento, respectivamente. Nos órgãos aparentemente saudáveis, com exceção do papo, evidenciou-se um processo inflamatório com predominância de macrófagos e ou linfócitos. A linhagem de crescimento lento foi mais hábil em eliminar a bactéria do seu organismo.

Palavras-Chaves: ceco, coração, excreção fecal, fígado, inflamação, inglúvio.

EXPERIMENTAL INOCULATION NON-APPARENT INFECTIONS OF *Salmonella* Enteritidis IN BROILER LINES ROSS E ISA LABEL

ABSTRACT: The invasive capacity of this pathogen in yolk sac, crop, heart, liver and ceca in apparently healthy birds of two broiler lines raised without growth promoter antibiotics in ration and originated from eggs inoculated eggshell and in allantoidal cavity with *Salmonella* Enteritidis. Histological and bacteriological exams were performed with one, seven, 14 and 21 days of age after hatch in broilers of fast and slow growing rate. The results were different for two lines. The yolk sac residue remained for fast growing rate line. In order, *Salmonella* was detected in 87,50% (14/16) and 38,12% (5/16) of ceca; in 81,25% (13/16) and 12,50% (2/16) of crops; in 50% (8/16) and 6,25% (1/16) of liver; in 31,25% (5/16) and 6,25% (1/16) of heart in fast and slow growing rate lines, respectively. In apparent healthy organs, excepted the crop, an inflammatory process with predominance of macrophage and lymphocytes. The slow growing rate line was effective to eliminate bacteria in the organism.

Key words: ceca, crop, fecal excretion, inflammation, heart,

INTRODUÇÃO

As salmoneloses ocupam posição de destaque na saúde pública em todo o mundo, pelas suas características de endemicidade, morbidade e, em

particular, pela dificuldade de controle. Todos esses aspectos decorrem dos múltiplos parâmetros epidemiológicos envolvidos, principalmente pelas inúmeras fontes de infecção e vias de transmissão presentes no ciclo (RODRIGUES, 2005)

O gênero *Salmonella* pode ser dividido em dois grandes grupos em função da patogênese. O primeiro inclui bactérias que produzem doenças sistêmicas em aves e raramente estão envolvidas em toxinfecção humana. Já no outro grupo as bactérias envolvidas podem produzir toxinfecção, mas a doença só se manifesta em condições especiais. *Salmonella* Typhimurium e *Salmonella* Enteritidis são capazes de produzir doença nas aves sob determinadas condições, porém, a maioria dos sorovares existentes pode colonizar o intestino sem causar doença (BARROW, 1999).

O grande problema desta zoonose reside no fato de que as infecções são predominantemente subclínicas, sendo caracterizadas, em alguns casos, apenas por queda na produtividade. O maior perigo está no fato de que a bactéria pode se propagar insidiosamente para outras espécies animais, veiculadas pelas fezes de aves infectadas ou por produtos contaminados, ressaltando-se que a *Salmonella enteritidis* tem sido considerada como um dos mais sérios patógenos para o homem e para a indústria avícola (SUZUKI, 1994, HOFER et al., 1997).

De acordo com o *Center for Disease Control* – (CDC, 2001), um milhão e duzentos mil casos de salmoneloses humanas ocorrem por ano nos Estados Unidos, sendo os produtos avícolas identificados como as principais fontes de infecção. HOLT et al. (1995) e GAST (1997) mencionaram que a *Salmonella* Enteritidis fagotipo 4 (PT4) é o sorovar mais envolvido em casos de gastroenterites humanas. No Brasil, nos trabalhos conduzidos por NUNES (1999) e SANTOS et al. (2003), os produtos de origem avícola também foram responsabilizados como as principais fontes de contaminação para o homem, com predominância da *Salmonella* Enteritidis PT4.

Inoculações experimentais em aves resultaram em infecção assintomática, ou discreta doença clínica, com considerável colonização intestinal (DHILLON et al., 2001). A habilidade de causar infecções sistêmicas ou localizadas é fortemente influenciada pela imunidade inata da espécie

hospedeira ou pela gama de genes de virulência codificados pela bactéria (BARROW et al., 1994; KINGSLEY & BAUMLER, 2000).

DESMIT et al. (1997) observaram que a penetração da *Salmonella* Enteritidis PT 4 através da parede intestinal pode ocorrer em estágios iniciais da infecção, mas a presença da bactéria não resulta necessariamente em sinais clínicos. Algumas disfunções do trato gastrintestinal (TGI) por *Salmonella* podem ser notadas e têm sido caracterizadas pelo acúmulo de alimentos e fluídos ao redor da cloaca nas primeiras semanas de vida (BARROW, 2000). Entretanto, a alta percentagem de pintos com colonização do TGI na primeira semana pode resultar em aves portadoras e, por ocasião do abate, esse agente pode ser incorporado ao produto final. O ceco assim como o ingluvío têm sido apontados como órgãos de eleição da *Salmonella*. HARGIS et al. (1995) verificaram que 52% dos conteúdos dos inglúvios e 15% dos cecos cultivados foram positivos para *Salmonella* em frangos de corte. CHAMBERS et al. (1998) relataram que o ingluvío recentemente tem sido considerado como fonte de contaminação de carcaças durante o processamento, embora sua colonização seja considerada transitória e menos persistente por BARROW (1988), e persistente por ANDREATTI FILHO & CROCCI (2002).

A presença da *Salmonella* Enteritidis PT 4 tem sido confirmada no conteúdo do saco vitelino em inoculações experimentais (GORHAM et al., 1994; DESMIDT et al., 1997) e naturais (O'BRIEN, 1988). O saco vitelínico é um órgão fundamental na proteção do aparelho digestório, pois fornece os elementos necessários para o desenvolvimento e preservação da mucosa nos três primeiros dias de vida (NOY et al., 1996; UNI et al., 1998; NOY & SKLAN, 1999).

HINTON et al. (1989) isolaram e identificaram a *Salmonella* Enteritidis do fígado e do ceco de aves sem evidências de sinais clínicos e lesões macroscópicas. Outros pesquisadores, como O'BRIEN (1988) e DHILLON et al. (1999), detectaram também pericardite e perihepatite. BARROW (1991) descreveu anteriormente que a pericardite pode ser persistente e causa de condenações em abatedouros. De acordo com HUMPHREY (1999), quadros de pericardite e perihepatite identificados durante

o processamento podem contaminar outros órgãos, equipamentos e ambientes.

Em Goiás, REZENDE (2002) detectou 75% de lotes de frango de corte de agroindústrias goianas positivos. ROCHA et al. (2003) identificaram a *Salmonella* Enteritidis em forros de caixas de pintos de um dia, oriundos de vários incubatórios, resultados que trazem preocupação para a saúde pública.

Para a produção alternativa regional, este problema ainda não tem parâmetro de comparação, tendo em vista que pesquisas não têm sido conduzidas neste segmento.

Neste sistema de criação, os desafios por agentes patogênicos talvez sejam maiores. DEMATEÉ FILHO & MENDES (2001) afirmaram que os maiores problemas de sanidade em produção alternativa referem-se ao desequilíbrio microbiano nos locais de criação, o que tem acarretado doenças, contrariando o principal objetivo deste sistema que é o estado de saúde das aves. Desenvolver linhagens mais resistentes à *Salmonella* pode ser um dos alvos da cadeia de produção alternativa para controlar esse microrganismo.

Neste contexto, a *Salmonella* Enteritidis representa um perigo potencial para a avicultura, não somente pelos prováveis efeitos adversos à produção, mas pelo possível impacto na comercialização e na saúde pública.

O presente trabalho teve o objetivo de avaliar os efeitos da presença da *Salmonella* Enteritidis, PT 4 no mecônio, no saco vitelino, no papo, no coração, no fígado, nos fragmentos do intestino e conteúdo cecal de pintos aparentemente saudáveis, a um, sete, 14 e 21 dias de vida pertencentes a duas linhagens de frangos de corte utilizadas em produções avícolas alternativas e que se originaram de ovos inoculados na casca e na cavidade alantóide.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram conduzidos dois experimentos no setor de Doenças de Aves, nos Laboratórios de Bacteriologia e de Histopatologia, nos Isolamento do Hospital Veterinário e do Setor de Reprodução da Escola de Veterinária (EV) da Universidade Federal de Goiás (UFG).

Delineamento e Tratamentos

No Experimento 1 foram utilizados 256 pintos de corte, sendo 128 de crescimento rápido (Ross) e no Experimento 2, 128 pintos de corte de crescimento lento (ISA Label “pescoço pelado”).

As aves foram distribuídas em esquema fatorial 2 X 2 (via de inoculação X agentes inoculados), com cinco repetições por tratamento. em esquema fatorial 2 X 2 (via de inoculação X agentes inoculados), com cinco repetições por tratamento. O Tratamento A₁ foi constituído por 32 pintinhos oriundos de ovos inoculados na casca com 0,1mL contendo $1,5 \times 10^2$ unidade formadora de colônia (UFC) de *Salmonella Enteritidis* FT 4 (A1). O grupo controle (A₂), constituído por 32 pintos, foi inoculado da mesma maneira, mas com solução salina esterilizada tamponada a 0,85% (placebo). O Tratamento B₁ foi também constituído de 32 pintos oriundos de ovos inoculados na cavidade alantóide com 0,1mL contendo $1,5 \times 10^2$ UFC do mesmo patógeno. O grupo controle (B₂), também com 32 pintos, foi inoculado da mesma maneira com solução salina esterilizada tamponada a 0,85%.

Nos dois experimentos, os tratamentos foram compostos de cinco parcelas de seis pintos cada e mantidos nas mesmas condições em diferentes locais de isolamento. Para cada tratamento, duas aves foram retiradas e sacrificadas antes do alojamento. As aves foram alojadas em baterias de aço galvanizado aquecidas com cinco andares.

O aquecimento foi feito com uma lâmpada incandescente de 60W até 21 dias de idade. As baterias foram providas de comedouros e bebedouros tipo linear e bandejas para retirada de excretas. Água e ração foram disponibilizadas *ad libitum*, sendo a ração, sem antibióticos promotores de crescimento, elaborada atendendo a instrução normativa do MAA DOI /DIPOA nº 007/99 (BRASIL, 1999).

Ao alojamento, as aves foram pesadas e distribuídas nas baterias em parcelas homogêneas. Duas vezes ao dia as aves foram examinadas. Com um, sete, 14 e 21 dias de vida, os pintos foram pesados e duas aves por tratamento foram encaminhadas para o Laboratório de Doenças de Aves onde permaneceram em jejum por um período de seis a oito horas.

As aves foram pesadas e sacrificadas por secção interna dos vasos do pescoço, necropsiadas e os órgãos avaliados macroscopicamente. Foram retirados o saco vitelino, o papo, o coração, o fígado e a vesícula biliar que foram pesados individualmente. Foram obtidos fragmentos de aproximadamente 3,0 cm de comprimento de cada uma das três regiões do intestino delgado - porção inicial do duodeno; - 2,0 cm acima do divertículo de Meckel do jejuno; - próximo da junção ileocecal. Estes fragmentos foram seccionados longitudinalmente, abertos e suas extremidades presas com grampos em um pedaço de madeira. Cada peça anatômica foi colocada em frascos identificados, que continham formol neutro tamponado a 10%. Paralelamente, coletaram-se de cada animal conteúdo cecal, saco da gema, coração, fígado e papo para análises bacteriológicas.

Exames histopatológicos

Foram processadas 192 amostras de acordo com a metodologia convencional de LUNA (1968) adotada pelo Laboratório de Patologia da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás.

Uma vez fixadas por 24h em solução de formalina neutra tamponada a 10%, os fragmentos foram recortados, acondicionados em cassetes e identificados. Em seguida, foram lavados em água corrente para retirada de excessos de pigmentos de formol e posteriormente desidratados em álcool etílico em série crescente, desde 70% até álcool absoluto. Posteriormente, procedeu-se à clarificação com xilol e impregnação em parafina histológica, com ponto de fusão a 56^o C. Os fragmentos de 5,0 mm foram incluídos em blocos de parafinas histológicas, seccionados a 5,0 µm em micrótomo rotativo, marca American-Optical, modelo Spencer-820, utilizando navalhas descartáveis, laminados, e coradas pelo método de Hematoxilina - Eosina (HE), sendo as lâminas lidas em microscópio óptico de campo claro, marca Carl Zeiss, modelo JENAVAL.

Pesquisa de *Salmonella*

A pesquisa da *Salmonella* Enteritidis foi realizada nos conteúdos dos cecos, dos sacos da gema, fragmentos de papo, coração e fígado em acordo

com GEORGIA POULTRY LABORATORY (1997), com modificações. Imediatamente após colheita das amostras, realizada de forma asséptica, um grama de cada peça anatômica foi pesado e homogeneizado em 9mL de caldo selenito cistina (CS). Com auxílio de uma alça níquel-cromo alíquotas do CS foram plaqueadas por esgotamento em estrias em ágar verde brilhante, ágar Hecktoen e ágar MacConkey e incubados por 24h a 37⁰ C. Caso não ocorresse crescimento de unidades formadoras de colônias sugestivas de *Salmonella* nos meios seletivos utilizados, alíquotas do CS de 24h de incubação eram transferidas com o auxílio de alça de níquel - cromo para os mesmos meios, que eram incubados pelo mesmo tempo e à mesma temperatura.

Pescaram-se das placas em que houve crescimento, de três a cinco unidades formadoras de colônias com características morfológicas de *Salmonella* e transferidas para tubos contendo o ágar tríplice açúcar ferro (TSI), os quais foram incubados a 37⁰ C por 18-24 horas. Isolados no ágar TSI com crescimento sugestivo de *Salmonella* foram submetidos aos testes da produção de urease e do indol, da motilidade, de H₂S , do malonato e lisina descarboxilase. Submeteram-se aqueles isolados que apresentaram reações bioquímicas compatíveis com *Salmonella* ao teste sorológico com antissoros polivalentes somáticos. Amostras positivas à sorologia foram remetidas à Fundação Osvaldo Cruz (FIOCRUZ) em meio ágar nutriente para tipificação e confirmação do sorovar inoculado e recuperado.

Análises estatísticas

No tratamento estatístico dos dados empregou-se o teste não paramétrico do qui-quadrado (X^2) para avaliar a frequência de colonização de órgãos entre as duas linhagens e as vias de inoculação da *Salmonella* Enteritidis (SAMPAIO, 1998).

Utilizou-se o procedimento *General Linear Models* do programa SAS para os pesos médios dos sacos vitelínicos e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey (5%) (SAS, 1998).

RESULTADOS

Experimento 1- linhagem de crescimento rápido-Ross

No Experimento 1, pintos originados de ovos inoculados na casca com a *Salmonella* Enteritidis (Tratamento A₁) apresentaram 50% (15/30) de mecônios positivos para o patógeno. As aves inoculadas na cavidade alantóide (Tratamento B₁) apresentaram 76,66% (23/30) de mecônios positivos para *Salmonella* Enteritidis, perfazendo um total de 63,33% (38/60) de pintos nascidos infectados. As aves inoculadas na casca (Tratamento A₂) e na cavidade alantóide (Tratamento B₂) com o placebo apresentaram-se livres do patógeno.

Observa-se na Tabela 1, o período de permanência do saco da gema aos dias sete, 14 e 21 dias, verificando maior peso relativo do saco vitelínico ($P>0,05$) para as aves inoculadas com *Salmonella* Enteritidis na cavidade alantóide.

TABELA 1 - Valores médios do peso relativo (g/100 g de peso vivo) do saco vitelino de frangos da linhagem Ross com um, sete, 14 e 21 dias de vida.

Via de inoculação	Idade			
	1	7	14	21
Casca	10,82	0,21	0,03	0,04
Cavidade alantóide	16,07	0,31	0,09	0,01
Agente inoculado (A)				
<i>Salmonella</i> Enteritidis (SE)	16,60	0,38	0,08	0,06
Placebo	10,30	0,05	0,07	0,00
Fator de variação (%)				
V	2,15	ns	ns	ns
A	1,17	ns	ns	ns
V x A	1,91	ns	ns	ns
CV(%)	15,066	191,48	167,94	279,11

Nota-se na Tabela 2 que a interação entre vias de inoculação e o agente inoculado para o primeiro dia de foi significativo ($P<0,05$). Verifica-se que o peso relativo dos sacos vitelínicos diferiu estatisticamente ($P<0,05$) quando a *Salmonella* Enteritidis foi o agente inoculado na cavidade alantóide em relação ao grupo inoculado com o placebo e o patógeno inoculado na casca. Todavia, o placebo não determinou diferenças ($P>0,05$) em nenhuma das vias inoculadas.

TABELA 2- Desdobramento das interações significativas entre os fatores via de inoculação e agente inoculado para o peso relativo (g/100 g de peso vivo) do saco vitelino

Agente inoculado	Via de inoculação	
	Casca	Cavidade alantóide
<i>Salmonella</i> Enteritidis	12,26 Aa	14,94 Bb
Placebo	11,09 Aa	10,30 Aa

Letras maiúsculas (minúsculas) diferentes na mesma coluna (linha) diferem estatisticamente pelo teste de Turkey (5%)

Observa-se na Figura 1 que a *Salmonella* Enteritidis foi recuperada em 87,50% (14/16) dos cecos analisados, em 81,25% (13/16) dos papos, em 50,00% (8/16) dos fígados; em 50% (8/16) dos sacos vitelínicos e em 31,25% (5/16) dos corações.

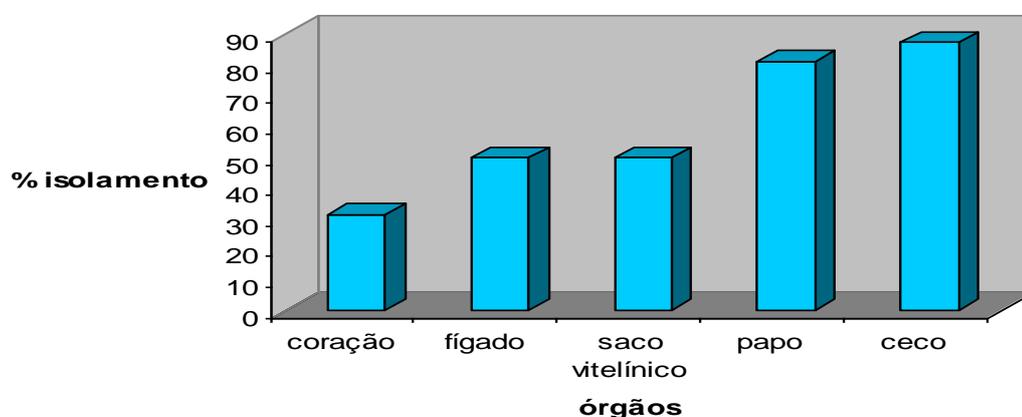


FIGURA 1 - Frequência de isolamentos da *Salmonella* Enteritidis de órgãos aparentemente saudáveis.

Da análise dos resultados histopatológicos sumarizados na Tabela 4, observa-se que a inflamação consistiu de infiltrado de células mononucleares com predominância de macrófagos e/ ou linfócitos, necrose no fígado e hemorragia no coração. No papo, não se constatou nenhuma lesão macroscópica sugestiva de inflamação.

TABELA 4 -Principais alterações histopatológicas observadas em órgãos de aves Ross aparentemente saudáveis, oriundas de ovos experimentalmente inoculados pela *Salmonella* Enteritidis, e sacrificadas aos um, sete, 14 e 21 dias vidas.

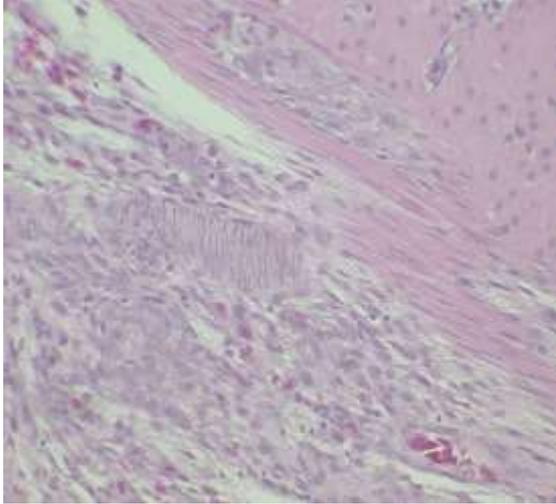
	1 dia IICM	7 dias IICM	14 dias IICM	21 dias IICM
Coração	++*	++*	A	+
Fígado	A**	++	A	+
Papo	A	A	A	A
Mucosa (jejuno, íleo, ceco)	++++	A	A	A
Mucosa (íleo, ceco)	A	A	++	++
Mucosa+submucosa (duodeno, ceco)	A	++	A	A
Mucosa+ subumucosa (jejuno, íleo)	A	+++	++	A
Mucosa+submucosa (ceco)		++		
Mucosa+submucosa+ serosa (ceco)		+	++	A

IICM = Inflamação consistiu no infiltrado de células mononucleares (macrófagos e/ ou linfócitos); apresentou hemorragia (*), apresentou necrose (**); A = ausência de lesões.

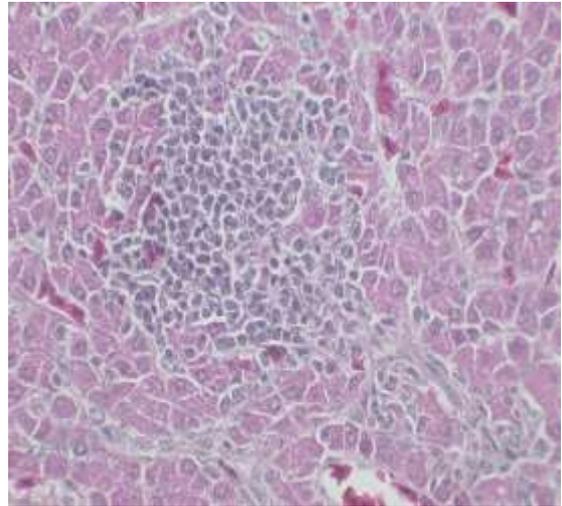
No coração, observou-se infiltrado inflamatório mononuclear discreto e focal em 31,25% (5/16), sendo apenas dois com hemorragia discreta e focal e um com hemorragia discreta e multifocal no epicárdio (Figura 2).

A análise histopatológica do fígado revelou alterações em 37,50% (6/16), sendo em 18,75% (3/16) dos casos observados infiltrados inflamatórios discreto multifocais e mononucleares (Figura 2), e necrose dos hepatócitos em 18,75% (3/16).

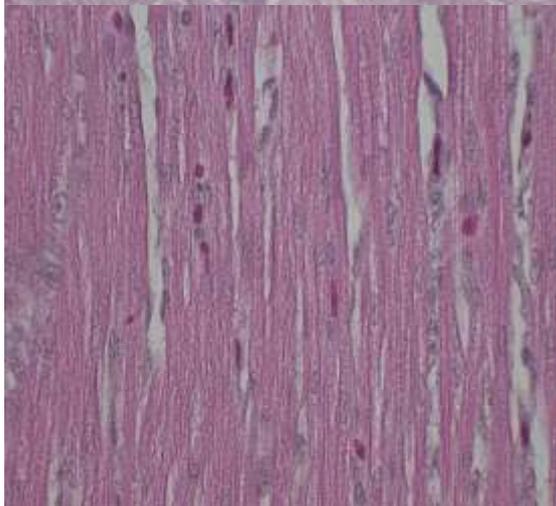
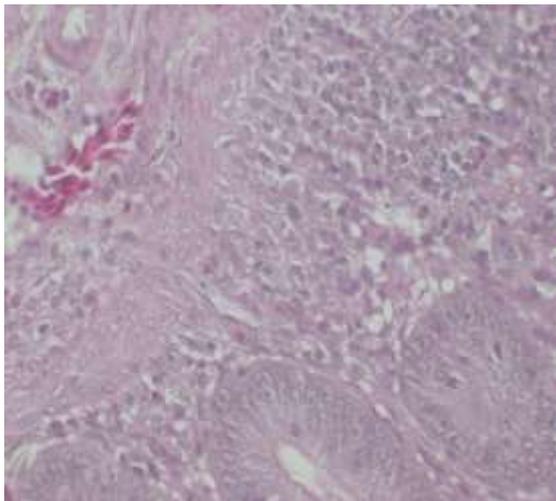
Os exames histológicos do duodeno revelaram infiltrados inflamatórios mononucleares de moderado a acentuado e difusos na mucosa e submucosa de 12,50% (2/16) dos fragmentos analisados (Figura 2); enquanto no jejuno 25,00% (4/16) de infiltrados inflamatórios mononucleares moderado a acentuado e difuso na mucosa; em 31,25% (5/16) os mesmos infiltrados de discretos a moderados e difusos na mucosa e submucosa. No íleo infiltrados inflamatórios de gravidade discreta a moderada e difusos em 25,00% (4/16) na camada mucosa, e na mucosa e submucosa 37,50% (6/16) infiltrados inflamatórios de gravidade discreta a moderada. Por outro lado nos cecos evidenciou-se em 43,75% (7/16) infiltrado inflamatório discreto a acentuado, e de difuso e multifocal na camada mucosa, na mucosa e submucosa 18,75% (3/16); discreto a moderado e difuso e multifocal. Nas camadas mucosa, submucosa e serosa (Figura 2) observaram-se os mesmos infiltrados em 18,75% (3/16).

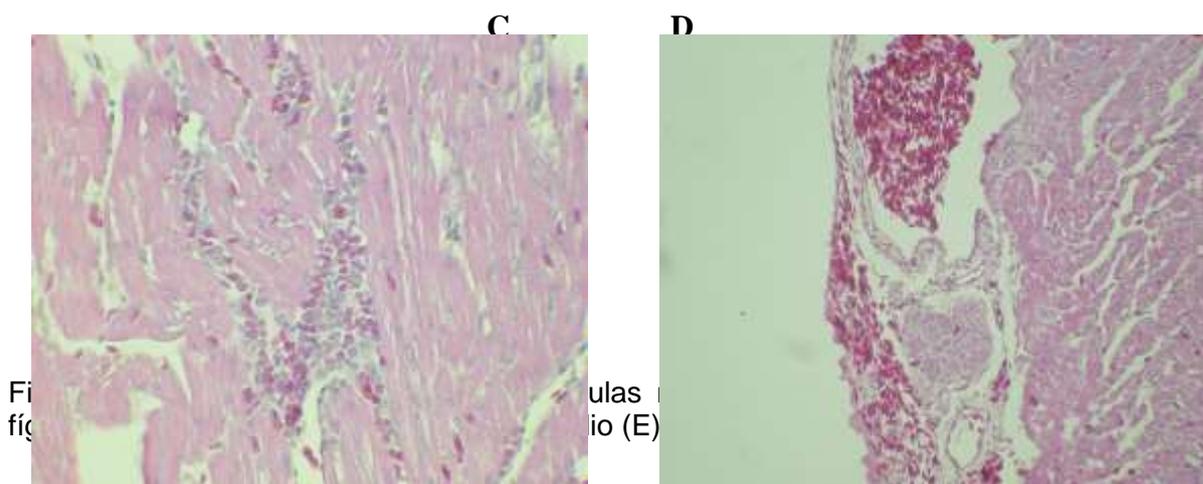


A



B





Experimento 2- linhagem de crescimento lento-ISA Label

As aves do Tratamento A₁, que se originaram de ovos inoculados na casca com a *Salmonella* Enteritidis, apresentaram 3/30 (10%) de mecônios positivos para o patógeno. As aves do Tratamento B₁ inoculadas na cavidade alantóide tiveram 8/30 (26,66%), perfazendo um total de 11/60 (18,33%) de pintos que nasceram infectados. As aves do Tratamento A₂ inoculadas na casca com o placebo, assim como as do Tratamento B₂ inoculadas na cavidade alantóide também com o placebo apresentaram-se livres do patógeno.

Quando se analisa a via de inoculação, à eclosão, na Tabela 5, verifica-se que o peso do saco vitelínico apresentou maior peso relativo ($P < 0,05$) quando se utilizou a casca como via de inoculação, entretanto a *Salmonella* Enteritidis não influenciou o peso relativo do órgão.

TABELA 5 - Peso relativo (g/100 g de peso vivo) do saco vitelino de frangos da linhagem ISA Label com um, sete, 14 e 21 dias de vida

Via de inoculação (V)	1 dia	7 dias	14 dias	21 dias
Casca	18,71b	A	A	A
Cavidade alantóide	12,82a	A	A	A
Agente inoculado (A)				
<i>Salmonella</i> Enteritidis	15,28	A	A	A
Placebo	15,92	A	A	A
Fator de variação (%)				
V	0,27	-	-	-
A	ns	-	-	-
V x A	ns	-	-	-
CV (%)	8,46	-	-	-

a, b - letras maiúsculas (minúsculas) diferentes na mesma coluna (linha) diferem estatisticamente. (A) = ausência do saco da gema

A *Salmonella* Enteritidis foi recuperada em 38,12% (5/16) dos cecos; em 3/16 (18,75%) dos sacos vitelinos analisados, em 2/16 (12,5%) dos papos, em 1/16 (6,25%) dos fígados; em 1/16 (6,25%) dos corações.

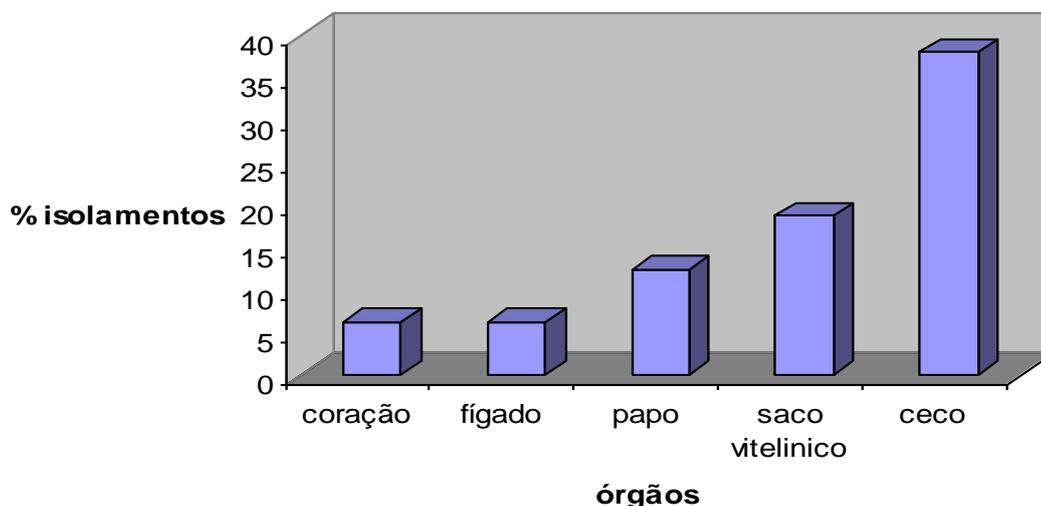


FIGURA 3 - Recuperação da *Salmonella* Enteritidis em órgãos de aves aparentemente saudáveis.

Das análises histopatológicas da ISA Label sacrificadas aos um, sete, 14 e 21 dias de vida, detectaram-se alterações do duodeno, do ceco e do íleo, onde se identificaram infiltrados inflamatórios mononucleares na camada mucosa de intensidade discreta e distribuição difusa em 12,50% (2/16). No coração, constatou-se infiltrado inflamatório mononuclear discreto em 6,25% (1/16) e hiperemia discreta no fígado só no dia da eclosão em 6,25% (1/16).

DISCUSSÃO

O saco vitelino nos primeiros dias pós-eclosão é a maior fonte de nutrientes para a ave, tendo papel na proteção do aparelho digestivo, na manutenção e na produtividade do lote. Porém, segundo ALMEIDA et al. (2003), não existe consenso sobre os fatores que influenciam a utilização do seu conteúdo pós-eclosão. Observou-se diferente padrão de resposta entre tratamentos e linhagens em relação ao peso relativo do saco vitelínico. A redução de peso do saco vitelínico foi observada com a idade, sendo que a

linhagem de crescimento rápido apresentou menor peso relativo ao nascer e o tempo de permanência de resíduos da gema foi além do sete dias de vida. O peso relativo do saco vitelínico foi superior ($P < 0,05$) para aves Ross provenientes de ovos inoculados na cavidade alantóide com *Salmonella* Enteritidis.

Na linhagem ISA Label o peso relativo do saco vitelínico foi de aproximadamente 10% em relação ao peso corporal do pinto e a absorção dos resíduos do saco da gema foi mais rápida, não havendo diferença ($P < 0,05$) entre as aves inoculadas e as aves controle (NOY & SKLAN, 1998). Para a linhagem Ross, os pesos relativos dos sacos da gema foram consideravelmente maiores ($P < 0,05$), entre pintos infectados e controle no dia de eclosão. Entretanto, observou-se persistência e maior peso relativo do saco da gema aos sete dias (100%), com alterações macroscópicas de inflamação nas aves infectadas. A bactéria foi isolada dos conteúdos do órgão aos sete, 14 e 21 dias.

Estes resultados sugerem que a absorção do conteúdo do saco da gema está relacionada com a linhagem e a presença do patógeno. Além dos aspectos considerados por NOY et al. (1996), UNI et al. (1998) e NOY & SKLAN (1999), deve-se ressaltar que a persistência de resíduos da gema tem papel epidemiológico importante, pois os animais podem permanecer portadores, albergando o agente no divertículo de Meckel. De acordo com DESMIDT et al. (1997), este é um aspecto relevante, pois em períodos de estresses ou de doenças intercorrentes, podem levar ao recrudescimento da infecção. Deve-se acrescentar que de acordo com WIGLEY (2004), há possibilidade de contaminação cruzada durante o transporte e o processamento no abatedouro.

Salmonella Enteritidis foi recuperada em órgãos coletados de pintos aparentemente saudáveis das linhagens estudadas sacrificados com um, sete, 14 e 21 dias de vida. Salienta-se que as aves sacrificadas dos grupos inoculados apresentaram, à necropsia, persistência do saco da gema. Contudo, nos animais dos grupos controle, não foram registradas lesões aparentes a não ser a persistência do saco vitelínico em duas aves com resultados bacteriológicos negativos.

Das 16 amostras de ceco da linhagem Ross, 87,50% (14/16) das aves foram bacteriologicamente positivas para *Salmonella* Enteritidis e em 75,00% (13/16) ocorreram infiltrados inflamatórios de células mononucleadas na mucosa, e ou submucosa, com gravidade e distribuição variáveis. Para a linhagem ISA Label, 38,12% (5/16) dos cecos bacteriologicamente positivos para *Salmonella* Enteritidis apresentaram as mesmas lesões histológicas descritas anteriormente. GORHAM et al. (1994) detectaram, entre outras lesões do ceco, *debris* necróticos, infiltrados de heterófilos, macrófagos e aglomerados de bactérias.

DESMIDT et al. (1997), inoculando a *Salmonella* Enteritidis PT4 no papo de aves SPF com um e quatro dias de vida, detectaram no ceco, três horas após inoculação, infiltrado de heterófilos (como única célula na lâmina própria de poucos animais) e na submucosa da maioria das aves. Posteriormente, os autores encontraram infiltrados de macrófagos na submucosa de muitas aves e na lâmina própria de poucas aves e serosite do ceco. DHILLON et al. (2001) descreveram que a enterite foi primeiramente caracterizada pelo aumento de linfócitos e macrófagos na lâmina própria do ceco e, algumas vezes, do íleo, que se estendiam às camadas mucosa e muscular. DESMIDT et al. (1998), inoculando altas doses de *Salmonella* Enteritidis PT4, observaram aumento do número de linfócitos na lâmina própria e na camada muscular do ceco e no intestino delgado de poucas aves. Diferentemente, DESMIDT et al. (1997) e DHILLON et al. (2001) descreveram que as lesões ocorreram, preferencialmente, nas mucosas e submucosas com predominância de células mononucleadas.

Por outro lado, os resultados bacteriológicos dos mecônios, independente da via de inoculação experimental, indicaram que a linhagem Ross apresentou 63,33% de excreção positiva para *Salmonella* Enteritidis, comparada à frequência de 18,33% para os pintos ISA Label. A excreção fecal entre as duas linhagens foi significativamente ($P < 0,05$) diferente ao nascimento. KRAMER et al. (2001) relataram que diferenças de colonização cecal foram registradas com a *Salmonella* Enteritidis PT1 entre duas linhagens, uma de corte e outra de postura, e atribuíram a diferença às células fagocíticas, às respostas mediadas por células e á capacidade de produção de anticorpos.

BERTHELOT-HÉRAULT et al. (2003) observaram também que a colonização do ceco foi diferente em quatro linhagens sugerindo diferentes respostas imunes sistêmicas e locais das aves.

A habilidade do sorovar em colonizar o trato gastrointestinal parece estar relacionada com a imunidade inata do hospedeiro e a carga genética da espécie, o que está respaldado por BARROW et al. (1994) e KINGSLEY & BAUMLER (2000). O estabelecimento da microbiota intestinal com a idade (CORRIER et al., 1991), assim como o mecanismo de resistência idade-dependente (DESMIDT et al., 1998) são fatores que reduzem a excreção fecal. Entretanto, mesmo poucas aves que permaneçam com colonização cecal, passarão a ser portadoras inaparentes do patógeno até o ciclo final de produção, constituindo perigo potencial de contaminação de carcaças no abatedouro.

Dos 16 inglúvios examinados, tanto da linhagem Ross quanto ISA Label, nenhum apresentou alteração histológica até os 21 dias de vida, o que está de acordo com DESMIDT et al. (1997). Por outro lado, no mesmo órgão, em 81,25% (13/16) da linhagem Ross e 12,5% (2/16) da ISA Label, a *Salmonella* Enteritidis foi recuperada. O número elevado de isolamento neste órgão pode ser atribuído ao jejum de 6-8h a que as aves foram submetidas, possibilidade apontada por HUMPHREY et al. (1993) que relataram alta frequência de *Salmonella* Enteritidis recuperada do inglúvio após 24h de privação de alimentos e por RAMIREZ et al. (1997), mas com jejum de 18h.

De acordo com HARGIS et al. (1995), o inglúvio é considerado um dos principais reservatórios da *Salmonella* e HINTON et al. (2000) relataram que a retirada do alimento propicia redução da população bacteriana produtora de ácido láctico, diminuindo a habilidade em inibir o crescimento de microrganismos da família *Enterobacteriaceae*. CHAMBERS et al. (1998) afirmaram que o inglúvio tem sido considerado fonte de contaminação de carcaças durante o processamento, mesmo que esta colonização apresente tendência de declinar com a idade. Porém, mesmo um baixo índice de infecção do órgão representa uma séria ameaça para contaminação da carcaça de frangos, como sustentado por HARGIS et al. (1995), pois o papo é mais susceptível a ruptura durante a evisceração do que o ceco. Para CHAMBERS

et al. (1998), os *swabs* de ingluvío parecem ser uma ferramenta útil para monitorar a contaminação por *Salmonella* em estabelecimento de abate.

Em 50% (8/16) dos fígados da linhagem Ross e em 6,25%(1/16) dos fígados da ISA Label o patógeno foi recuperado. Nos exames histopatológico ingluvíos lógicos do fígado da linhagem Ross notaram-se infiltrado inflamatório mononuclear e necrose dos hepatócitos com gravidade discreta e com distribuição multifocal em 37,50% (6/16). Já na linhagem de ISA Label, 6,25% (1/16) dos fígados avaliados apresentou hiperemia discreta. HUMPHREY et al (1992) inocularam galinhas de 20 semanas de vida com *Salmonella* Enteritidis e observaram focos de necrose e infiltração de heterófilos no fígado após cinco dias da inoculação. HUMPHREY (1999) relatou que as infecções causadas por esse agente em poedeiras se manifestam de maneira diferente dos frangos de corte. DESMIDT et al. (1997), inoculando a *Salmonella* Enteritidis PT4 no papo de aves SPF com um e quatro dias de vida, detectaram pequenos focos inflamatórios até quatro dias pós-inoculação e necrose focal de hepatócitos, circundados por células inflamatórias do quarto ao sétimo dia. DHILLON et al (1999) estudaram os efeitos da *Salmonella* Enteritidis PT4 em frangos de corte Hubbard e detectaram necrose de hepatócitos com infiltrados de heterófilos e poucos linfócitos e macrófagos.

Em 31,25% (5/16) e em 6,25% (1/16) dos corações das linhagens de crescimento rápido e lento, respectivamente, a bactéria foi recuperada. Notaram-se também infiltrado inflamatório mononuclear no epicárdio e hemorragias em três dos cinco órgãos examinados. GORHAM et al. (1994) detectaram inflamação do pericárdio com infiltração de heterófilos, macrófagos e fibrina. DESMIDT et al. (1997) verificaram pericardite, miocardite com infiltrados de macrófagos até 14 dias pós-inoculação e miocardite focal. Após 21 dias de inoculação, ocorreu endocardite com infiltrados de muitos heterófilos e poucos macrófagos. DESMIDT et al. (1998), inoculando altas doses de *Salmonella* Enteritidis PT4, observaram infiltrações linfocíticas no epicárdio e miocárdio de poucas aves e DHILLON et al. (1999) identificaram pericardite linfocítica.

As alterações histopatológicas detectadas nos órgãos são similares às descritas por HUMPHREY et al. (1992), GORHAM et al. (1994), DESMIDT

et al. (1997), DESMIDT et al. (1998), DHILLON et al. (1999), exceto pela ausência ou inexpressiva observação de heterófilos nos cortes histológicos analisados, o que pode sugerir um processo infeccioso tendendo a cronicidade onde as alterações microscópicas foram de intensidades mais discretas e menos pronunciadas. Conforme ITO (1990), qualquer processo inflamatório nas aves obedece a uma mesma seqüência de alterações morfológicas, que se inicia com alterações vasculares rapidamente sucedida por exsudação significativa de fluído plasmático e heterófilos, com afluxo de células mononucleares após a sexta hora.

Os resultados histológicos associados aos bacteriológicos da linhagem Ross sugerem uma resposta inflamatória com predominância de células inflamatórias mononucleares em 68,75% (11/16) no trato gastrintestinal, em 31,25% (5/16) dos corações, em 18,75% (3/16) do fígado e em 0% (0/16) dos inglúvios. Também HENDERSON et al. (1999), em estudos utilizando a técnica de imunohistoquímica com inoculações experimentais com a *Salmonella* Typhimurium, evidenciaram infiltrados inflamatórios predominantemente mononucleares no ceco e intestino delgado. VAN IMMERSSEEL et al. (2002), empregando o mesmo método, ao investigar a dinâmica da invasão da *Salmonella* Enteritidis, observaram que a resposta inflamatória foi predominantemente pelos macrófagos e linfócitos. KRAMER et al. (2003) chegaram a mesma conclusão sobre a capacidade do patógeno de invadir tecidos de frangos clinicamente saudáveis ao trabalharem com diferentes linhagens de células *in vitro*.

No início da infecção, interações íntimas ocorrem entre a bactéria e o hospedeiro que acontecem primariamente no ambiente do lúmen intestinal, com posterior invasão nas células epiteliais e fagocitárias (SOLANO et al. 1998).

Após colonização do intestino, as salmonelas são hábeis para penetrar a mucosa epitelial, iniciar e estabelecer um quadro de uma infecção sistêmica. Após a infecção, fagócitos iniciam a eliminação do agente. A maturidade intestinal associada ao desenvolvimento dos tecidos linfóides do trato gastrintestinal pode ser um pré-requisito para eliminação da *Salmonella* Enteritidis (DESMIDT et al. 1997 e HENDERSON et al. 1999).

BEAL et al. (2004) observaram uma diminuição na duração da infecção com a idade e relataram que, preliminarmente, os aglomerados linfóides são imaturos durante as primeiras semanas pós-eclosão e seu desenvolvimento pode ser um elemento fundamental para a eliminação da *Salmonella* Enteritidis. Já KRAMER et al. (2001) observaram que o ataque aos tecidos dos hospedeiros é o passo mais importante para estabelecer a infecção bacteriana. Interações do agente com o epitélio têm mostrado a indução de alterações microscópicas de órgãos. QURESHI (1998) relatou que a primeira linha de defesa imunológica é constituída pelos macrófagos e estes representam um passo importante durante a interação com agentes infecciosos. Em conclusão, o autor afirmou que os macrófagos são células efetoras cruciais nas respostas imunes inatas e adquiridas das aves.

DESMIDT et al. (1998) verificaram que a aderência de *Salmonella* à mucosa intestinal constitui o primeiro passo para se estabelecer a infecção. A eliminação do agente depende da resposta humoral e da resposta imune local no intestino, que se desenvolvem após o nascimento, sendo que a imunidade local parece ser mais efetiva. QURESHI et al. (2000) descreveram que os sistemas linfóides organizados e não-organizados constituem as duas categorias do sistema imune das aves. Estruturas linfóides não-organizadas distribuem-se através do intestino, representando o principal papel de defesa do sistema imune e constituindo uma importante barreira aos patógenos externos. Componentes não-linfóides do sistema imune incluem células que propiciam uma defesa não-imunológica do hospedeiro. Os macrófagos de aves têm sido apontados como destruidores de 80% da *Salmonella* após internalização.

Para KRAMER et al. (2003), vários leucócitos estão envolvidos nas reações para conter as infecções por *Salmonella* em aves. Os vários tipos de leucócitos reagem diferentemente nas infecções, alguns eliminam a infecção e outros podem efetivamente internalizar a bactéria, tornarem-se infectados, veicular e causar a disseminação. Além dos macrófagos, também as células T e B podem veicular e promover a disseminação no organismo.

Em uma infecção por *Salmonella*, alguns animais morrem, outros podem permanecer como hospedeiro da bactéria sem apresentar nenhum

sintoma, e este estado de ave portadora geralmente é o que estabelece a conexão epidemiológica entre as aves e os homens (BEAUMONT et al. 2004), Destaca-se que estas informações são corroboradas neste estudo, principalmente para a linhagem Ross.

A presença de *Salmonella* Enteritidis em órgãos internos e evidentes alterações histológicas não resultaram em sinais clínicos e alterações macroscópicas, entretanto o presente estudo evidenciou a capacidade invasiva da *Salmonella* Enteritidis PT4 principalmente na linhagem Ross. Considerando que os animais foram submetidos aos mesmos tratamentos, aos mesmos desafios e as mesmas condições de isolamentos e alimentação pode-se apontar os componentes genéticos das linhagens dos frangos de corte pelas diferenças observadas.

CONCLUSÕES

Nas condições do presente experimento pode-se concluir:

1. a linhagem Ross foi mais sensível à infecção experimental pela *Salmonella* Enteritidis do que a ISA Label;
2. a presença da *Salmonella* Enteritidis no saco vitelínico da linhagem Ross foi mais freqüente e epidemiologicamente representa risco para a saúde pública;
3. o ceco, o jejuno e o íleo foram afetados pela *Salmonella* Enteritidis e o papo, embora positivo para a *Salmonella* Enteritidis, não apresentou nenhuma alteração histopatológica nas linhagens estudadas;
4. a capacidade invasiva do patógeno foi demonstrada, com maior freqüência, nas duas primeiras semanas de vida nas linhagens estudadas entretanto a ISA Label foi mais hábil em eliminar o agente do organismo.

REFERÊNCIAS

1. ALMEIDA, J. G.; FARIA FILHO, D. E.; DAHLKE, F.; MAIORKA, A.; FURLAN, R. L. In: Conferência Apinco 2003 de Ciências e Tecnologias

- Avícolas. **Revista Brasileira de Ciências Avícola**, suplemento 5. p.93 2003.
2. ANDREATTI FILHO, R.L.; CROCCI, A. J. Efeito protetor da microbiota congelada e liofilizada sobre a infecção experimental de frangos de corte por *Salmonella entérica* sorovar Enteritidis. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.54, p. 457-461, n. 5, 2002.
 3. BARROW, P.A., SIMPSON, J. M., LOVELL, M. A. Intestinal colonization in the chicken by food-poisoning *Salmonella* serotypes: microbial characteristics associated with faecal excretion. **Avian Pathology**, n.17, p.571-588, 1988.
 4. BARROW, P. A. Experimental infection of chickens with *Salmonella enteritidis* **Avian Pathology**, v.20, p 145-153, 1991.
 5. BARROW, P. A., HUGGINS, M. B., LOVELL, M. A. Host specificity of *Salmonella* infectious in chickens and mice is expressed in vivo primarily at the level of the reticuloendothelial system. **Infection and Immunity**, n. 62, p 4602-4610, 1994.
 6. BARROW, P. A. Experimental infection of chickens with *Salmonella enteritidis* **Avian Pathology**, v.20, .p 145-153, 1999.
 7. BARROW, P. A. The paratyphoid salmonellae. **Rev. Scienc Tec.**, v.19, n.2., p. 351-375, 2000.
 8. BEAL, R.K.; WIGLEY, P.; POWERS, C.; HULME, S.D. BARROW, P.A.; SMITH, A.L. Age at primary infection with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in the chicken influences persistence of infection and subsequent immunity to re-challenge. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.100, p. 151-164, 2004.
 9. BEAUMONT, C.; PROTAIS, J.; PITEL, F., LEVEQUE, G. MALO, D.; LANTIER, F.; PLISSON PETIT, F.; COLIN, P.; PROTAIS, M.; Le ROY, P.; ELSEN, J.M.; LANTIER, I.; NEAU, A.; SALVAT, G.; VIGNAL, A. Effect of two candidate genes on the *Salmonella* carrier State in fowl. **Poultry Science**, n. 82, p. 721-726, 2003.
 10. BERTHELOT-HÉRAULT, F.; MOMPART, F.; Z. Y.; GMUNT, M.Z.; DUBRAY, G.; DUCHET-SUCHAUX, M. Antibody responses in the serum and gut of chickens lines differing in cecal carriage of *Salmonella enteritidis*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 96, p. 43-52, 2003.
 11. BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria Nacional da Defesa Agropecuária. Departamento Nacional de Defesa Animal. **Instrução Normativa** 007/99 de 17/05/1999. 1999. 17 p.

12. CENTER DISEASE CONTROL. 2001. Food borne infections: General information e technical information. Division of bacterial and mycotic. Diseases. Disponível em www.cdc.gov/neidod/dbmd/diseaseinf/foodborneinfectionsq.htm. Acesso em maio de 2002.
13. CHAMBERS, J. R.; BISAILLON, J. R.; LABBÉ, Y.; POPPE, C.; LANGFORD, C.F. *Salmonella* prevalence in crops of Ontario and Quebec broiler chickens at slaughter. **Poultry Science**, n. 77, p. 1497-1501, 1998.
14. CORRIER, D. E.; HARGIS, B.; HINTON, A. Jr.; LINDSEY, D.; CALDWELL, D.; MANNIG, J.; DELOACH, J. Effect of anaerobic cecal microflora and dietary lactose on colonization resistance of layer chickens to invasive *Salmonella enteritidis*. **Avian Diseases**, v.35, p. 357-343, 1991.
15. DEMATTÊ FILHO, L. C., MENDES, C. M. I. Viabilidade técnica e econômica na criação alternativa de frangos. In: Conferência **Apinco** 2001 de Ciências e Tecnologias Avícolas. **Anais...** v.2, p.254-266, 2001.
16. DESMIDT, M.; DUCALETTE, R.; HAESBROUCK, F. Pathogenesis of *Salmonella* Enteritidis phage types four after experimental infection of young chickens. **Veterinary Microbiology**, v.56, p.99-109, 1997.
17. DESMIDT, M.; DUCALETTE, R.; HAESBROUCK, F. Immunohistochemical observations in the ceca of chickens infected with *Salmonella* Enteritidis phage types four. **Poultry Science**, v.77, p.73-74.1998.
18. DHILLON, A. S.; ALISANTOSA, B. N; SHIVAPRASAD, H. L.; JACK, O.; SCHABERG, D.; BANDLI, D. Pathogenicity of *Salmonella* Enteritidis Phage Types 4, 8 and 23 in broiler chicks. **Avian Diseases**, n. 43, p.506-515, 1999.
19. DHILLON, A. S.; SHIVAPRASAD, H. L.; ALISANTOSA, B. N; JACK, O.; SCHABERG, D.; BANDLI, D.; JOHNSON, S. Pathogenicity of environmental origin Salmonellas in specific pathogen-free chicks. **Poultry Science**, v. 80, n.9, p. 11323-1138, 2001.
20. GAST R. K. Paratyphoid infection. In: CALNEK, B. W. **Diseases of poultry**. 10 ed. Ames: Iowa University Press, 1997, p. 97-121.
21. GEORGIA POULTRY LABORATORY. **Monitoring and detection of *Salmonella* in poultry and poultry environments**. Oakwood: Georgia Poultry Laboratory, 1997.293p. [Workshop]
22. GORHAM, S.L.; KADAVIL, K.; VAUGAHAN, E.; LAMBERT, H.; PERT, B.; ABEL, J. Gross and microscopic lesions in young chickens

- experimentally with *Salmonella enteritidis*. **Avian Diseases**, v.38, p.816-821, 1994.
23. HARGIS, B. M.; CALDWELL, D.J.; BREWER, R. L.; CORRIER, D.E.; DELOACH, J. R. Evaluation of the chicken crop as a source of *Salmonella* contamination of boiler carcasses. **Poultry Science**, v. 74, p. 1548 -1552, 1995.
 24. HENDERSON, S.C., BOUNOUS, D.I., LEE, M.D. Early events in the pathogenesis of avian salmonellosis. **Infection and Immunity**, v.67, n.7, p.3580-3586, 1999.
 25. HINTON, M.; PEARSON, G. R.; THRELFALL, E. J.; ROWE, B.; WOODWARD, M.; WRAY, C. Experimental *Salmonella enteritidis* infection in chicks. **The Veterinary Record**, n.124, p.233.1989.
 26. HINTON JR, M.; BUHR, R. J.; INGRAM, K. D. Physical, chemical and microbiological changes in the crop of broiler chickens subjected to incremental feed withdrawal. **Poultry Science**, v. 79, p. 212-218, 2000.
 27. 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.
 28. HOLT, P.S.; 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.
 29. HUMPREY, T.J.; BAS KERVILLE, A.; WHITEHEAD, A.; ROWE, B. ; HENLEY, A. Infection of laying hens with *Salmonella enteritidis* PT4 by conjunctival challenge. **The Veterinary Record**, v.131, p. 386-388, 1992.
 30. HUMPREY, T.J.; BAS KERVILLE, A.; CHART, H.; ROWE, B. ; WHITEHEAD, A. Influence of feeding patterns on the artificial infection of laying hens with *Salmonella enteritidis* phage type 4. **The Veterinary Record**, v.132, p.407-409, 1993.
 31. HUMPREY, T.J. Contamination of eggs and meat with *Salmonella enterica*, serovar Enteritidis in poultry. In: SAEED, A. M. **Salmonella enterica, serovar Enteritidis in humans and animals. Epidemiology, pathogenesis and control**, Ames: Iowa State University Press, 1999, p.183-192.
 32. ITO, N. M. K. Mecanismos gerais da defesa das aves: inflamação. In: CONFERÊNCIA APINCO 1990 DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS AVÍCOLAS, 1990 CAMPINAS **Anais...**, Campinas: FACTA, 1990p. 119-129, 1990.

33. KINGSLEY, R. A., BAUMLER, A. J. Host adaptation and the emergence of infectious diseases: the *Salmonella* paradigm. **Molecular Microbiology**, v. 36, n. 5, p.1006-1014, 2000.
34. KRAMER, J.; VISSCHER, A. H.; WAGENAAR, J. A.; BOONSTRABLOM, A. G.; JEURISSEN, S. H. M. Characterization of the innate and adaptive to *Salmonella enteritidis* PT1 infection in four broiler lines. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.79, n.3-4, p.219-233, 2001.
35. KRAMER, J.; VISSCHER, A. H.; WAGENAAR, J. A.; JEURISSEN, S. H. M. Entry and survival of *Salmonella enteritidis* PT4 in chicken macrophage and lymphocyte cell lines. **Veterinary Microbiology**, v.91, p.147-155, 2003.
36. LUNA, L.G. Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology. 3ed. New York:: McGraw-Hill, 1968. 258 p.
37. NOY, Y.; SKLAN, D. Yolk utilization in the newly hatched. **British Poultry Science**, v.39, p 446-451.1998.
38. NOY, Y.; SKLAN, D. Yolk utilization in the newly hatched. **British Poultry Science**, v.39, p 446-451, 1999.
39. NOY, Y.; UNI, Z.; SKLAN, D. Routes of yolk utilization in the newly hatched chick. **Poultry Science**, v.75, p. 5-13, 1996.
40. NUNES, I., A. *Salmonella* Enteritidis - fagotipos, susceptibilidade a drogas antimicrobianas e epidemiologia molecular baseada na sonda complementar ao rRNA. São Paulo, 1999. 119p. Tese (Doutorado). Instituto de Ciências biomédicas da Universidade de São Paulo.
41. O'BRIEN, J. D. P. *Salmonella enteritidis* infection in broiler chickens. **The Veterinary Record**, n.122, p. 214, 1988.
42. QURESHI, M.A. Role of macrophages in avian health and disease. **Poultry Science**, v. 77, p 978-982, 1998.
43. QURESHI, M.A., HEGGEN, C. L.; HUSSAIN, I. Avian macrophage: effector functions in health and disease. **Development. Comp. Immunology**, v. 24, p.103-119, 2000.
44. RAMIREZ, G. A.; SARLIN, L. L.; CALDWELL, D. J.; JR YEZAK, C. R.; HUME, M. E.; CORRIER, D. E.; DELOACH, J. R.; HARGIS, B. M. Effect of feed withdrawal on the incidence of *Salmonella* in the crop and ceca of market age broiler chickens. **Poultry Science**, v. 77, p. 654-656, 1997.
45. REZENDE, C. S. M. Ocorrência de *Salmonella* em lotes de frangos de corte de agroindústrias goianas: identificação bacteriológica e perfil de

- sensibilidade a antimicrobianos. Goiânia, 2002. 73p. Dissertação (Mestrado). Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás.
46. ROCHA, P. T.; MESQUITA, A. J.; ANDRADE, M. A.; LOULY, P. R.; NASCIMENTO, M. N. *Salmonella* spp. Em forros de caixa de transporte e órgãos de pintos de um dia. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária**, v. 55, n. 6, p 672-676, 2003.
 47. RODRIGUES, D. P. Ecologia e prevalência de *Salmonella* spp. em aves e materiais avícolas. In: CONFERÊNCIA APINCO 2005 DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS AVÍCOLAS, 2005. **Anais...** Campinas: FACTA., 2005 v.2, p.223-228.
 48. SAMPAIO, I. B. M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. Belo Horizonte: Fundação de ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 1998. 221p.
 49. SANTOS, L. R.; NASCIMENTO, W. 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 de São Paulo**, v. 45, n. 1, p. 1-4. 2003.
 50. SAS ®. 1998. **User's Guide: Statistics**, Version 8th. SAS Institute Inc., Cary, NC.
 51. SOLANO, C.; SEMMA, B.; ALVAREZ, M.; HUMPHREY, T. J.; THORNS, C. J.; GAMAZO, C. Discrimination of strains of *Salmonella enteritidis* with differing levels of virulence by an in vitro glass adherence test. **Journal of Clinical Microbiology**, v.36, n. 3, p.674-78, 1998.
 52. SUZUKI, S. Pathogenicity of *Salmonella enteritidis* in poultry. **International Journal of Food Microbiology**. n.21, p. 89-105, 1994.
 53. UNI, Z.; GANOT, S.; SKLAND, D. Posthatch development of mucosal function in the broiler small intestine. **Poultry Science**. v.77, p.75-82, 1998.
 54. VAN IMMERSEEL, F.; De BUCK, J.; DE SMET, I.; MAST, J.; HAESERBROUCK, F.; DUCATELLE, R. Dynamics of immune cell infiltration in the caecal lamina propria of chickens after neonatal infection with a *Salmonella* Enteritidis strain. **Dev. Comp. Immunol.**, v. 26, p. 355-364, 2002.
 55. WIGLEY, P. Genetic resistance to *Salmonella* infection in domestic animal. **Research in Veterinary Science**, v. 76, p. 165-169, 2004.

**CAPÍTULO 5. ASPECTOS CLÍNICOS E ANATOMOHISTOPATOLÓGICOS
DE PINTOS DE CORTE, ROSS E ISA LABEL, ORIUNDOS DE OVOS
INOCULADOS EXPERIMENTALMENTE COM *Salmonella* Enteritidis
FAGOTIPO 4**

RESUMO: Com o objetivo de avaliar a capacidade invasiva e a persistência da *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis fagotipo 4 de origem aviária, em linhagens de frango de corte, foram conduzidos dois experimentos. O experimento 1 foi realizado com a linhagem Ross (crescimento rápido) e o experimento 2 com a linhagem ISA Label (crescimento lento - “pescoço pelado”). Nos dois experimentos, $1,5 \times 10^2$ UFC/_{0,1mL} de *Salmonella* Enteritidis fagotipo 4 foram inoculadas por ovo através da casca e da cavidade alantóide no momento da incubação para averiguar a excreção fecal do patógeno até 35 dias de vida das aves, os sinais clínicos, as lesões macro e microscópicas e a mortalidade até a terceira semana de vida. A *Salmonella* Enteritidis invadiu e colonizou o trato gastrointestinal das duas linhagens, mas a infecção declinou com a idade, sendo mais persistente na linhagem Ross. O patógeno foi excretado de uma única ave ISA Label até 22 dias de vida e em quatro aves da linhagem Ross até 35 dias. Os sinais clínicos gerais aliados à disfunção intestinal foram mais pronunciados nas aves Ross. A mortalidade observada foi de 25% (15/60) na linhagem Ross, e de apenas 1,66% (1/60) nas aves de crescimento lento durante as três semanas. Onfalite, enterite, pericardite e perihepatite constituíram as principais lesões macroscópicas da linhagem de crescimento rápido. No exame histopatológico observou-se processo inflamatório com infiltrados de células mononucleares com predominância de macrófagos e linfócitos no coração, duodeno, jejuno, íleo, ceco e fígado. Pode-se inferir que *Salmonella* Enteritidis colonizou o trato gastrointestinal, invadiu os

órgãos de ambas as linhagens, porém as aves ISA Label foram mais resistentes à infecção do que as aves da linhagem Ross.

Palavras-Chaves: colonização intestinal, infecção, invasão, órgãos, resistência genética,

CLINICAL AND ANATOMOHISTOPATOLOGICAL ASPECTS OF TWO BROILER ROSS E ISA LABEL ORIGINATED FROM EXPERIMENTALLY INOCULATED EGGS WITH *SALMONELLA* ENTERITIDIS FAGOTIPO 4

ABSTRACT: In order to evaluate the invasive capacity and persistence of *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis phagotipe 4 of avian origin, in two broiler lines, two experiments were carried out. The experiment 1 was done with Ross line (fast growing rate) and experiment 2 was done with ISA Label (slow growing rate – “naked neck”). In two experiments the same 1.5×10^2 UFC/0,1mL de *Salmonella* Enteritidis phagotipe 4 was inoculated in ovo through the eggshell or allantoic cavity at the incubation to investigate the fecal excretion of pathogen until 35 days of age, the clinical signs, the macro and microscopical lesions and mortality rate until three weeks of age. The *Salmonella* Enteritidis invaded and colonized the gastrointestinal tract of the two lines tested, but the infection reduced with age, and was more persistent in Ross broilers. The pathogen was excreted from just one chick of ISA Label at 22 days of age and four Ross chicks until 35 days of age. The general clinical signs allied to intestinal dysfunction were more pronounced in Ross broilers. The mortality observed was 25% (15/60) in Ross and just 1.66% (1/60) ISA Label broilers during three weeks. Onphalitis, enteritis, pericarditis, perihepatitis constituted the main macroscopic lesions in Ross. At histological exam, inflammatory process observed with infiltrates of mononuclear cells with predominance of macrophage and lymphocytes in heart, duodenum, jejunum, ileum, ceca and liver. It is possible to conclude the gastrointestinal tract, invaded organs of both genetic lines, but ISA Label was resistant to infection compared to Ross lines.

Keywords: chickens, colonization, infection, invasion, organs, genetic resistance.

INTRODUÇÃO

Bactérias do gênero *Salmonella* são patógenos facultativos, intracelulares, capazes de infectar uma grande variedade de animais. A ave é um dos mais importantes reservatórios que pode introduzir a *Salmonella* na cadeia alimentar do homem, sendo o fagotipo 4 (PT4) o mais envolvido nos casos das salmoneloses humanas nos últimos anos (GAST, 1997, FERNÁNDEZ et al., 2001).

A maioria dos sorovares existentes pode colonizar o intestino sem causar doença, entretanto *Salmonella* Typhimurium e *Salmonella* Enteritidis são capazes de produzir doença sob certas condições em aves e infecções alimentares (GAST, 1997, BARROW, 1999).

A habilidade dos sorovares de *Salmonella* em causar infecções aparentes ou mesmo determinar um estado de portador está associada à imunidade inata do hospedeiro e ao repertório dos genes de virulência da bactéria (BARROW, 1994; SIEBERS & FINLAY, 1996; KINGSLEY & BAUMLER, 2000; WALLIS & GALYOV, 2000). De acordo com GAST (1997), a possibilidade de estabelecer uma infecção pode envolver uma sutil inter-relação entre a suscetibilidade do hospedeiro, a amostra e a dose infectante.

Uma das características mais importantes da *Salmonella* Enteritidis é sua habilidade de causar doença em aves ou determinar somente infecção (morbidade), sem sinais clínicos. Pode se instalar no trato gastrintestinal (TGI), colonizar o intestino e se disseminar para outros animais, no ambiente e ainda ser incorporada aos alimentos e se constituir em problema de saúde pública (GAST & BENSON, 1995; HOFER et al.1997).

As perdas por *Salmonella* Enteritidis podem ter efeitos diretos na produção de aves ou indiretos pelo impacto em saúde pública (BARROW, 2000). LISTER (1988) observou mortalidade de até 20% em infecções naturais, como resultado de transmissão vertical nas duas primeiras semanas de vida e retardo no crescimento dos pintos de corte infectados por *Salmonella* Enteritidis. FERREIRA et al. (1990) detectaram em infecções naturais, alta mortalidade e em experimentais, pela inoculação oral, 0% de mortalidade. De acordo com GAST (1994), a mortalidade ocorre no período final da incubação, na caixa de transporte. Ocorre ainda quadro de onfalite, pintos com mortalidade inicial aumentada com desenvolvimento desigual do lote, retardo no crescimento e diarreia.

GORHAM et al. (1994) descreveram as principais lesões e observaram uma mortalidade de 21% em aves *Specific Pathogen Free* (SPF) com um dia de vida quando inoculadas experimentalmente com *Salmonella* Enteritidis fagotipo 13a, enquanto aves inoculadas com sete dias de vida apresentaram mortalidade de 7%. DESMIDT et al. (1997) inocularam

Salmonella Enteritidis em aves SPF de linhagem de postura com um dia de vida e observaram sinais clínicos, alterações de órgãos e mortalidade nas duas primeiras semanas de vida.

DHILLON et al. (1999), estudando a patogenicidade de vários fagotipos de *Salmonella* Enteritidis, observaram alta mortalidade pelo PT4, embora algumas aves se apresentassem aparentemente normais, mas com menor peso. Destaca-se que segundo BARROW (2000) e BERCHIERI JUNIOR (2000), a enfermidade é mais comum em aves jovens, entretanto, podem viver em equilíbrio no organismo.

As resistências de linhagens à *Salmonella* têm sido relativamente pouco estudadas, mas são apontadas como uma forma potencial de controle do patógeno (WIGLEY, 2004). As diferenças de suscetibilidade de aves à *Salmonella* foram descritas por HUNT (1941), citado por KRAMER et al. (2001), também por BUMSTEAD & BARROW (1993) e GAST & BENSON (1995). Uma ave selecionada geneticamente para maior desempenho zootécnico pode ser um indivíduo que responda pobremente a desafios do sistema imune (QURESHI, 2001). A suscetibilidade à infecção varia entre e dentro das linhagens (BERTHELOT-HERAUT et al. 2003) e tem sido observada associação genética de resistência a *Salmonella* em diferentes espécies aviárias.

Salmonella Enteritidis representa um perigo para a exploração avícola, tanto em produções convencionais como alternativas, tendo em vista a possibilidade de causar episódios esporádicos ou surtos de infecção alimentar em indivíduos suscetíveis, constituindo problema para saúde pública.

Produtores têm buscado criar aves sem antibióticos promotores de crescimento, visando obter produtos em acordo com o disposto na instrução normativa do Ministério da Agricultura e Abastecimento (MAA) Divisões de Operações Industriais/ Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal (DOI/DIPOA) nº 007/99 (BRASIL, 1999).

Pelo exposto, o presente trabalho teve como objetivos investigar, através da excreção fecal, dos sinais clínicos e dos achados macroscópicos e microscópicos os efeitos da *Salmonella* Enteritidis PT4 de origem aviária, inoculada "in ovo", em linhagens de corte, de crescimento lento - ISA Label - e

de crescimento rápido - Ross - alimentadas com ração vegetariana sem antibióticos promotores de crescimento.

MATERIAL E MÉTODOS

Locais

Foram conduzidos dois experimentos no setor de Doenças de Aves, nos Laboratórios de Bacteriologia e de Histopatologia do Departamento de Medicina Veterinária e no Isolamento do Hospital Veterinário da Escola de Veterinária (EV) da Universidade Federal de Goiás (UFG)

Tratamentos e delineamento

Foram utilizados 240 pintos de corte, sendo 120 de crescimento rápido, linhagem Ross, (Experimento 1) e 120 de crescimento lento ISA Label (Experimento 2). As aves foram distribuídas de acordo com os seguintes tratamentos: A₁- constituído por 30 pintos oriundos de ovos inoculados na casca com 0,1mL de suspensão bacteriana contendo $1,5 \times 10^2$ unidades formadoras de colônias -UFC- de *Salmonella* Enteritidis PT4; A₂ - grupo controle, constituído de 30 aves oriundas de ovos inoculados com solução salina esterilizada tamponada a 0,85% (placebo); B₁- constituído de 30 pintos inoculados na cavidade alantóide com 0,1mL de suspensão bacteriana contendo $1,5 \times 10^2$ UFC de *Salmonella* Enteritidis PT4; B₂ -grupo controle, também constituído de 30 aves oriundas de ovos inoculados da mesma maneira que o B₁ com o placebo.

Os tratamentos A₁, A₂, B₁, B₂, de cada experimento, foram compostos de cinco parcelas de seis pintos e mantidos nas mesmas condições em diferentes locais de isolamentos. As aves foram alojadas em baterias de cinco andares de aço galvanizado, aquecidas com uma lâmpada incandescente de 60W, que foi mantido até 21 dias de idade. As baterias foram providas de comedouros e bebedouros tipo linear, e bandeja para a retirada de excretas. Água e ração foram disponibilizados *ad libitum*, sendo a ração sem antibióticos promotores de crescimento, elaborada atendendo a instrução normativa do MAA DOI /DIPOA nº 007/99 (BRASIL, 1999).

Duas vezes ao dia, as aves eram examinadas, sendo os sinais clínicos anotados. Aquelas que morriam eram necropsiadas e as lesões anotadas em fichas próprias.

O coração, o fígado, o papo assim como fragmentos do duodeno, jejuno, íleo e ceco das aves mortas foram removidos e cada peça anatômica foi colocada em frascos identificados, que continham formol neutro tamponado a 10%. Os fragmentos do coração, fígado e vesícula biliar, papo e conteúdo cecal foram destinados para exames bacteriológicos. Dos pintos com um (15 horas de nascidos), oito, 22 e 35 dias de vida, coletou-se individualmente mecônio por compressão da região dorso-ventral da cloaca ou por *swab* cloacal. No momento da primeira coleta, cada ave recebeu um número de identificação que foi colocado no pé na região tarso-metatarsiana.

Exame histopatológico

Coletou-se 112 amostras que foram processadas de acordo com a metodologia convencional de LUNA (1968) adotada pelo Laboratório de Patologia da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás.

Uma vez fixados por 24h em solução de formalina neutra tamponada a 10% os fragmentos foram recortados, acondicionados em cassetes e identificados. Em seguida foram lavados em água de torneira para retirada de excessos de pigmentos de formol e posteriormente desidratados em álcool etílico em série crescente, desde 70% até álcool absoluto. Posteriormente procederam-se a clarificação com xilol e impregnação em parafina histológica, com ponto de fusão a 56^o C. Os fragmentos de 5 mm foram incluídos em blocos de parafinas histológicas, seccionados a cinco micrômetros em micrótomo rotativo, marca American-Optical, modelo Spencer-820, utilizando-se navalhas descartáveis, laminados, e coradas pelo método de Hematoxilina - Eosina (HE), sendo as lâminas lidas em microscópio óptico de campo claro, marca Carl Zeiss, modelo JENAVAL.

As lesões foram classificadas de acordo com a gravidade, em acentuadas, moderadas e discretas; quanto à distribuição, em focal, multifocal e difusa; e quanto ao local, em serosa, submucosa e mucosa.

Pesquisa *Salmonella*

A pesquisa da *Salmonella* Enteritidis foi realizada no coração, no fígado, no conteúdo cecal, no ingluvío e no saco vitelínico de cada ave em acordo com a metodologia descrita em GEORGIA POULTRY LABORATORY (1997), com algumas modificações. Imediatamente após colheitas das amostras, realizadas de forma asséptica, um grama de cada peça anatômica foi pesado e homogeneizado em 9mL de caldo selenito cistina (CS). Com auxílio de uma alça níquel-cromo, alíquotas do CS foram plaqueadas por esgotamento em estrias em ágar verde brilhante, ágar Hecktoen e ágar MacConkey e incubados por 24h a 37 °C. Caso não ocorresse crescimento de unidades formadoras de colônias sugestivas de *Salmonella* nos meios seletivos utilizados, alíquotas do CS de 24h de incubação eram transferidas com o auxílio de alça níquel - cromo para os mesmos meios, que eram incubados pelo mesmo tempo e a mesma temperatura.

Pescaram-se nas placas em que houve crescimento, de três a cinco unidades formadoras de colônias com características morfológicas de *Salmonella*, que foram transferidas para tubos contendo o ágar tríplice açúcar ferro (TSI), os quais foram incubados a 37 °C por 18-24h.

Submeteram-se os isolados no TSI com crescimento sugestivo de *Salmonella* aos testes da produção de urease e do indol, vermelho de metila, da motilidade e H₂S (SIM), malonato e lisina descarboxilase. Aqueles isolados que apresentaram reações bioquímicas compatíveis com *Salmonella* foram submetidos ao teste sorológico com antissoros polivalentes somáticos. Amostras positivas à sorologia foram remetidas à Fundação Osvaldo Cruz (FIOCRUZ) em meio ágar nutriente para confirmação do sorovar inoculado e recuperado.

Análises estatísticas

Empregou-se o teste não paramétrico do qui-quadrado (X^2) para avaliar a ocorrência de diferença significativa entre a excreção fecal, a mortalidade das linhagens e entre os tratamentos (SAMPAIO,1998).

RESULTADOS e DISCUSSÃO

Os *swabs* cloacais dos pintos indicaram colonização intestinal da *Salmonella* Enteritidis nas duas linhagens estudadas, tanto pela inoculação experimental da casca quanto da cavidade alantóide (Quadro 1).

Nos ovos inoculados na casca pelas mãos contaminadas, observou-se 3/30 (10%) de positividade nos pintos infectados no dia um; 4/28 (14,28%) no dia 8; 0/24 (0%) no dia 22 (0%); 0/24(0%) no dia 35 para a linhagem de crescimento lento - ISA Label, enquanto para a linhagem de crescimento rápido os resultados foram: 15/30 (50%), 19/26 (73,07%); 5/20 (25%); 3/20 (15%) de excreção fecal positiva para as mesmas idades respectivamente.

Para os ovos inoculados através da cavidade alantóide, simulando desta forma a transmissão vertical, as frequências observadas para pintos infectados foram 8/30 (26,66%); 4/27 (14,81%); 1/23 (4,35%); 0/23 (0%) para linhagem ISA Label e 23/30 (76,76%); 15/25 (60%); 3/13 (3,08%); 2/13 (15,38%) para a linhagem Ross para o primeiro, oitavo, 22^o e 35^o dias de idade, respectivamente.

Da análise dos resultados, pode-se inferir que tanto a via de inoculação quanto a linhagem influenciaram ($P < 0,05$) na excreção da *Salmonella* Enteritidis. A via de inoculação na casca incrementou a percentagem de aves infectadas até o oitavo dia, sugerindo que as aves que não foram infectadas na incubadora infectaram-se pelo contato indireto pelas excretas contaminadas nas baterias. Estes achados são respaldados por BAILEY et al. (1994), que registraram contaminação cruzada durante o crescimento dos frangos no período de um a sete dias de vida.

Notou-se ainda que ocorreu diminuição da taxa de recuperação do patógeno no decorrer do experimento, a partir da segunda semana na inoculação pela casca e partir da primeira semana em ambas formas de inoculação e nas duas linhagens (Quadro 1). Resultados semelhantes foram observados por BARROW (1991), quando inoculou pintos de corte recém eclodidos com a *Salmonella* Enteritidis PT4 e observou que excreção diminuiu com o tempo e persistiu até oito semanas.

As aves ISA Label infectadas pela casca excretaram a bactéria somente até a segunda semana de vida. Em duas aves que nasceram infectadas o agente foi eliminado a partir da primeira semana e a *Salmonella* Enteritidis não foi reisolada até os 35 dias de vida. Entretanto, três novos indivíduos apresentaram resultados positivos só na segunda colheita e a bactéria não foi mais recuperada do conteúdo fecal até o final do experimento. Os pintos de crescimento lento oriundos de ovos inoculados na cavidade alantóide não se infectaram após o nascimento e o patógeno foi recuperado em apenas uma ave até os 22 dias. Os animais que se originaram da inoculação na casca mostraram uma menor frequência ($p > 0,05$) de excreção de *Salmonella* Enteritidis do que os oriundos através da cavidade alantóide (Quadro 1 e Figura 1).

As aves que compuseram as linhagens de crescimento lento e rápido apresentaram excreção intermitente da *Salmonella* Enteritidis de 0/60 (0%) e 5/60 (8,33%), respectivamente. Em 39/60 (65%) das aves ISA Label e 12/60 (20%) da linhagem Ross a bactéria não foi recuperada em nenhuma amostra cloacal colhida e em 0/60 (0%) e 3/60 (5%) o inóculo foi reisolado em todo período do experimento.

Como o número de aves infectadas nas duas linhagens estudadas declinou com a idade (Quadro 1 e Figura 1), pode-se deduzir que o estabelecimento da microbiota intestinal nas primeiras semanas de vida, assim como o desenvolvimento do sistema imune, tenham contribuído com este resultado, o que está em acordo com CORRIER et al. (1991). Segundo DESMIDT et al. (1998) e BEAL et al. (2004), o mecanismo de resistência idade-dependente, compreendido como imunidade idade-dependente, provavelmente pode ser correlacionado ao desenvolvimento do sistema imune e a produção de anticorpos locais do intestino. BERTHELOT-HÉRAULT et al. (2003) observaram que a colonização do ceco foi diferente em quatro linhagens estudadas e atribuíram também ao envolvimento das respostas imunes sistêmicas e locais das aves.

QUADRO 01 –Excreção de *Salmonella* Enteritidis PT4 em pintos das linhagens ISA Label e Ross com um, oito, 22 e 35 dias de idade provenientes de ovos inoculados experimentalmente.

Ave	ISA Label								Ross							
	Trat A ₁				Trat B ₁				Trat A ₁				Trat B ₁			
	1	8	22	35	1	8	22	35	1	8	22	35	1	8	22	35
1	+	-	-	-	+	M			+	M			+	M		
2	+	-	-	-	+	+	+	-	+	M			+	+	+	+
3	+	+	R		+	+	R		+	R			+	M		
4	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	M		
5	-	-	-	-	+	+	R		+	+	+	-	+	R		
6	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	R		
7	-	-	R		+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+
8	-	-	-	-	+	R			+	+	M		+	+	M	
9	-	-	-	-	-	R			+	+	M		+	+	M	
10	-	-	R		-	-	-	-	+	+	R		+	+	M	
11	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	M	
12	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	M	
13	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-
14	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+
15	-	+	R		-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	M	
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R			+	+	M	
17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	M	
18	-	R			-	-	-	-	-	+	R		+	+	R	
19	-	R			-	-	-	-	-	+	R		+	+	R	
20	-	-	-	-	-	-	R		-	+	-	-	+	-	+	+
21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-
22	-	-	-	-	-	-	R		-	+	-	-	+	-	-	-
23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	R	
24	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	
26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	R		-	-	-	-
27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Legenda: (A) inoculado na casca, (B) inoculado na cavidade alantóide, (-) resultado bacteriológico negativo; (+) resultado bacteriológico positivo; (R) aves retiradas de acordo com o delineamento; (M) aves que morreram durante o experimento.

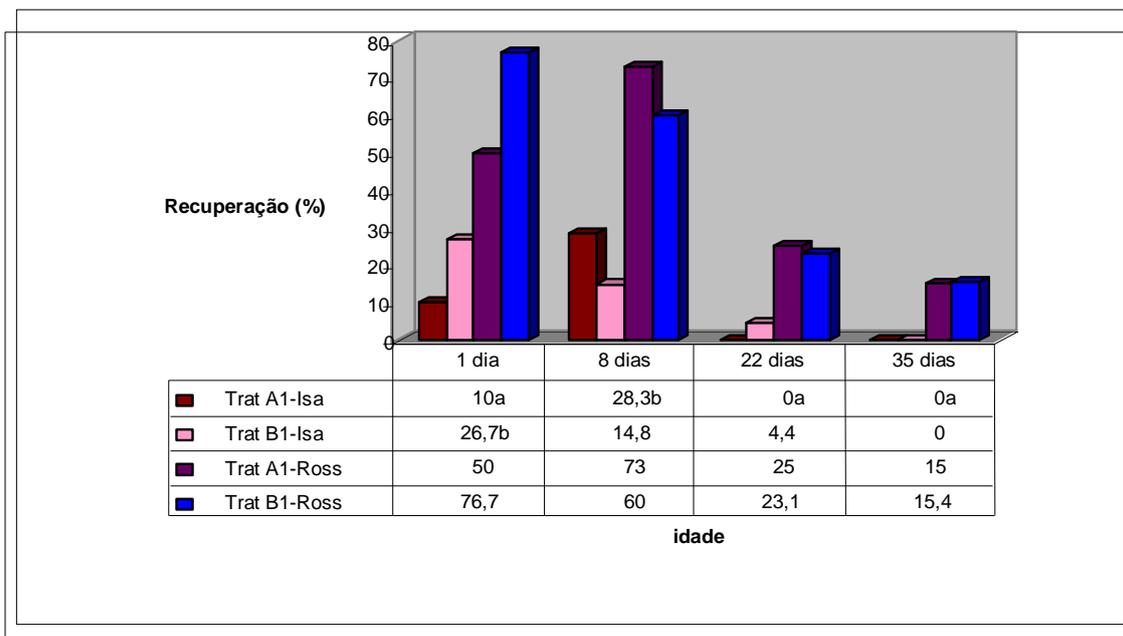


FIGURA 1- Percentagem de aves com excreção positiva de *Salmonella* Enteritidis

Verifica-se na Figura 1 que a linhagem ISA label apresentou menor índice de infecção e menor tempo de permanência da bactéria no trato gastrointestinal, sendo hábil em eliminar a bactéria de seu organismo. Esta afirmação encontra respaldo em BARROW (1994) e KINGSLEY & BAUMLER (2000), que relataram a habilidade dos sorovares de *Salmonella* causarem infecções, ou mesmo determinar um estado de portador, pode estar correlacionada com a imunidade inata do hospedeiro e ao repertório genético presente em cada indivíduo da população.

O *swab* cloacal como método de monitoramento da excreção de *Salmonella* apresenta limitações, porque este patógeno tem habilidade de ser excretado de forma intermitente e pode ser eliminado em pequenas quantidades pelas fezes, o que dificulta sua detecção. Entretanto, não deve ser descartado como método de controle, porque apresenta as vantagens de ser de fácil execução e de baixo custo. Em função destas vantagens, o método foi adotado neste estudo para avaliar e comparar a capacidade das linhagens de crescimento lento e rápido, alimentadas sem antibióticos promotores de crescimento, de eliminar o patógeno do organismo.

A adoção deste método pode viabilizar a avaliação dos procedimentos de controle utilizados em criações avícolas com sérios

problemas sanitários de *Salmonella* Enteritidis, antes que as aves sejam encaminhadas para o abate. Desta forma, pode-se evitar ou reduzir a introdução da bactéria na linha de processamento, as possíveis contaminações cruzadas e a participação do agente na cadeia alimentar do homem. Cabe ressaltar que níveis de infecção menores que 5% podem contaminar os frangos durante o transporte e as carcaças no decorrer do processamento e determinar níveis elevados de contaminação do produto final, acima de 50% (BARROW, 2000).

TABELA 1- Frequência da mortalidade atribuída a *Salmonella* Enteritidis em pintos oriundos da exposição experimental na casca e na cavidade alantóide de duas linhagens de frango de corte ate 21 dias de vida.

Idade	Linhagens				Total mortalidade	
	ISA Label		Ross		Linhagens	
Semanas	Tratamento				ISA Label	Ross
	A ₁	B ₂	A ₁	B ₂	%(n)	%
	%(n)	%(n)	%(n)	%(n)		
Primeira	0(0/30)a	3,33(1/30)a*	6,66(2/30)b	10,00(3/30)b	1,66(1/60)a	8,33(5/60)b
Segunda	0(0/28)a	0(0/27)a	7,70(2/26)b	20,00(5/25)b	0(0/55)a	13,72(7/51)t
Terceira	0(0/26)a	0(0/25)a	0(0/24)a	17,65(3/17)b	0(0/51)a	7,31(3/41)b
Acumulada	0(0/30)	3,33(1/30)	13,33(4/30)	36,66(11/30)	1,66(1/60)a	25,0(15/60)b

* letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas a 0,05%

A₁ =pintos oriundos de ovos inoculados com SE na casca, A₂ =controle do A₁; B₁ =pintos oriundos da inoculação com SE na cavidade alantóide; B₂ = controle do B₁

A taxa de mortalidade entre as linhagens ISA Label e Ross, durante os 21 dias de vida, também apresentou diferença (P<0,05) (Tabela 1). Enquanto a linhagem ISA Label apresentou mortalidade de 0% quando inoculada na casca e de 3,33% quando inoculada na cavidade alantóide e mortalidade acumulada de 1,67%; a linhagem Ross apresentou 13,33% quando inoculada na casca e 36,66% na cavidade alantóide, com mortalidade acumulada de 25%. O'BRIEN (1988), GAST & BEARD (1989) e CORRIER et al. (1991) citaram que em inoculações experimentais por *Salmonella* Enteritidis, em aves jovens foi observada maior mortalidade na primeira semana de vida. Já BARROW (1991), quando inoculou diretamente no Inglúvio diferentes fagotipos de *Salmonella* Enteritidis, com 24h após o nascimento, observou que o PT4 determinou mortalidade de 96% em pintos de corte e 23% em de postura. GAST & BENSON (1995) inocularam aves SPF, de corte e de postura,

com um dia de vida com o PT4 de diferentes fontes e observaram índices de mortalidade de 5 a 28,8% em corte, e 11,3 a 68,8% em postura, respectivamente. DESMIDT et al. (1997), estudando a patogenicidade da *Salmonella* Enteritidis, detectaram 8% de mortalidade para aves SPF de postura inoculadas diretamente no Inglúvio com um dia de vida.

DHILLON et al. (1999), inoculando o Inglúvio de aves da linhagem Hubbard com um dia de vida, verificaram mortalidade de 16,67%. Por sua vez, FERNÁNDEZ et al. (2001) verificaram mortalidade maior de 23% em frangos de corte quando utilizaram a mesma via de inoculação e idade. Já DHILLON et al. (2001) verificaram uma taxa de mortalidade de 7,6% quando inocularam o agente de origem aviária em aves de postura SPF no Inglúvio. Em contraponto, a esta informação, quando o mesmo sorovar e fagotipo utilizados foram de fontes diferentes não determinaram mortalidade nos grupos inoculados. Todavia, HINTON et al. (1989) inocularam pintos de um dia através de alimentos com a *Salmonella* Enteritidis e não detectaram mortalidade, sinal clínico ou lesões. Entretanto, o patógeno foi recuperado do conteúdo cecal e do fígado, indicando que ocorreu a colonização do intestino e afirmando a sua capacidade invasiva.

Com base nos resultados apresentados na Tabela 1, pode-se inferir que os pintos oriundos da inoculação *in ovo* se infectaram. A mortalidade na linhagem ISA Label só ocorreu na primeira semana de vida em 1,66% (1/60) das aves, inferior ao valor de 25% (15/60) observado na linhagem Ross, registrada durante as três semanas dos experimentos. Isto sugere que a resistência natural da linhagem ISA Label contribuiu para a menor mortalidade das aves de crescimento lento. BERTHELOT-HERAUT et al. (2003) informaram que a taxa de mortalidade pode ser utilizada como um dos critérios de determinação de suscetibilidade às várias doenças sistêmicas. No presente estudo, a diferença dos índices de mortalidade entre as duas linhagens encontra respaldo na pesquisa de GAST & BENSON (1995), embora esses autores tenham trabalhado com linhagens diferentes (postura e corte) e utilizado outra via de exposição.

Mesmo não quantificando, notou-se visualmente que as aves não tiveram um desenvolvimento corporal semelhante. Os grupos inoculados se

apresentaram com desenvolvimento desigual e os sinais clínicos registrados podem ser visualizados na Tabela 2. Nota-se que os sinais clínicos gerais foram compatíveis com um quadro septicêmico. Mas FERREIRA et al. (1990), em infecções naturais, identificaram sinais similares e também diferentes. Dentre os similares destacaram-se os distúrbios entéricos e dentre os diferentes torcicolos.

Já BARROW (1991), DESMIDT et al. (1997), BARROW (2000) e FERNÁNDEZ et al. (2001) verificaram sinais semelhantes aos descritos na Tabela 2, em aves inoculadas experimentalmente, assim como os registrados por O'BRIEN (1988) em infecções naturais. Também GAST (1994) relatou que embriões infectados podem dar origem a aves com aspecto ruim e com comprometimento do desenvolvimento do lote. Todavia, HINTON et al. (1989) não observaram nenhum sinal clínico em aves de corte recebendo alimentos contaminados.

TABELA 2 - Sinais clínicos observados em pintos de duas linhagens de frango de corte originados de ovos experimentalmente inoculados na casca e cavidade alantóide.

Sinais Clínicos	Linhagens				Total	
	ISA Label		Ross			
	Tratamento				Linhagens	
	A ₁	B ₂	A ₁	B ₂	ISA Label	Ross
Aves alojadas	30	30	30	30	60	60
Mortas sem sinais	-	-	-	3	-	3
Asas caídas/penas arrepiadas	-	1	2	8	1	
Apatia	-	1	1	10	1	
Sonolência	-	1	1	10	1	11
Cloaca suja	2	5	14	22	7	36
Tamponamento cloaca	-	-	12	12	-	16
Incoordenação	-	-	1	2	-	3

-- ausência dos sinais

Aliados aos sinais gerais, foram observados distúrbios do trato gastrointestinal (Figura 2). Em alguns animais que manifestaram somente estes distúrbios, verificou-se que no decorrer do experimento estes desapareceram, podendo-se afirmar que se recuperaram clinicamente. A cloaca suja e o seu tamponamento foram os sinais clínicos mais freqüentes nas duas linhagens, sendo maior o número de pintos acometidos na linhagem Ross. Estes dados

confirmam parcialmente as afirmações de BARROW (2000) de que não existe clareza na ocorrência de enterite em aves infectadas pela *Salmonella* Enteritidis, mas o acúmulo de excretas na região pericloacal caracteriza certa disfunção intestinal quando a via de inoculação ocorre por via digestiva.

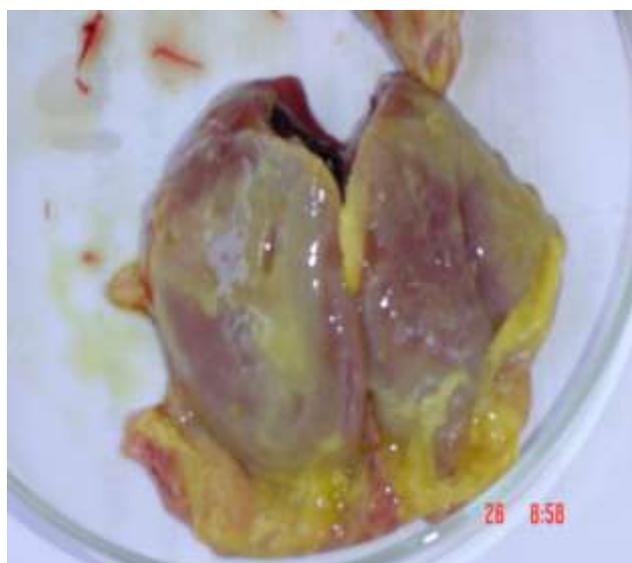


A

B



C



D

E

FIGURA 2- Sinais de distúrbios gastrintestinais (A); Sinais gerais (B); Onfalite (C); pericardite (D); Perihepatite (E)

Verifica-se também, pelo número de aves com sinais clínicos evidentes (Tabela 2), que o repertório genético da linhagem ISA Label determinou uma menor gravidade da infecção na linhagem de crescimento lento.

Imediatamente após a identificação de aves mortas, realizou-se o exame necroscópico e as alterações macroscópicas foram anotadas em fichas individuais sendo que os resultados estão representados nas Figuras 2 e 3. Observou-se que onfalite, peritonite, pericardite, perihepatite e lesões de intestino (tiflite) foram as alterações mais registradas.

Na linhagem ISA Label os achados podem ser considerados escassos e discretos. À necropsia, detectaram-se alterações no saco vitelínico (aumento de volume, conteúdo de consistência endurecida e aderência ao abdômen), além de exsudato viscoso de cor amarelada no ceco e duodeno e congestão hepática. Constatou-se, também, que a linhagem Ross mostrou alterações mais pronunciadas no saco vitelínico, ceco e fígado, além do aparecimento de lesões no coração, peritônio e articulação tibio-társica. O órgão mais afetado foi o saco vitelínico, onde a onfalite e a persistência do saco da gema foram os achados anatomopatológicos predominantes na linhagem Ross em 25% (15/60), que foram seguidos pelas lesões de ceco em 16,66% (10/60), pericardite em 11,66% (7/60) e hepatite em 10% (6/60).

Estudos realizados por BARROW (1991), GORHAM et al. (1991,1994), DESMIDT et al. (1997), DHILLON et al. (1999, 2001) mostraram achados similares variando o grau e o nível de comprometimento dos órgãos. Acrescenta-se que GAST (1994) observou embriões infectados com quadros de onfalite. FERREIRA et al. (1990) igualmente observaram pericardite e perihepatite em pintos infectados naturalmente, mas detectaram também a ocorrência de esplenomegalia, aerossaculite e nefrite. Tais diferenças podem ser decorrentes do fagotipo envolvido no processo e também ao delineamento experimental. Por outro lado, HINTON et al. (1989) não registraram lesões, embora tenham demonstrado a capacidade invasiva da *Salmonella* Enteritidis em aves jovens, tanto no intestino quanto em outros órgãos.

A possibilidade de estabelecer uma infecção pode envolver uma sutil inter-relação entre a suscetibilidade do hospedeiro, a amostra e a dose infectante (GAST 1997). A via de inoculação, a dose infectante, a idade, a via de infecção, a virulência da cepa, o fagotipo e o repertório genético determinam a gravidade dos processos infecciosos por *Salmonella* Enteritidis como acrescentaram BARROW (1994), SIEBERS & FINLAY (1996), KINGSLEY & BAUMER (2000) e WALLIS & GALYOV (2000). Como neste trabalho somente variou a linhagem estudada, pode-se inferir que a ave ISA Label manifestou-se mais resistente à infecção.

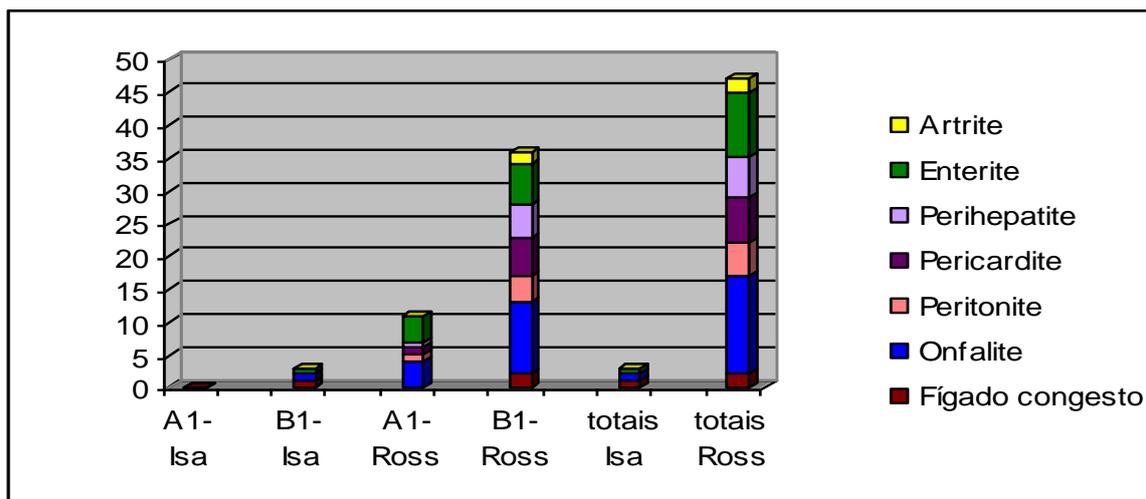


FIGURA 3 -Achados anatomopatológicos registrados nas aves Ross e ISA Label oriundas de ovos inoculados com *Salmonella* Enteritidis PT4

A avaliação histopatológica dos órgãos, bacteriologicamente positivos para *Salmonella* Enteritidis, da única ave ISA Label que morreu, demonstrou que o fígado apresentou hiperemia, infiltrados inflamatório acentuado e multifocais de células mononucleadas associados à necrose de hepatócitos. No coração, duodeno, jejuno, íleo e ceco identificaram-se infiltrados inflamatórios acentuados e multifocais com células mononucleadas.

Na avaliação histopatológica dos órgãos bacteriologicamente positivos para *Salmonella* Enteritidis, das aves da linhagem Ross que morreram, detectaram-se nos corações infiltrado mononuclear predominantemente linfocitário moderado no epicárdio, com hiperemia e hemorragia em 13,33% (2/15), moderado e focal em 13,33% (2/15), moderado e multifocal associado a necrose multifocal e moderado em 6,66% (1/15), com discreto e focal em 6,66% (1/15), com infiltrado acentuado e focal com aglomerados de bactérias em 13,33%(2/15). No miocárdio observou-se necrose multifocal discreta em 26,66% (4/15) e verificou-se ainda uma associação entre o processo inflamatório e a presença de necrose em 40% (6/15) das aves que morreram.

Na análise histopatológica do fígado identificaram-se discreto e multifocal infiltrado de células mononucleares em 20% (3/15), infiltrado inflamatório mononuclear acentuado e multifocal em 13,33% (2/15) e infiltrados inflamatórios moderados a discretos e multifocais em 26,66% (4/15), sendo que

em 40% (6/15) ocorreu associação do processo inflamatório com necroses de hepatócitos em 26,66% (4/15).

Na avaliação histopatológica dos segmentos do trato gastrointestinal não foram encontradas lesões inflamatórias microscópicas no ingluvío, embora a recuperação da bactéria tenha ocorrido em 81,25 % (13/15) das aves que morreram da linhagem Ross e na única da linhagem ISA Label.

No duodeno, infiltrados inflamatórios de células mononucleares classificados como discretos a acentuados e difusos a multifocais foram encontrados na camada mucosa (lâmina própria), com moderada hiperemia em 40% (6/15) das aves e ausência de vilos em 6,66% (1/15) e em 13,33% (2/15) observou-se discreta hemorragia. Infiltrados inflamatórios de células mononucleares discretos e multifocais na camada submucosa ocorreram em 20% (3/15) e também infiltrados acentuados e difusos de células mononucleares nas serosas em 20% (3/15) das amostras analisadas.

Infiltrado de células mononucleares na camada mucosa (lâmina própria), discretos a acentuados e difusos a multifocais foram constatados no jejuno em 60% (9/15) das aves associados a hiperemia difusa em 13,33% (2/15) dos casos avaliados. Na camada serosa, infiltrados discretos e difusos foram detectados em 20% (3/15) das aves analisadas.

Em relação ao íleo, foram descritos infiltrados de células mononucleares na lâmina própria, discretos a moderados e difusos em 60% (9/15) e em 13,33% (2/15) na camada serosa das aves. Já nos cecos, infiltrados de células mononucleares discretos a moderados e difusos foram identificados em 40% (6/15) das aves analisadas, tanto na lâmina própria como na camada serosa.

FERREIRA et al. (1990) observaram degeneração vacuolar focal e acúmulo de células mononucleares nos hepatócitos, e também pericardite e miocardite com predominância de células mononucleares. GORHAM et al. (1994) constaram inflamação com infiltrados moderados de heterófilos e macrófagos no pericárdio que se estendeu ao miocárdio e também ao duodeno. DESMIDT et al. (1998) também encontraram lesões anatomohistopatológicas nas aves que morreram durante seus estudos e concluíram que foi um processo septicêmico causado pela *Salmonella*

Enteritidis. DHILLON et al. (2001) relataram que a enterite foi primeiramente caracterizada pelo aumento de linfócitos e macrófagos na lâmina própria no ceco, algumas vezes no íleo, que se estendem às camadas mucosa e muscular. Para HOERR (2003), a *Salmonella* invade e passa através das células epiteliais e atinge os vasos linfáticos, estimulando a inflamação do intestino, disseminando-se posteriormente para outros órgãos.

As alterações descritas nos tecidos analisados sugerem que as aves das duas linhagens morreram em decorrência de um processo septicêmico no qual se registraram hiperemia, infiltrados inflamatórios com predominância de linfócitos e macrófagos no intestino, coração e fígado; hemorragia e infiltrados inflamatórios de células mononucleares e necrose associada, ou não, ao processo inflamatório. Estes resultados provavelmente refletem a patogênese de bactérias do gênero *Salmonella*, que são parasitas intracelulares que podem ser fagocitadas por macrófagos, ou também escaparem do sistema de defesa, multiplicarem-se e disseminarem-se.

Conforme ITO (1990), qualquer processo inflamatório nas aves obedece à mesma seqüência de alterações morfológicas. Inicia com as alterações vasculares e é rapidamente sucedido por uma exsudação significativa de fluído plasmático e de heterófilos. Após a sexta hora, observa-se um afluxo de células mononucleares. Ao final dos eventos do processo inflamatório, a célula predominante é o fagócito mononuclear. As diferenças identificadas nos tipos celulares predominantes podem ser atribuídas ao delineamento experimental ou à virulência das amostras ou mesmo do fagotipo de *Salmonella* Enteritidis presente.

Pelos resultados apresentados, a linhagem ISA Label foi mais resistente à infecção pela *Salmonella* Enteritidis do que Ross. BUMSTEAD & BARROW (1993), estudando a resistência contra *Salmonella gallinarum*, *Salmonella pullorum* e *Salmonella enteritidis*, sugeriram que pode haver um mecanismo geral de resistência que pode se aplicar a todos os sorovares de *Salmonella*. Observaram também que as linhagens diferiram em suscetibilidade a esses agentes e que a resistência pode ser devida à habilidade do sistema fagocítico em conter a infecção. KRAMER et al. (2001) detectaram também diferenças de sensibilidade entre duas linhagens de corte quanto à colonização

do intestino e invasão em órgãos. WINGLEY et al. (2002) encontraram lesões nas aves suscetíveis e menos pronunciadas nas resistentes. As lesões foram confinadas ao baço e fígado, sendo que no fígado constataram infiltração de leucócitos, particularmente heterófilos. Os autores concluíram que dois dias após a inoculação oral, nenhuma diferença foi encontrada na percentagem e no número de bactérias recuperadas no intestino, indicando que a resistência é expressa no sistema reticuloendotelial. Informaram, ainda, que a resistência genética às salmoneloses sistêmicas limita a disseminação de bactérias em órgãos e previne a bacteremia. A resistência parece ser expressa pelos fagócitos mononucleares e está relacionada com o aumento da morte intracelular da *Salmonella* dentro de macrófagos.

Os resultados da resistência genética da ave frente a *Salmonella* são difíceis de comparar com os obtidos nesse estudo, porque parte das observações desta resistência se deve a uma série de fatores incluindo idade, linhagem, variabilidade genética individual e de população, dose infectante, via de inoculação, fatores ambientais e nutricionais, estresse, níveis de proteção transferidos de pais aos filhos. Entretanto, neste trabalho, a linhagem de crescimento lento foi mais hábil para eliminar a *Salmonella* Enteritidis e pode ser considerada de menor perigo para as criações alternativas e comerciais e para o homem.

CONCLUSÕES

Nas condições do presente estudo pode-se concluir que:

- 1-a *Salmonella* Enteritidis foi hábil em colonizar o trato gastrointestinal nas duas linhagens estudadas, sendo que as aves de ISA Label apresentaram menor frequência e período de excreção fecal;
- 2-os principais sinais clínicos observados foram de um quadro septicêmico aliados a distúrbios gastrointestinais na linhagem Ross;
- 3-onfalite, pericardite, perihepatite e enterite foram os principais achados anatomopatológicos na linhagem Ross;
- 4-a linhagem de crescimento lento foi mais hábil em eliminar a *Salmonella* Enteritidis, foi mais resistente ao desenvolvimento de lesões, de sinais

clínicos e à ocorrência de mortalidade sendo, portanto mais resistente e mais indicada para criações em sistemas alternativos.

REFERÊNCIAS

1. BAILEY, J. S.; COX, N. A.; BERRANG, M. E. Hatchery-Acquired *Salmonellae* in broiler chicks. **Poultry Science**, v. 73, p.1153-1157, 1994.
2. BARROW, P. A. Experimental infection of chickens with *Salmonella enteritidis* . **Avian Pathology**, v.20, p. 145-153, 1991.
3. BARROW, P. A., HUGGINS, M. B., LOVELL, M. A. Host specificity of *Salmonella* infectious in chickens and mice is expressed in vivo primarily at the level of the reticuloendothelial system. **Infection and Immunology**, n. 62, p. 4602-4610, 1994.
4. BARROW, P. A. *Salmonella* em avicultura -Problemas e novas idéias sobre possibilidades de controle. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v.1, p. 9-16, 1999.
5. BARROW, P. A. The paratyphoid salmonellae. **Rev. Sci Tec.Off.Int. Epiz**, v.19, n.2., p 351-75, 2000.
6. BEAL, R.K.; WIGLEY, P.; POWERS, C.; HULME, S.D. BARROW, P.A.; SMITH, A.L. Age at primary infection with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in the chicken influences persistence of infection and subsequent immunity to re-challenge. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.100, p. 151-164, 2004.
7. BERCHIERI JUNIOR, A. Salmoneloses aviárias. In: BERCHIERI JUNIOR, A.; MACARI, M. **Doenças das aves**. Campinas: FACTA, 2000. p. 185-195.
8. BERTHELOT-HÉRAULT, F.; MOMPART, F.; Z. Y.; GMUNT, M.Z.; DUBRAY, G.; DUCHET-SUCHAUX, M. Antibody responses in the serum and gut of chickens lines differing in cecal carriage of *Salmonella enteritidis*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 96, p. 43-52, 2003.
9. BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria Nacional da Defesa Agropecuária. Departamento Nacional de Defesa Animal. **Instrução Normativa 007/99 de 17/05/1999**. 1999. 17 p.
11. BUMSTEAD, N.; BARROW, P. Resistance to *Salmonella gallinarum*, *Salmonella pullorum* and *Salmonella enteritidis* in inbred lines of chickens. **Avian Diseases**, v. 37, p.189-193, 1993. BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria Nacional da Defesa Agropecuária.

Departamento Nacional Defesa Animal. **Instrução Normativa** 007/99 de 17/05/1999.1999. 17 p.

12. CORRIER, D. E.; HARGIS, B.; HINTON, A. Jr.; LINDSEY, D.; CALDWELL, D.; MANNIG, J.; DELOACH, J. Effect of anaerobic cecal microflora and dietary lactose on colonization resistance of layer chickens to invasive *Salmonella enteritidis*. **Avian Diseases**, v.35, p.357-343, 1991.
12. DESMIDT, M.; DUCALETTE, R.; HAESBROUCK, F. Pathogenesis of *Salmonella* Enteritidis phage types four after experimental infection of young chickens. **Veterinary Microbiology**, v.56, p.99-109, 1997.
13. DESMIDT, M.; DUCALETTE, R.; MAST, J.; GODDEERIS, B. M.; KASPERS., B.; HAESBROUCK, F. Role of the immune system in *Salmonella* Enteritidis phage types four infection in chickens. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.63, p.355-355, 1998.
14. DHILLON, A. S.;ALISANTOSA, B. N; SHIVAPRASAD, H. L.; JACK, O.; SCHABERG, D.;BANDLI,D. Pathogenicity of *Salmonella* Enteritidis Phage Types 4, 8 and 23 in broiler chicks. **Avian Diseases**, v. 43, p.506-515, 1999.
15. DHILLON, A. S.; SHIVAPRASAD, H. L.; ALISANTOSA,B. N;. JACK, O.; SCHABERG, D.; BANDLI,D.; JOHNSONS. Pathogenicity of environmental origin Salmonellas in specific pathogen-free chicks. **Poultry Science**, v. 80, n.9, p. 1323-1328, 2001.
16. FERNÁNDEZ, A.; LARA, C.; LOSTE, A.; CALVO, S.; MARCA, M.C. Control of *Salmonella enteritidis* phage type 4 experimental infection by fosfomycin in newly hatched chicks. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Disease**, v.24, p.207-216, 2001.
17. FERREIRA, A. J. P. ITO, N. M.; K.; BENEZ, S. M.; NOTONHA, A. M. B. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS AVÍCOLAS, 1990, Campinas. **Anais...**, Campinas: FACTA, 1990. p.171.
18. GAST, R. K.; BEARD, C. W. Age-related changes in the persistence and pathogenicity of *Salmonella typhimurium* in chickens. **Poultry Science**, v. 68, p.1454 -1460, 1989.
19. GAST, R. K. Understanding *Salmonella enteritidis* in laying chickens: the contribution of experimental infections. **International Journal of Food Microbiology**, v.21, p.107-116, 1994.
20. GAST, R. K.; BENSON, S. T. The comparative virulence for chicks of *Salmonella enteritidis* phage type 4 isolates and other phage types isolated from poultry in the United States. **Avian Diseases**, v.39, p. 567-574, 1995.
21. GAST R. K. Paratyphoid infection. In: CALNEK, B. W. **Diseases of poultry**. 10 ed. Ames: Iowa University Press, 1997. p. 97-121.

22. GEORGIA POULTRY LABORATORY. **Monitoring and detection of *Salmonella* in poultry and poultry environments.** Oakwood: Georgia Poultry Laboratory, 1997.293p. [Workshop].
23. GORHAM, S.L.; KADAVIL, K.; LAMBERT, H.; VAUGAHAN, E.; ABEL, J.; PERT, B. Persistence of *Salmonella enteritidis* in young chickens. **Avian Pathology**, v.20, p.433-437, 1991.
24. GORHAM, S.L.; KADAVIL, K.; VAUGAHAN, E.; LAMBERT, H.; PERT, B.; ABEL, J. Gross and microscopic lesions in young chickens experimentally with *Salmonella enteritidis*. **Avian Diseases**, v.38, p.816-821, 1994.
25. HOERR, F. J. Integridade intestinal e o impacto de sua perda-Parte I. **Boletim Técnico Informativo Exper Tyse**, Paulínia: Elanco Saúde Animal. 2003. 2p.
26. HOFER, E., SILVA FILHO, S. J.; REIS, E. M. F. Prevalência de Sorovares de *Salmonella* isolados de aves no Brasil. **Pesquisas Veterinaria Brasileira**, v.17, n 2, p.55-62,1997.
27. HINTON, M.; PEARSON, G. R.; THRELFALL, E. J.; ROWE, B.; WOODWARD, M.; WRAY, C. Experimental *Salmonella enteritidis* infection in chicks. **The Veterinary Record**, n.124, p.233.1989.
28. ITO, N. M. K. Mecanismos gerais da defesa das aves: inflamação. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS AVÍCOLAS, 1990, Campinas. **Anais...**,Campinas: FACTA, 1990. p. 119-129.
29. KRAMER, J.; VISSCHER, A. H.; WAGENAAR, J. A.; BOONSTRA-BLOM, A. G.; JEURISSEN, S. H. M. Characterization of the innate and adaptive to *Salmonella enteritidis* PT1 infection in four broiler lines. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.79, n.3-4, p.219-233, 2001.
30. KINGSLEY, R. A., BAUMLER, A. J. Host adaptation and the emergence of infectious diseases: the *Salmonella* paradigm. **Molecular Microbiology**, v. 36, n. 5, p.1006-14, 2000.
31. LISTER, S. A. *Salmonella enteritidis* infection in broilers and broiler breeders. **The Veterinary Record**, v.123, n.13, p.350, 1988.
32. LUNA, L.G. Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology. 3ed. New York:: McGraw-Hill, 1968. 258 p.
33. O'BRIEN, J. D. P. *Salmonella enteritidis* infection in broiler chickens. **The Veterinary Record**, n.122, p.214.1988.
34. QURESHI, M. A. Interação entre nutrição e o sistema imune e produtividade das aves. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS

- AVÍCOLAS, 2001, Campinas. **Anais...**, Campinas: FACTA, 2001. p. 342-254.
35. SAMPAIO, I. B. M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. Belo Horizonte: Fundação de ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 1998. 221p.
36. SIEBERS, A.; FINLAY, B. B. M cells and the pathogenesis of mucosal and systemic infections. **Trends in Microbiology**, v. 4, n.1, p.22-29,1996.
37. WALLIS, T. S.; GALYOV, E. E. Molecular basis of *Salmonella*-induced enteritis. **Molecular Microbiology**, v.36, n. 5, p.997-1005, 2000.
38. WIGLEY, P.; HULME, S. D.; BUMSTEAD, N.; BARROW, P. In vivo and in vitro studies of genetic resistance to systemic salmonellosis in the chicken encoded by the SALI locus. **Microbes and Infection**, v.4, p. 1111-120, 2002.
39. WIGLEY, P. Genetic resistance to *Salmonella* infection in domestic animal. **Research in Veterinary Science**, v. 76, p. 165-169, 2004.

CAPÍTULO 5- CONSIDERAÇÕES FINAIS

A segurança alimentar está aliada ao manejo, aos procedimentos de biossegurança, às boas práticas de fabricação e ao tipo de criações de animais. Os produtores têm adotado procedimentos de criação que conciliam a produção às necessidades culturais dos consumidores.

Aspectos sanitários aliados a qualidade da dieta devem estar relacionados ao sistema de produção e garantir a viabilidade econômica. Sistemas de produção avícola não convencionais, sem antibióticos promotores de crescimento, que utilizam dieta vegetal e linhagens de crescimento lento, levam a aumentos no custo de produção, mas por outro lado agregam valores aos produtos tendo em vista o aspecto natural. Destaca-se que um alimento seguro é uma exigência e um direito de qualquer consumidor, independente de sua situação sócio econômica e cultural. No entanto, ocorrências de enfermidades transmitidas pelos alimentos aos homens aumentaram consideravelmente nos últimos anos.

Neste contexto, a *Salmonella* Enteritidis tem sido apontada como um dos principais microrganismos causadores de infecções alimentares. Patógeno de epidemiologia complexa, que tem requerido diferentes métodos de controle na produção de ovos (matrizeiros), nos incubatórios, nos diferentes sistemas e segmentos de produção avícola e muitas vezes sem sucesso. O estado de ave portadora, mais freqüente nas infecções zoonóticas por *Salmonella*, aliado às dificuldades técnicas de sua detecção durante a inspeção e abate, tem tornado as aves uma das principais fontes de infecção para o homem.

Constatou-se neste estudo que:

a) tanto na linhagem de crescimento rápido -Ross como na de crescimento lento - ISA Label a inoculação *in ovo* pela *Salmonella* Enteritidis, simulando a infecção através do oviduto, determinou maior mortalidade embrionária e colonização intestinal dos pintos do que a simulação pela manipulação dos ovos no momento da incubação;

b) a reprodutora infectada exerceu papel epidemiológico importante na disseminação do patógeno, sendo que quando a infecção ocorre no ovo fértil pode determinar maiores prejuízos ao produtor, pois os parâmetros de incubação foram afetados;

c) há necessidade de maior controle na produção de pintos e adoção de práticas higiênico sanitárias na manipulação dos ovos de pequenas criações;

d) pelas variáveis estudadas, a linhagem ISA Label, “pescoço pelado”, foi mais hábil em eliminar *Salmonella* Enteritidis de seu organismo; a

capacidade invasiva do patógeno foi menor; a mortalidade foi inexpressiva; mas foram observadas alterações na biometria do intestino, nas alturas de vilo e profundidades das criptas somente no dia da eclosão, além disso, o ganho de peso não foi afetado.

Com base nestes resultados, pode-se sugerir que as aves da linhagem ISA Label, por oferecerem menor potencial de risco de infecção pela *Salmonella* Enteritidis, podem ser utilizadas em produções alternativas em pequenas e médias propriedades, visando atender parcelas de consumidores que se dispõem a pagar mais caro.

Como esperado, observou-se uma menor capacidade digestiva da linhagem de crescimento lento porque as aves mantiveram, provavelmente, suas características genéticas originais, sugerindo que o desenvolvimento corporal pode ser influenciado por fatores genéticos além dos fisiológicos, nutricionais e de ambiência.

A seleção genética das aves para o aumento da massa corporal aparentemente tem induzido a efeitos antagônicos às funções imunes, determinado uma maior suscetibilidade aos agentes infecciosos. No presente estudo, as aves de crescimento rápido apresentaram uma taxa de mortalidade de 25%, enquanto a crescimento lento 1,66% durante os 21 dias do experimento.

Neste sentido, os mecanismos de defesa tidos como inespecíficos ou inatos à *Samonella* Enteritidis foram relacionados ao perfil genético da linhagem. Em criações onde não se aplicam os antibióticos promotores de crescimento, linhagem de maior rusticidade, como a ISA Label, talvez seja uma alternativa viável para reduzir o estado de ave portadora, que constitui um perigo para o consumidor.

Vale ressaltar que pesquisas com aves “pescoço pelado” devem ser implementadas no sentido buscar métodos alternativos de controle, de verificar os efeitos da inoculação diretamente no trato gastrintestinal de pintos associados aos mecanismos de defesa específica (imunização ativa) Talvez a incorporação do gen *Na* em aves de crescimento rápido possa trazer benefícios para o controle das salmoneloses zoonóticas.

Finalizando, destaca-se que as práticas de biossegurança aliadas à seleção de linhagens resistentes podem constituir um caminho para o controle desta zoonose, contribuindo para obtenção de criações mais saudáveis e conseqüentemente alimentos mais seguros, o que atenderia as interesses e necessidades econômicas e sanitárias, resguardando a saúde animal e humana e reduzindo as perdas econômicas considerando ainda, que o Brasil está entre os maiores exportadores de carne de frango do mundo.