

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

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA INOCULAÇÃO DE *Salmonella* Enteritidis EM
OVOS EMBRIONADOS E EM PERUS DE UM DIA**

Carla Yoko Tanikawa de Andrade
Orientadora: Prof. Dr. Maria Auxiliadora Andrade

GOIÂNIA
2008



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: **CARLA YOKO TANIKAWA DE ANDRADE** CPF: E-mail: **carla_yoko@yahoo.com**

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

Vínculo Empregatício do autor: Agência de fomento:

País: UF: CNPJ: Sigla:

Título: **AVALIAÇÃO DO EFEITO DA INOCULAÇÃO DE Salmonella Enteritidis EM OVOS EMBRIONADOS E EM PERUS DE UM DIA** Palavras-chave: **colonização intestinal, inoculação experimental, histomorfometria, Meleagridis gallopavo, salmonelose.**

Título em outra língua: **EVALUATING THE EFFECT OF Salmonella Enteritidis INOCULATION IN EMBRYONATED EGGS AND DAY OLD TURKEYS**

Palavras-chave em outra língua: **experimental inoculation, intestinal colonization, histomorphometrial, Meleagridis gallopavo, salmonellosis.**

Área de concentração: **SANIDADE ANIMAL** Data defesa: (dd/mm/aaaa) **28/08/2008**

Programa de Pós-Graduação: **CIÊNCIA ANIMAL**

Orientador(a): **MARIA AUXILIADORA ANDRADE** CPF: E-mail: **maa@vet.ufg.br**

Co-orientador(1): **MARCOS BARCELLOS CAFÉ** CPF: E-mail: **mcafe@vet.ufg.br**

Co-orientador(2): **JOSÉ HENRIQUE STRINGHINI** CPF: E-mail: **henrique@vet.ufg.br**

3. Informações de acesso ao documento:

Liberação para disponibilização?¹ ☒ total ☐ parcial

Em caso de disponibilização parcial, assinale as permissões:

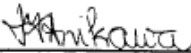
[] Capítulos. Especifique:

[] 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 2008


Assinatura do(a) autor(a)

¹ Em caso de restrição, esta poderá ser mantida por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Todo resumo e metadados ficarão sempre disponibilizados.

CARLA YOKO TANIKAWA DE ANDRADE

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA INOCULAÇÃO DE *Salmonella* Enteritidis EM
OVOS EMBRIONADOS E EM PERUS DE UM DIA**

Dissertação apresentada para obtenção
do grau de Mestre em Ciência Animal à
Escola de Veterinária da Universidade
Federal de Goiás

Área de Concentração:
Sanidade Animal

Orientadora:

Prof. Dr. Maria Auxiliadora Andrade

Comitê de Orientação:

Prof. Dr. José Henrique Stringhini

Prof. Marcos Barcellos Café

GOIÂNIA
2008

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(GPT/BC/UFG)

A553a Andrade, Carla Yoko Tanikawa de.
Avaliação do efeito da inoculação da *Salmonella* Enteritidis em ovos embrionados e em perus de um dia [manuscrito] / Carla Yoko Tanikawa de Andrade. – 2008.
Vii, 63f. : il. ; figs., tabs.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Auxiliadora Andrade; Co-Orientadores: Prof. Dr. José Henrique Stringhini, Prof. Dr. Marcos Barcellos Café.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária, 2008.

Bibliografia.

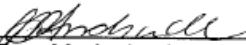
1. Perus (ave) – Inoculação 2. *Salmonella* Enteritidis 3. Salmonelose em animais I. Andrade, Maria Auxiliadora. II. Stringhini, José Henrique. III. Café, Marcos Barcellos. IV. Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária. V. Título.

CDU: 636.592:616-022.1

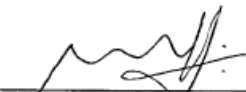
Dedico este trabalho a Deus; meu esposo e
companheiro Marlon; minha orientadora e
amiga Prof. Dr. Maria Auxiliadora Andrade

CARLA YOKO TANIKAWA DE ANDRADE

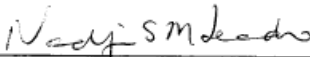
Dissertação defendida e aprovada em **28/08/2008**, pela Banca
Examinadora constituída pelos professores:



Profa. Dra. Maria Auxiliadora Andrade
(ORIENTADOR (A))



Dr. Alberto Back - Empresa Privada/PR



Profa. Dra. Nadja Susana Mogyca Leandro

RESUMO

O presente estudo foi dividido em dois experimentos, referentes ao período de incubação e fase inicial. O estudo de incubação teve como objetivo avaliar o rendimento de incubação, a capacidade de penetração de *Salmonella* Enteritidis através da casca do ovo e a habilidade de colonização do trato gastrointestinal. Foram incubados 400 ovos embrionados de perus da linhagem BUT9, distribuídos em quatro tratamentos: CCS e CCM (inoculação com placebo na casca e na câmara de ar, respectivamente); ICS e ICM (inoculação com $4,2 \times 10^4$ UFC/mL de *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar Enteritidis na casca e na câmara de ar, respectivamente). Os parâmetros de incubação calculados foram: fertilidade, eclodibilidade total e de ovos férteis, rendimento de peruzinhos. *Salmonella* foi pesquisada na casca, membrana, albume/gema, embrião e ao nascimento no mecônio de todas as aves. As respostas qualitativas foram analisadas pelo teste do qui-quadrado (χ^2). Constatou-se que o agente manteve-se viável na casca durante todo o período de incubação e migrou para o interior dos ovos nos tratamentos inoculados. Os parâmetros de incubação não foram afetados quando o patógeno foi inoculado na casca. Constatou-se também que a *Salmonella* Enteritidis inoculada na câmara de ar determinou mortalidade embrionária precoce, enquanto o tratamento controle (CCM) influenciou os períodos de mortalidade em relação ao CCS. A colonização intestinal pelo patógeno ocorreu em peruzinhos oriundos da inoculação experimental na casca. No segundo experimento, 135 perus de corte de um dia oriundos de inoculação via casca e via água de bebida foram avaliados quanto aos efeitos de *Salmonella* Enteritidis de colonizar o trato gastrointestinal, determinar infecção sistêmica, lesionar a integridade intestinal e alterar as variáveis de desempenho. Aos 10, 20 e 28 dias, as aves e a ração foram pesadas para constituir o cálculo das variáveis de desempenho. Após a pesagem, cinco aves de cada tratamento foram necropsiadas para obter os dados de peso e isolamento bacteriano do intestino, fígado, baço e coração. Foi empregado o teste do qui-quadrado para as variáveis qualitativas e o procedimento Anova Geral para as quantitativas, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey (5%). A colonização intestinal aumentou significativamente no tratamento inoculado na casca, mas não no tratamento inoculado na água de bebida. O intestino apresentou máximo desenvolvimento aos 10 dias e maior peso ao primeiro, décimo e 28º dias quando *Salmonella* esteve presente. *Salmonella* foi capaz de colonizar o trato gastrointestinal e estabelecer infecção sistêmica. A taxa de mortalidade esteve alta durante a primeira semana de idade, com discretos sinais clínicos ou lesões anatomopatológicas.

Palavras-chaves: colonização intestinal, inoculação experimental, histomorfometria, *Meleagris gallopavo*, salmonelose.

ABSTRACT

This study was divided into two experiments, referring to incubation and early phase. The incubation experiment had as principal aims evaluated incubation yield, the capacity to penetrate through the eggshell and the ability to colonize the gastrointestinal tract. Four hundred fertilized turkey eggs for BUT9 strain were distributed in four treatments: CCS and CCM (inoculation of placebo in eggshell and air cell, respectively); ICS and ICM (inoculation with $4,2 \times 10^4$ UFC/mL of *Salmonella enterica* subspecies *enterica* sorovar Enteritidis in eggshell and air cell, respectively). Incubation parameters calculated were: fertility, total hatchability, hatchability of fertile eggs and poult yield. *Salmonella* was examined in eggshell, inner and outer membranes, albumen/yolk, embryo and, after hatched, in meconium in all poult. Qualitative results were analyzed by qui-square test. It was verified that the agent maintained feasible in eggshell during the hole incubation and migrated to egg components. Incubation parameters were not affected by the pathogen inoculated in eggshell. It was also observed that *Salmonella* Enteritidis inoculated in air cell determined early embryo mortality, while the control treatment influenced the mortality periods in relation with CCS. The intestinal colonization of *Salmonella* occurred in poults derived from eggshell experimental inoculation. In the second experiment, 135 poults derived from inoculation through eggshell and drinking water were evaluated by the effects of *Salmonella* Enteritidis to colonize the gastrointestinal tract, determine systemic infection, hurt the intestinal integrity and change the performance variables. At 10, 20 and 28 days, turkeys and feed were weighted to constitute calculation of performance variables. After weighage, five turkeys from each treatment were necropsied to obtain datas of weight and bacterial isolation of intestine, liver, spleen and heart. Qui-square test was employed to qualitative variables and the Anova procedure to quantitative variables and average compared by Tukey test (5%). The intestinal colonization increase significantly during early phase in treatment inoculate through eggshell, but none in treatment inoculated in drinking water. The intestine showed maximum development at 10 days and higher weight at first, 10th and 28th when *Salmonella* was present. The digestive and absorptive capacity was impaired in infected birds. *Salmonella* was capable of colonized gastrointestinal tract and established systemic infection. Mortality rate was high during first week of age, with less clinical signs or anatomopathological lesions.

Key words: experimental inoculation, intestinal colonization, histomorphometrial, *Meleagris gallopavo*, salmonellosis.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	1
CAPÍTULO 2 – EFEITOS DA INOCULAÇÃO DE <i>Salmonella</i> Enteritidis NA INCUBAÇÃO DE OVOS EMBRIONADOS DE PERUS.....	6
RESUMO.....	6
ABSTRACT.....	7
INTRODUÇÃO.....	8
MATERIAL E MÉTODOS.....	10
Locais.....	10
Delineamento experimental.....	10
Preparação do inóculo.....	10
Inoculação dos ovos.....	11
Pesquisa de <i>Salmonella</i>	12
Preparação as amostras.....	12
Identificação de <i>Salmonella</i>	12
Ovoscopia.....	13
Embriodiagnóstico.....	13
Parâmetros de incubação.....	14
Análises estatísticas.....	14
RESULTADOS.....	15
DISCUSSÃO.....	17
CONCLUSÕES.....	21
REFERÊNCIAS.....	22
CAPÍTULO 3 – AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO, ASPECTOS CLÍNICOS E HISTOPATOLÓGICOS DE PERUS DE UM DIA INOCULADOS EXPERIMENTALMENTE COM <i>Salmonella</i> Enteritidis.....	26
RESUMO.....	26
ABSTRACT.....	27
INTRODUÇÃO.....	28
MATERIAL E MÉTODOS.....	31
Locais.....	31
Delineamento experimental.....	31
Variáveis de desempenho.....	32
Biometria dos órgãos.....	32
Exame histopatológico.....	33
Exame histomorfométrico.....	34
Pesquisa de <i>Salmonella</i>	34
Análises estatísticas.....	35
RESULTADOS.....	36
DISCUSSÃO.....	46
CONCLUSÕES.....	54
REFERÊNCIAS.....	55
CAPÍTULO 4 – CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	62

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

A avicultura nacional ostenta posição ímpar no cenário internacional pela oferta de carne saudável e de excelente padrão gastronômico para o consumidor (ANTUNES, 2004). A produção de perus compartilha essa importância, representando volumes crescentes nas exportações do setor agropecuário (ANTUNES, 2005).

De acordo com dados fornecidos pela Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), nos últimos 18 anos, o Brasil passou de nono para segundo maior produtor de carne de peru. A produção brasileira atingiu 40,4 milhões de perus abatidos em 2007, com 177 mil toneladas exportadas e 281 mil toneladas destinadas para mercado interno (UBA, 2008).

Para esta evolução, a produção de perus no Brasil foi acompanhada pela contínua tecnificação e excelente padrão sanitário (ANTUNES, 2005). Entretanto, como consequência a esse crescimento, é inevitável o aparecimento de desafios sanitários e os produtores brasileiros passam a enfrentar alguns problemas da mesma magnitude dos grandes produtores mundiais (BACK, 2008).

A constatação do impacto negativo de doenças sobre o desempenho dos lotes (AZIZ, 2003) ratifica que as infecções aviárias por bactérias como *Salmonella* spp. comprometem a produção avícola com grandes perdas econômicas, além de terem grande importância para saúde pública (GAST, 2003). Neste contexto, as salmoneloses ocupam posição de destaque.

O gênero *Salmonella* se caracteriza por ser bastonetes Gram negativos não produtores de esporos, móveis em sua maioria, com flagelos peretríquios, à exceção de *S. Gallinarum* e *S. Pullorum*. São anaeróbios facultativos, produzem gás a partir de glicose, reduzem nitratos a nitritos, utilizam citrato como única fonte de carbono, produzem gás sulfídrico a partir da redução do enxofre em ágar triplice açúcar ferro (TSI). Tem capacidade de descarboxilar lisina e ornitina. Não apresentam atividade ureásica, não fermentam lactose, sacarose, malonato e as reações em meio indol e fenilalanina são negativas (NICOLET, 1986; LE MINOR, 1994; GAST, 2003).

Segundo POPOFF et al. (2004), o gênero pertencente à família *Enterobacteriaceae* possui apenas duas espécies: *S. enterica* e *S. bongori*. A espécie *Salmonella enterica* é dividida em seis subespécies bioquimicamente distintas e 2.541 sorovares. A *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar Enteritidis é caracterizada por causar doença clínica em aves jovens (paratifo aviário) ou viver em equilíbrio no organismo desses animais, viabilizando no abate, que o patógeno esteja presente no produto final (GAST, 2003)

A *Salmonella* apresenta grande diversidade de vias de transmissão (ITO, 2005), além de ampla e variada ocorrência em humanos, outros mamíferos, répteis e aves, sendo que estes últimos ocupam ponto central na epidemiologia da doença e representam reservatórios de grande importância sanitária (RODRIGUES, 2005). O fato da bactéria se propagar insidiosamente em várias espécies animais, veiculadas pelas excretas de aves infectadas ou por produtos contaminados, corresponde um dos maiores perigos desta zoonose (SUZUKI, 1994).

A contaminação de carcaças de perus pode ocorrer pela deposição, nas patas e penas, de material fecal que atinge as carcaças durante o abate, depenagem e evisceração (BEMRAH et al., 2003), ou por contaminação cruzadas durante o processamento por utensílios, manipulação dos trabalhadores e água de resfriamento (TRAMPEL et al., 2000).

O Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) divulgou que entre 1997 a 1998, 19,6% das amostras líquidas de abatedouros de perus estavam contaminadas com *Salmonella* (USDA, 1999). Também nos Estados Unidos, ZHAO et al. (2001) observaram que a prevalência do patógeno foi de 2,6% em carnes de perus vendidas na região de Washington, D.C.. BELI et al. (2001) na Albânia encontraram 8,2% das amostras de carne de perus contaminadas por *Salmonella*, principalmente o sorovar Enteritidis. Em produtos industrializados que utilizam carne de peru como matéria-prima, *Salmonella* foi encontrada em 37,9% das amostras (BEMRAH et al, 2003).

No Brasil, o Laboratório de Enterobactérias da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) caracterizou a *Salmonella* Enteritidis como um dos sorovares mais frequentes em produtos avícolas nos anos de 2002 a 2004 (RODRIGUES, 2005). *Salmonella* Enteritidis também tem sido o sorotipo mais comumente

isolado na avicultura comercial de vários países, superando inclusive o isolamento de *Salmonella* Typhimurium (MARQUES, 2000).

Este panorama evidencia o risco de infecções humanas pelo patógeno e ameaça a aceitação pública dos produtos avícolas, sendo os mesmos incriminados como as principais fontes de infecção atribuídas às doenças veiculadas por alimentos (IRWIN et al., 1994).

A constatação de que os produtos de origem aviária participam na transmissão da salmonelose humana, tem contribuído para a intensificação de pesquisas na área (ANDRADE, 2005). Entretanto, a maioria dos dados disponíveis sobre *Salmonella* em aves deriva de estudos conduzidos em frangos de corte e poedeiras, com informações limitadas sobre a epidemiologia de *Salmonella* em perus (POTTURI et al., 2005).

O avanço da produção brasileira de perus aliado à comprovação da importância da *Salmonella* Enteritidis para a avicultura do estado de Goiás (ROCHA, 2001; REZENDE, 2002) e também pela alta prevalência do sorovar no Brasil (SILVA & DUARTE, 2002), motivaram a realização do presente estudo, com o objetivo de contribuir para o crescimento e fortalecimento da produção de perus, além de disponibilizar informações que visem a melhoria da sanidade do plantel.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, M. A. Inoculação de *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar Enteritidis fagotipo 4 em ovos embrionados de duas linhagens de frango de corte. 2005. 110 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

ANTUNES, R. Em franca expansão. Avicultura Industrial, 2004. Disponível em: http://www.aviculturaindustrial.com.br/site/dinamica.asp?tipo_tabela=produtos&id=12043&categoria=peru. Acesso em: 27 ago. 2005.

ANTUNES, R. Produzindo Perus. **Avicultura Industrial**, São Paulo, v. 1132, n. 3, p. 68-70, 2004.

AZIZ, T. A. Understanding the basics of diagnosing turkey diseases. **World Poultry**, Holanda, v. 19, n. 9, p. 56-57, 2003.

BACK, A. Ongoing turkey diseases in Brazil. In: 7th INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TURKEY DISEASES, 2008, Berlim, **Anais...**, Berlim, German Branch of World Veterinary Poultry Association, 2008, p. 24.

BELI, E.; TELO, A.; DURAKU, E. *Salmonella* serotypes from turkey meat in Albania. **International Journal of Food Microbiology**, Holanda, v. 63, n.1, p. 165-167, 2001.

1. BEMRAH, N.; BERGIS, H.; COLMIN, C.; BEAUFORT, A.; MILLEMANN, Y.; DUFOUR, B.; BENET, J.J.; CERF, O.; SANAA, M. Quantitative risk assessment of human salmonellosis from the consumption of turkey product in collective catering establishments. **International Journal of Food Microbiology**, Holanda, v. 80, n. 1, p. 17-30, 2003.
2. GAST, R. K. Paratyphoid infection. In: CALNEK, B. W. **Diseases of Poultry**, 11.ed. Ames: Iowa University Press, 2003. p. 97-121.
3. IRWIN, R.J.; POPPE, C.; MESSIER, S.; FINLEY, G.G.; OGGE, J. A national survey to estimate the prevalence of *Salmonella* species among Canadian registered commercial turkey flocks. **Canadian Journal of Veterinary Research**, Canadá, v. 58, n.4, p. 263-267, 1994.
4. ITO, N. M. K.; MIYAJI, C. I.; LIMA, E.A.; OKABAYASHI, S. **Flora bacteriana: Patologia do parasitismo bacteriano**. 1.ed. São Paulo: Elanco, 2005. cap 1, p 15-22.
5. LE MINOR, L. **Genus III *Salmonella* (Lignières) Bergey's Manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994, v.1, p. 427-458.
6. MARQUES, I. J. **Salmonelose e Toxinfecções Alimentares: Uma revisão**. 2000. 77 f. Monografia (Especialização em Sanidade Animal) – Centro de Ciências Agroveterinárias, Universidade do Estado de Santa Catarina, Joinville.
7. NICOLET, J. **Compendio de Bacteriologia Médica Veterinária**. 1ed. Zaragoza: Acribia, 1986, p 16-29.

8. POPOFF, M. Y.; BOCKEMÜHL, J.; GHEESLING, L. L. Supplement 2002 (no.46) to the Kauffmann-White scheme. **Research in Microbiology**, França, v. 155, n. 7, p. 568-570, 2004.
9. POTTURI, P. L.; PATTERSON, J. A.; APPLGATE, . J. Effects of delayed placement on intestinal characteristics in turkey poult. **Poultry Science**, Estados Unidos, v. 84, n. 5; p. 816-824, 2005.
10. REZENDE, C. S. M. **Ocorrência de *Salmonella* em lotes de frangos de corte de agroindústrias goianas: identificação bacteriológica e perfil de sensibilidade a antimicrobianos**. 2002. 73 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária – Sanidade Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.
11. ROCHA, P. T. **Ocorrência de *Salmonella* spp. em granjas de integrações de frango de corte no Estado de Goiás**. 2001. 57 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária – Sanidade Animal) Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.
12. 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.
13. SILVA, E.N.; DUARTE, A. *Salmonella* Enteritidis em Aves: Retrospectiva no Brasil. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, v. 4, n. 2, p. 1-16, 2002.
14. SUZUKI, S. Pathogenicity of *Salmonella enteritidis* in poultry. **International Journal of Food Microbiology**, Holanda, v.21, n.1, p. 89-105, 1994.
15. TRAMPEL, D.W.; HASIAK, R.J.; HOFFMAN, L.J.; DEBEY, M.C. Recovery of *Salmonella* from water, equipment and carcasses in turkey processing plants. **Journal of Applied Poultry Research**, Estados Unidos, v. 9, n. 1, p. 29-34, 2000.
16. UBA. **Relatório Anual 2007/2008**. Brasília: União Brasileira de Avicultura, 2007. p. 56-59.
17. USDA. **Nationwide Sponge Microbiological Baseline Data Collection Program: Young Turkeys**. Estados Unidos: United State Department of Agriculture, 1999. 14 p.
18. ZHAO, C.; GE, B.; VILLENA, J.; SUDLER, R.; YEH, E.; ZHAO, S.; WHITE, D. G.; WAGNER, D.; MENG, J. Prevalence of *Campylobacter* spp., *Escherichia coli*, and *Salmonella* Serovars in Retail Chicken, Turkey, Pork, and Beef from the Greater Washington, D. C., Area. **Applied and Environmental Microbiology**, Estados Unidos, v.67, n.12, p.5431-5436, 2001.

CAPÍTULO 2 – EFEITOS DA INOCULAÇÃO DE *Salmonella* Enteritidis NA INCUBAÇÃO DE OVOS EMBRIONADOS DE PERUS

RESUMO: Objetivou-se avaliar o rendimento de incubação, a capacidade de penetração de *Salmonella* Enteritidis através da casca do ovo e a habilidade de colonização do trato gastrointestinal. Foram incubados 400 ovos embrionados de perus da linhagem BUT, distribuídos em quatro tratamentos de 100 unidades experimentais: CC e CCA (inoculação com placebo na casca e na câmara de ar, respectivamente); IC e ICA (inoculação com $4,2 \times 10^4$ UFC/mL de *Salmonella* Enteritidis na casca e na câmara de ar, respectivamente). Os parâmetros de incubação calculados foram: fertilidade, eclodibilidade total e de ovos férteis, relação peso do peruzinho pelo peso do ovo. *Salmonella* foi pesquisada na casca, membrana, albume/gema e embrião de dois ovos por tratamento com um, sete, 14, 21 e 28 dias. Após o nascimento, foi determinada a frequência de recuperação do patógeno no mecônio de todas as aves. As variáveis foram analisadas pelo teste do qui-quadrado (χ^2). Constatou-se que durante todo o período de incubação, o agente manteve-se viável em 87,5% e 100% das amostras de casca dos tratamentos IC e ICA, respectivamente. Houve migração para o interior dos ovos em 33,33% das amostras analisadas no tratamento IC e em 95,45% amostras analisadas no tratamento ICA. Os parâmetros de incubação não foram afetados quando o patógeno foi inoculado na casca. Constatou-se também que a inoculação de *Salmonella* Enteritidis na câmara de ar determinou baixa eclodibilidade total e de ovos férteis com mortalidade embrionária precoce superior ($P < 0,05$) ao tratamento controle (CCA). Por outro lado, o tratamento controle da câmara de ar determinou baixa eclosão com aumento ($P < 0,05$) na mortalidade embrionária tardia em relação à inoculação do patógeno na casca. A colonização intestinal pelo patógeno ocorreu em peruzinhos oriundos da inoculação experimental na casca. Conclui-se que a análise da fertilidade, eclodibilidade e relação peso do peruzinho pelo peso do ovo não evidencia a presença de *Salmonella* Enteritidis no incubatório. Entretanto, a contaminação do incubatório pode ser determinada pela pesquisa de *Salmonella* Enteritidis nos componentes do ovo e no mecônio. A metodologia de inoculação via câmara de ar influenciou a eclodibilidade e a mortalidade embrionária.

Palavras-chaves: inoculação experimental, isolamento bacteriano, *Meleagris gallopavo*, salmonelose.

CHAPTER 2 – EFFECTS OF *Salmonella* Enteritidis IN INCUBATION OF EMBRYONATED TURKEY EGGS

ABSTRACT: This study aimed to evaluate performance of incubation, capacity of penetration of *Salmonella* Enteritidis through eggshell and ability of colonization gastrointestinal tract. Four hundred turkey eggs were incubated and distributed in four treatments of 100 experimental units: CC and CCA (inoculation with placebo in eggshell and air cell, respectively), IC and ICA (inoculation with 4.2×10^4 CFU/mL of *Salmonella* Enteritidis in eggshell and air cell, respectively). The parameters of incubation were: fertility, total hatchability and hatchability of fertile eggs, ratio of poult weight by egg weight. *Salmonella* was investigated in shell, membrane, albumen/yolk and embryo of two eggs per treatment with one, seven, 14, 21 and 28 days. After birth, was given the frequency of recovery of the pathogen in meconium of all birds. The variables were analyzed by χ -square test (χ^2). It appeared that during whole incubation period, the agent has remained viable in 87.5% and 100% eggshell samples in treatments IC and ICA, respectively. There was migration into eggs in 33.33% samples in treatment IC and 95.45% samples in treatment ICA. The parameters of incubation were not affected when pathogen was inoculated in eggshell. It was also discovered that inoculation of *Salmonella* Enteritidis in air cell determined low hatchability with early embryonic mortality higher ($P < 0.05$) than control treatment (CCA). Furthermore, air cell control treatment determined low hatchability ($P < 0.05$) with increase in late embryonic mortality ($P < 0.05$) comparing with inoculation in eggshell. The intestinal colonization by the pathogen occurred in poults from experimental inoculation in eggshell. It follows that analysis of fertility, hatchability and ratio of poult weight by egg weight does not show presence of *Salmonella* Enteritidis in hatchery. However, hatchery contamination may be determined by detection of *Salmonella* Enteritidis in egg components and meconium. The method of inoculation via air cell influenced hatchability and embryo mortality.

Key words: experimental inoculation, bacterial isolation, *Meleagris gallopavo*, salmonellosis.

INTRODUÇÃO

O ovo fertilizado é uma grande célula reprodutiva individual caracterizada como um sistema fechado e auto-suficiente, que armazena todo o material necessário para o desenvolvimento de uma ave viável (RUIZ & FOLEGATTI, 1995).

Neste contexto, o ovo representa um meio propício para o desenvolvimento de microrganismos e são necessárias diversas barreiras intrínsecas de defesa contra bactérias (NASCIMENTO & SALLE, 2003). A cutícula é uma cobertura glicoprotéica, transparente e delgada que cobre por curto período a superfície externa do ovo, selando 99% dos poros. A casca e suas membranas constituem uma barreira física rígida que limita a penetração de bactérias, enquanto o albume possui uma série de substâncias antimicrobianas como lisozima, coalbumina, avidina, riboflavina, apoproteína, etc., que impedem a multiplicação e o deslocamento bacteriano (NAKANO et al., 2003).

Apesar de o ovo ser um excepcional invólucro natural, a contaminação inata de ovos pode ocorrer como resultado da infecção do tecido reprodutivo 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).

Apesar do baixo percentual de ovos positivos para *Salmonella* após a postura, a via de transmissão vertical é particularmente importante para o processo de amplificação da contaminação durante a incubação (GAST, 1997). Um único ovo contaminado com *Salmonella* na incubadora pode disseminar extensivamente a bactéria no ambiente (BAILEY et al., 1998).

A penetração de *Salmonella* na casca do ovo e na membrana da casca pode resultar em transmissão direta do agente para o embrião em desenvolvimento (GAST, 1997), causando aumento de mortalidade embrionária precoce, ovos bicados com embriões vivos e mortos (BUT, 2005b).

A transmissão horizontal também pode ocorrer através de penugens e resíduos de nascimento que liberam *Salmonella* no ar que circula nos nascedouros, expondo peruzinhos durante a eclosão (GAST, 2003). O reflexo dessa contaminação pode afetar a qualidade das aves, causando doença clínica e mortalidade nos primeiros dias de vida (BOLELI, 2003).

Inoculações experimentais de *Salmonella* têm sido conduzidas em diversos estudos, envolvendo infecções em matrizes (MIYAMOTO et al., 1997; GAST et al., 2004), inoculação através da casca do ovo (PADRON, 1990; BARROS et al., 2001) ou cavidade alantóide (BRAUN & FEHLHABER, 1995; ANDRADE, 2005). Estas experimentações promovem conhecimentos sobre a interação do patógeno com o hospedeiro, melhorando a eficiência de estratégias de controle com impacto significativo na redução da frequência de transmissão de doença em humanos (GAST, 1997).

Baseado nesta expositiva pretendeu-se avaliar a inoculação de *Salmonella* Enteritidis através da habilidade do patógeno de migrar para os componentes do ovo e da determinação dos índices de incubação, frequência da mortalidade embrionária e infecção do trato gastrintestinal ao nascimento.

MATERIAL E MÉTODOS

Locais

O experimento com ovos embrionados de perus foi conduzido no Setor de Doenças de Aves, no Isolamento do Hospital Veterinário e no Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Medicina Veterinária da Escola de Veterinária (EV) da Universidade Federal de Goiás (UFG).

Delineamento experimental

Foram utilizados 400 ovos férteis de perus da linhagem *British United Turkeys* (BUT), obtidos de granja de matrizes em início de produção, localizada na região Centro-Oeste do Brasil. Os ovos foram transportados em condições ambientais ao Laboratório de Doenças de Aves, onde foram pesados, identificados e distribuídos aleatoriamente em quatro tratamentos constituídos de 100 ovos ou 100 unidades experimentais.

QUADRO 1 – Delineamento experimental.

Tratamento	Via de inoculação	Inóculo
Controle – casca (CC)	Casca	Solução salina a 0,85%
Controle – câmara de ar (CCA)	Câmara de ar	Solução salina a 0,85%
Inoculado – casca (IC)	Casca	$4,2 \times 10^4$ UFC/mL de <i>Salmonella</i> Enteritidis
Inoculado – câmara de ar (ICA)	Câmara de ar	$4,2 \times 10^4$ UFC/mL de <i>Salmonella</i> Enteritidis

Preparação do inóculo

O inóculo foi preparado com *Salmonella* Enteritidis isolada de amostras oriundas de frangos de corte, cedida pelo Laboratório de Bacteriologia da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás.

A concentração do inóculo foi de $4,2 \times 10^4$ UFC/mL, conforme descrito em BRADSHAW, et al. (1990).

A cepa foi replicada 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%, mantida a 4°C e concentração de $4,2 \times 10^4$ UFC/mL, ajustada com auxílio da escala de Mac Farland (FERNÁNDEZ et al., 2001).

A concentração foi confirmada por plaqueamento das diluições decimais seriadas em ágar verde brilhante, com posterior incubação a 37°C e contagem das UFC de *Salmonella* Enteritidis.

Inoculação dos ovos

Os procedimentos de inoculação foram realizados com material esterilizado e em câmara de segurança biológica classe II.

Os ovos inoculados na casca com *Salmonella* Enteritidis (IC) foram expostos ao inóculo por contato com as mãos revestidas com luvas descartáveis, simulando possível contaminação cruzada. Com auxílio de uma seringa de tuberculina, 0,1 mL de solução salina tamponada a 0,85%, contendo $4,2 \times 10^4$ UFC/mL foi depositada nas mãos revestidas com as luvas. Cada ovo foi mantido por um período de 20 segundos nas luvas contaminadas para umedecer toda a superfície. O mesmo procedimento foi realizado com os ovos inoculados com placebo via casca (CC) empregando-se solução salina a 0,85%.

Os ovos inoculados na câmara de ar com *Salmonella* Enteritidis (ICA) foram inoculados na câmara de ar. Estes foram desinfetados com solução de iodo a 10% no local da perfuração da casca e, com o auxílio de uma furadeira com broca de calibre um milímetro, perfurou-se a casca. Um conjunto de seringa de tuberculina de 1,0 mL e agulha de calibre 13 X 0,45 mm foi utilizado para inocular 0,1 mL de solução salina a 0,85%, tamponada e esterilizada, contendo $4,2 \times 10^4$ UFC/mL na câmara de ar, num ângulo de 30°. Finalmente, os orifícios foram vedados com parafina histológica. O mesmo procedimento foi realizado com os ovos inoculados na câmara de ar com placebo (CCA), empregando-se solução salina a 0,85%.

Imediatamente após a inoculação na casca e na câmara de ar, os ovos foram acondicionados em seis incubadoras artificiais, modelo IP130 – *Premium* ecológica com capacidade para 80-100 ovos por máquina, viragem automática a cada quatro horas e circulação de ar forçada através de ventilador. A temperatura de incubação foi ajustada para 37,0 a 37,5°C e a umidade relativa para 62 a 68%, de acordo com FRENCH (2005). Para evitar contaminações, os ovos dos grupos controles foram mantidos em sala separada com condições ambientais semelhantes.

Pesquisa de *Salmonella*

Preparação das amostras

A cada semana foram coletados dois ovos por tratamento que foram imediatamente processados.

A casca foi retirada com o auxílio de tesouras e pinças esterilizadas e os fragmentos colocados em placas de Petri para pesagem de 1g em balança de precisão de 0,01 g e posteriormente em tubos de ensaio de 18X180 cm contendo 9 mL de caldo selenito cistina (CS). Os tubos inoculados contendo CS foram incubados a 37°C por 24h.

O mesmo procedimento foi realizado para: albume/líquido alantóide; membranas externas e internas; saco vitelínico/gema; embriões. As amostras obtidas de embriões foram obtidas através de macerado total de todos os órgãos e estruturas.

Identificação de *Salmonella*

A pesquisa de *Salmonella* foi realizada de acordo com o proposto em BRASIL (2003) e GEORGIA POULTRY LABORATORY (1997), com algumas modificações descritas a seguir.

Os fragmentos foram retirados, pesados e incubados em caldo selenito cistina a 37°C por 24h com auxílio de uma alça de níquel-cromo.

Alíquotas do caldo foram plaqueadas por esgotamento em estrias para meios seletivos (ágar MacConkey, Hektoen e ágar verde brilhante) e incubados a 37°C por 24h.

A leitura foi realizada através da seleção de unidades formadoras de colônias (UFC) com características morfológicas de *Salmonella*. De três a cinco UFC por placa foram transferidas para tubos contendo ágar triplice açúcar ferro (TSI) e incubados a 37°C por 24h.

Os tubos de TSI com crescimento sugestivo de *Salmonella* foram submetidos ao teste de urease, produção de indol e H₂S, vermelho metila, motilidade, lisina descarboxilase, teste do malonato e citrato.

Devido à variabilidade antigênica do gênero *Salmonella*, a classificação do sorovar envolvido é bastante laboriosa (BRASIL, 2003). Assim, quando as reações bioquímicas foram compatíveis com *Salmonella*, as amostras foram submetidas ao teste sorológico com soro polivalente anti-O e remetidas à Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) em ágar nutriente para confirmação do sorovar isolado.

Ovoscoopia

Os ovos foram examinados por ovoscoopia após 336 horas de incubação. Aqueles que não apresentarem embriões viáveis foram retirados do processo para determinação do período de mortalidade embrionária e pesquisa de *Salmonella* Enteritidis.

Embriodiagnóstico

Ao final da incubação com 660 horas, os ovos que não apresentaram embriões viáveis foram quebrados para avaliação da fase de desenvolvimento embrionário em que ocorreu a morte do embrião.

O período de mortalidade foi considerado de acordo com as descrições: infértil, o ovo com um denso ponto branco (blastodisco); mortalidade inicial como embriões mortos até sete dias; mortalidade

intermediária como embriões mortos de oito a 22 dias; mortalidade final como embriões mortos de 23 a 28 dias.

Parâmetros 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 multiplicados 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.

Os ovos e os peruzinhos foram pesados para determinação do percentual do peso do peruzinho em relação ao peso do ovo. Esta variável foi calculada pelo peso médio de peruzinhos multiplicado por 100, dividido pelo peso médio do ovo.

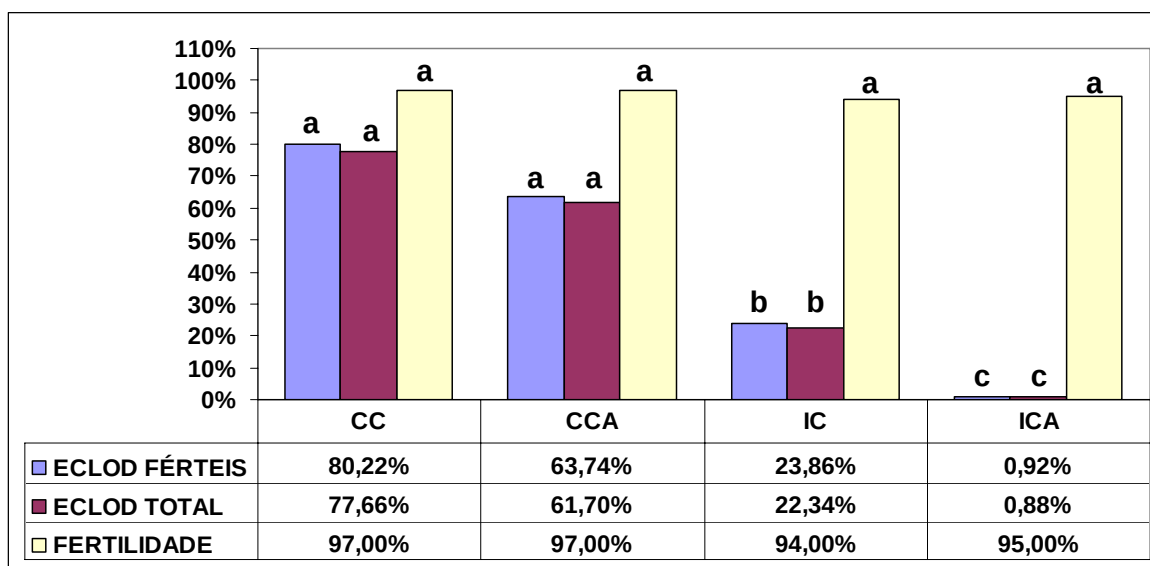
Análises estatísticas

O teste paramétrico do qui-quadrado (χ^2) foi empregado para avaliar a frequência da mortalidade embrionária, rendimento de incubação (fertilidade, eclodibilidade total e de ovos férteis, relação peso do peruzinho pelo peso do ovo) e frequência de isolamento de *Salmonella* Enteritidis nos componentes do ovo e frequência de peruzinhos nascidos infectados (STEVENSON, 1986; SAMPAIO, 2002).

RESULTADOS

Os tratamentos não apresentaram diferenças ($P>0,05$) quanto à fertilidade, como é possível observar na Figura 1. A eclodibilidade total e dos ovos férteis foram diferentes ($P<0,05$) entre os grupos inoculados via casca e via câmara de ar, independente do agente inoculado (placebo ou *Salmonella*).

Com relação à via de inoculação pela casca, não houve diferença ($P>0,05$) entre a frequência dos tratamentos com placebo ou *Salmonella* Enteritidis. Entretanto, quando a inoculação foi pela câmara de ar, notou-se redução da eclodibilidade ($P<0,05$) no tratamento inoculado com *Salmonella* Enteritidis em relação à inoculação de placebo.

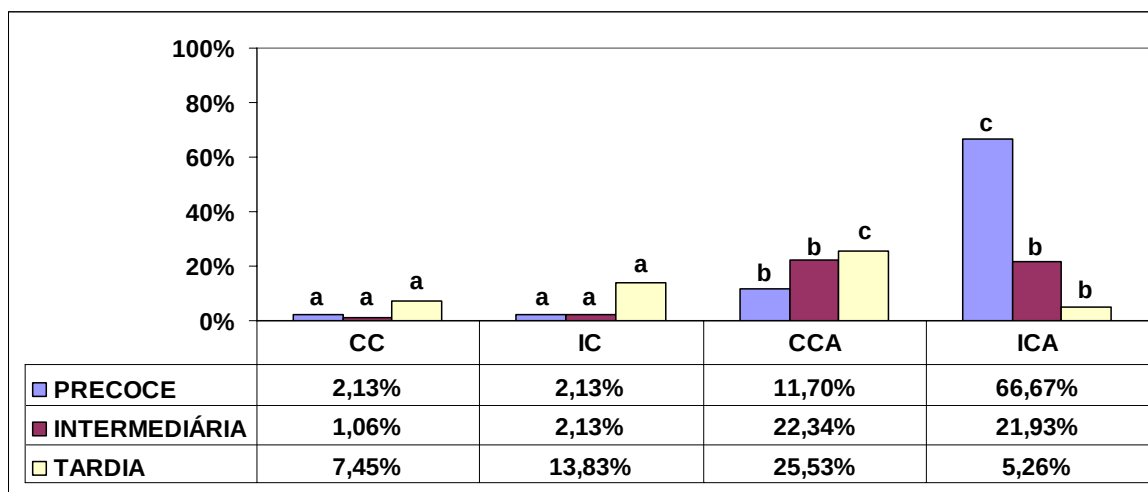


* Letras diferentes nas colunas de mesma cor indicam diferença ($P<0,05$) no teste χ^2 ; cc=ovos inoculados na casca com placebo, ic=ovos inoculados na casca com *Salmonella* Enteritidis, cca=ovos inoculados na câmara de ar com placebo, ica=ovos inoculados na câmara de ar com *Salmonella* Enteritidis.

FIGURA 1 – Fertilidade, eclodibilidade total e de ovos férteis em ovos oriundos de matrizes de perus inoculados com *Salmonella* Enteritidis na casca e na câmara de ar.

Com relação à mortalidade embrionária, não houve diferença ($P>0,05$) entre os tratamentos quando a inoculação foi via casca. Quando *Salmonella* Enteritidis foi inoculada via câmara de ar, as mortalidades precoce e tardia se manifestaram de forma diferente ($P<0,05$) entre os agentes inoculados (Figura 2). A mortalidade precoce foi maior no tratamento inoculado com *Salmonella* e a mortalidade tardia foi maior no tratamento inoculado com

placebo. No entanto, a mortalidade intermediária não diferiu ($P>0,05$) entre os tratamentos inoculados via câmara de ar.



* Letras diferentes nas colunas de mesma cor indicam diferença ($P<0,05$) no teste χ^2 ; cc=ovos inoculados na casca com placebo, ic=ovos inoculados na casca com *Salmonella* Enteritidis, cca=ovos inoculados na câmara de ar com placebo, ica=ovos inoculados na câmara de ar com *Salmonella* Enteritidis.

FIGURA 2 – Mortalidade embrionária de ovos oriundos de matrizes de perus inoculados com *Salmonella* Enteritidis na casca e na câmara de ar.

Para a inoculação na câmara de ar, notou-se que a maioria das amostras e estruturas analisadas (casca, membrana da casca, albume/gema e embrião) foi positiva para *Salmonella* Enteritidis, mostrando que o patógeno se manteve e disseminou para todos os componentes do ovo desde o início da incubação (Tabela 1). Todas as análises dos ovos inoculados na casca com placebo e inoculados na câmara de ar com placebo foram negativas para o patógeno.

TABELA 1 - Frequência de isolamento de *Salmonella* Enteritidis nos componentes de ovos férteis durante a incubação

	VIA DE INOCULAÇÃO			
	Inoculado casca		Inoculado câmara de ar	
Componentes do ovo	número	%	número	%
Casca	7/8	87,50	8/8	100,00
Membrana da casca	3/4	75,00	7/7	100,00
Albume / Gema	1/4	25,00	7/8	87,50
Embrião	1/7	14,29A	7/7	100,00B

* Letras diferentes na mesma linha indicam diferença ($P<0,05$) pelo teste χ^2 .

Na comparação com os ovos que receberam o agente infeccioso na câmara de ar (Tabela 1), notou-se diferença ($P<0,05$) nas análises

bacteriológicas dos embriões em relação aos inoculados na casca, mostrando que a bactéria migrou para os componentes do ovo com mais facilidade quando a via de inoculação foi a câmara de ar.

Verifica-se na Tabela 2 que a relação peso do peruzinho pelo peso do ovo esteve entre 69,31% e 73,43%, porém não houve diferença ($P>0,05$) entre os tratamentos para esta variável.

TABELA 2 - Relação peso médio do ovo / peso médio segundo os tratamentos e a via de inoculação

	CC	CCA	IC	ICA
Peso ovo	86,3	85,9	86,3	85,8
Peso pinto	63,4	61,9	59,8	71,0
Relação (%)	73,4	72,1	69,3	82,7

* Letras diferentes na mesma linha indicam diferença ($P<0,05$) pelo teste χ^2 ; cc=ovos inoculados na casca com placebo, ic=ovos inoculados na casca com *Salmonella* Enteritidis, cca=ovos inoculados na câmara de ar com placebo, ica=ovos inoculados na câmara de ar com *Salmonella* Enteritidis.

Os peruzinhos inoculados com *Salmonella* Enteritidis na casca apresentaram colonização intestinal positiva em 16,22% de peruzinhos eclodidos. Em relação aos ovos inoculados na câmara de ar, o único peruzinho nascido apresentava colonização intestinal positiva. Nos tratamentos controles (CC e CCA) não foram encontradas UFC com características morfológicas, bioquímicas ou sorológicas compatíveis com *Salmonella* Enteritidis (Tabela 3).

TABELA 3 - Resultado bacteriológico de mecônio de peruzinhos inoculados experimentalmente na casca e câmara de ar

Via de inoculação	Número	%
Casca	6/57	16,2
Câmara de ar	1/1	100,0

DISCUSSÃO

No processo de incubação de ovos de perus, altos índices de fertilidade são os objetivos principais da produção de ovos. A determinação da fertilidade é uma tarefa importante para monitorar a performance da equipe de inseminação artificial e determinar a mortalidade precoce (BUT, 2005a). A fertilidade é ainda o parâmetro que reflete o desempenho de todas as etapas do processo, desde a recria de matrizes, ao manejo de produção de ovos, a

nutrição, o padrão tecnológico dos incubatórios e diversos procedimentos de biossegurança (PERDIGÃO, 2008).

No presente ensaio, todos os tratamentos apresentaram altos índices de fertilidade (entre 97% e 94%) adequados para o processo de inseminação artificial na criação de perus. Esses resultados estão de acordo com BUT (2008), que preconiza como meta de fertilidade 91,6% na primeira semana de postura e 95,7% no pico de produção, que ocorre cinco semanas depois do início do manejo de inseminação artificial.

A eclodibilidade total e de ovos férteis inoculados na casca foi semelhante entre os tratamentos ($P>0,05$), embora o agente infeccioso estivesse presente durante todo o processo. Experimento anterior também não indicou alterações nos índices de incubação em matrizes de frangos de corte de linhagens de crescimento rápido e lento inoculados com *Salmonella* Enteritidis pela casca (ANDRADE, 2005).

Com relação à eclodibilidade prevista pela linhagem, os parâmetros encontrados foram inferiores à meta de 78,0% na primeira semana de postura e 87,4% na sexta semana. Essa diferença ocorre pela dificuldade de controle minucioso de temperatura, considerado o fator mais importante para o sucesso de incubação em estágio único (BUT, 2008).

De acordo com FRENCH (2005), durante a primeira semana de incubação a temperatura deve ser alta (37,5°C), mas a partir da segunda semana de incubação, o embrião é mais sensível ao excesso de calor. No 14º dia, o embrião começa a produzir calor que aumenta significativamente nas duas últimas semanas, devendo reduzir o regime de temperatura para 37,0°C.

Para ovos inoculados via câmara de ar, a eclodibilidade foi afetada na inoculação via casca e via câmara de ar. Em experimento realizado por ANDRADE (2005), os índices de incubação foram inferiores em ovos inoculados na cavidade alantóide com placebo ou *Salmonella* Enteritidis, mas os embriões foram capazes de se desenvolver e eclodir. Por outro lado, na inoculação via câmara de ar utilizada neste experimento, a técnica pode ser considerada muito invasiva, interferindo no desenvolvimento embrionário.

Com relação à determinação da mortalidade embrionária, utilizou-se a análise de ovos não eclodidos (embriodiagnóstico) (ERNST et al., 2004). Em bons lotes de incubação, há dois períodos mais importantes de mortalidade

embrionária: três a dez dias e 25 a 27 dias. Alta mortalidade em outros estágios de desenvolvimento pode indicar um problema agudo durante a incubação (BUT, 2005b).

Na inoculação via casca, não foram observadas diferenças de mortalidade embrionária entre os ovos desafiados ou não com *Salmonella* Enteritidis. Entretanto, na inoculação pela câmara de ar, o patógeno determinou 66,67% de mortalidade precoce ($P < 0,05$), o que resultou naturalmente em menores taxas de eclodibilidade de ovos férteis (0,92%) e de ovos totais (0,88%).

A partir destes dados, verificou-se que a câmara de ar demonstrou ser um ambiente propício para o estabelecimento e multiplicação da *Salmonella* Enteritidis. De acordo com LIONG et al. (1997), a ligação entre a membrana externa e interna da casca é tênue e com falhas, permitindo a existência e reprodução de microrganismos nesses espaços. Em relação à penetração bacteriana, as membranas agem como um filtro, no entanto, a resistência das membranas pode ser rapidamente quebrada quando um inóculo com alta concentração bacteriana é usado e, especialmente, quando os ovos são mantidos a 37°C (NASCIMENTO & SALLES, 2003).

A constatação de que *Salmonella* Enteritidis pôde se multiplicar durante a formação do ovo passa a ser ainda mais preocupante do ponto de vista epidemiológico a partir da confirmação da presença do patógeno em amostras de sêmen de perus (DONOGHUE et al., 2004). O manejo preconizado em granjas de matrizes envolvendo a coleta de sêmen em *pools* de vários machos (BUT, 2006), facilita a disseminação da bactéria no plantel a partir desta fonte de infecção.

A bactéria inoculada tanto na casca quanto na câmara de ar permaneceu viável durante todo o período de incubação, migrando para os componentes internos do ovo. Entretanto, os mecanismos de defesa dos ovos foram suplantados em menos 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 vitelino, o líquido alantóide e, ainda poucos embriões foram positivos para *Salmonella* Enteritidis.

Vários fatores podem ter influenciado a penetração do patógeno para os componentes do ovo. 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. 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.

Em relação à migração de *Salmonella* Enteritidis inoculadas via câmara de ar, o patógeno migrou para os componentes do ovo 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 o 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).

Entretanto, a bactéria esteve presente em 100% das amostras de casca, membrana da casca e embrião, indicando que o máximo efeito bactericida do albume é maior somente nos primeiros dias de incubação (SPARKS, 1985). Uma segunda possibilidade é a de que a bactéria pode estar em posição protegida depois de penetrar o ovo. A casca previne que desinfetantes externos alcancem a *Salmonella* nas membranas e estas protegeriam a bactéria de qualquer ação antibacteriana do albume (CASON et al., 1993).

Outro importante indicador do processo de incubação é a avaliação da relação peso peruzinho pelo peso do ovo, determinando a qualidade das aves entregue nas granjas. Tipicamente o percentual de peso do peruzinho/peso ovo está entre 66 a 68%, mas pode ser inferior quando o incubatório utiliza tempo de descanso antes da expedição (BUT, 2005c; BUT,

2005d). No presente estudo, a relação ovo/peruzinho esteve entre 69,31% e 73,43%, indicando que as aves foram retiradas precocemente das incubadoras.

A alta relação peso ovo pelo peso do peruzinho pode ser prejudicial em granjas de crescimento, pois as aves estão menos ativas e mais propensas ao tombamento – aves *flip over* (BUT, 2005d). Entretanto, no presente estudo, as aves passaram por um período de descanso antes do alojamento e não foi observada a ocorrência de peruzinhos *flip over*.

Verificou-se positividade de 16,22% e 100% dos mecônios quando *Salmonella* Enteritidis foi inoculada via casca e via câmara de ar, respectivamente. A colonização intestinal positiva para *Salmonella* Enteritidis ao nascimento confirma a suscetibilidade de perus ao patógeno, o que está de acordo com as observações de BERCHIERI JÚNIOR (2000).

Pelo percentual de positividade encontrado nos componentes do ovo e nos mecônios analisados, pode-se afirmar que o patógeno se disseminou pelo organismo e determinou alta colonização intestinal de peruzinhos que eclodiram. Estes dados estão de acordo com estudos de diversos pesquisadores que isolaram o sorovar em lotes de perus comerciais (HAFEZ & MAZAHARI, 2000; BELI et al., 2001; DONOGHUE et al., 2004).

CONCLUSÕES

A análise da fertilidade, eclodibilidade e relação peso do peruzinho pelo peso do ovo não evidencia a presença de *Salmonella* Enteritidis no incubatório. Por outro lado, a contaminação no incubatório pode ser determinada pela pesquisa de *Salmonella* Enteritidis nos componentes do ovo e no mecônio. O patógeno determina alta colonização intestinal ao nascimento e está presente na casca, membrana da casca, albume/gema e embrião.

A metodologia de inoculação via câmara de ar influenciou a eclodibilidade e a mortalidade embrionária. A inoculação de placebo determinou baixa eclosão e alta mortalidade embrionária tardia, enquanto *Salmonella* Enteritidis determinou baixa eclosão e alta mortalidade embrionária inicial.

REFERÊNCIAS

1. ANDRADE, M. A. **Inoculação de *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar Enteritidis fagotipo 4 em ovos embrionados de duas linhagens de frango de corte.** 2005. 110 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.
2. BARROS, M. R.; ANDREATTI FILHO, R. L.; LIMA, E. T.; SAMPAIO, H. M.; CROCCI, A. J. Sobrevivência de *Salmonella* Enteritidis em ovos contaminados artificialmente, após desinfecção e armazenados em diferentes temperaturas. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Brasil, v. 3, n. 3., p.219-223, 2001.
3. BERCHIERI JUNIOR, A. Salmoneloses aviárias. In: BERCHIERI JUNIOR, A.; MACARI, M. **Doenças das aves**. Campinas: FACTA, 2000. p. 185-195
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**, Estados Unidos, v.53, n.12.,p 651-69, 1990.
7. BRAUN, P.; FEHLHABER, K. Migration of *Salmonella* Enteritidis from the albumen into the yolk. **International Journal of Food Microbiology**, Holanda, v. 25, n.1, p.95-99, 1995.
8. 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, 2003, 226p.
9. BRITISH UNITED TURKEYS. Fertility Testing. **Technical Advice Sheet**, 2005a, p.1-2.
10. BRITISH UNITED TURKEYS. Hatch Breakout Analysis. **Technical Advice Sheet**, Inglaterra, 2005b, p.1-5.
11. BRITISH UNITED TURKEYS. Measuring Egg Water Loss. **Technical Advice Sheet**, Inglaterra, 2005c, p.1-3.
12. BRITISH UNITED TURKEYS. Measuring Poult Yield. **Technical Advice Sheet**, Inglaterra, 2005d, p.1-3.

13. BRITISH UNITED TURKEYS. Artificial Insemination for female. **Technical Advice Sheet**, Inglaterra, 2006, p.1-6.
14. BRITISH UNITED TURKEYS. Breeder Performance Goals for Big9 Parent Female. **Aviagen Turkeys**, Inglaterra, 2008, p.1-5.
15. CASON, J. A.; BAILEY, J.S.; COX, N. A. Location of *Salmonella typhimurium* during incubation and hatching of inoculated eggs. **Poultry Science**, v. 72, n. 11, p.2064-2068, 1993.
16. COX, N. A.; BERRANGE, M. E.; CASON, J. A. *Salmonella* penetration of eggs shells and proliferation in broiler hatching eggs. **Poultry Science**, Estados Unidos, v. 79, n.11, p. 1571-1574, 2000.
17. DONOGHUE, A. M.; BLORE, P. J.; COLE, K.; LOSKUTOFF, N. M.; DONOGHUE, D.J. Detection of Campylobacter or *Salmonella* in turkey semen and the ability of poultry semen extenders to reduce their concentrations. **Poultry Science**, Estados Unidos, v. 83, n.10, p. 1728-1733, 2004.
18. ERNST, R.A.; BRADLEY, F. A.; ABBOTT, U. K. CRAG, R. M. Egg candling and breakout analysis. **ANR University of California**, Estados Unidos, Publication 8134, p. 1-9, 2004.
19. 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 and Infectious Disease**, Inglaterra, v.24, n.4, p.207-216, 2001.
20. FRENCH, N. The egg takes control- the future of the turkey incubation? **Technical Article - British United Turkey**, Inglaterra, p.1-5, 2005.
21. GAST, R. K. Paratyphoid infection. In: CALNEK, B. W. **Diseases of Poultry**, 10 ed. Ames: Iowa University Press, 1997. p. 97-121.
22. GAST, R. K. Paratyphoid infection. In: CALNEK, B. W. **Diseases of Poultry**, 11.ed. Ames: Iowa University Press, 2003. p. 97-121.
23. GAST, R. K.; GUARD-BOULDIN, J.; HOLT, P. S. Colonization of reproductive organs and internal contamination of eggs after experimental infection of laying hens with *Salmonella heidelberg* and *Salmonella enteritidis*. **Avian Diseases**, Estados Unidos, v. 48, n.4, p.863-869, 2004.
24. GEORGIA POULTRY LABORATORY. **Monitoring and detection of Salmonella in poultry and poultry environments**. Oakwood: Georgia Poultry Laboratory, 1997.293p. [Workshop]. GEORGIA POULTRY LABORATORY, 1997

25. GUO, L.; KILLEFER, J.; KENNEY, P. B.; AMICK-MORRIS, J. D. Use of arbitrarily primed polymerase chain reaction to study *Salmonella* ecology in a turkey production environment. **Poultry Science**, Estados Unidos, v. 78, n. 1, p. 24-31, 1999.
26. HAFEZ, H.M.; MAZAHARI, M. Bacteriological investigation on *Salmonella* in meat turkey flocks. In: 4th INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TURKEY DISEASES, 2000, Berlim, **Anais...**, Berlim, German Branch of World Veterinary Poultry Association, 2000, p. 312-313.
27. HUMPREY, T. J. Contamination of eggshell and contents with *Salmonella enteritidis*: a review. **International Journal of Food Microbiology**, Holanda, v. 21, n.1, p. 31-40, 1994.
28. LIONG, J. W. W.; FRANK, J. F.; BAILEY, S. Visualization of eggshell membranes and their interaction with *Salmonella* Enteritidis using confocal scanning laser microscopy. **Journal of Food Protection**, Estados Unidos, v. 60, n. 9, p. 1022-1028, 1997.
29. 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**, Estados Unidos, v.41, n. 1, p.296-303, 1997.
30. MULIARI, R.; ZAVANELLA, M. Influence of temperature on *Salmonella enteritidis* growth in hens' eggs components. **Veterinary Record**, Inglaterra, v.134, n.28, p. 583, 1994.
31. NASCIMENTO, V. P., SALLE, C. P. O ovo. In: MACARI, M., GONZALES, E. (Ed). **Manejo da incubação**. , Campinas: FACTA, 2003 p. 34-50.
32. OLIVEIRA, D.; SILVA, E. N. Salmonela 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.
33. PADRON, M. N. *Salmonella typhimurium* penetration through the eggshell of hatching eggs. **Avian Diseases**, Estados Unidos, v. 34, n. 2, p. 463-465, 1990.
34. PERDIGÃO. Importância da qualidade dos ovos na eclosão. Serviço Rural Perdigão, Brasil, ano XXII, n.106, p. 10, 2008.
35. RUIZ, R. L.; FOLEGATTI, I. S. Microbiologia do ovo. In: RUIZ, R. L. **Microbiologia zootécnica**, 1.ed. São Paulo: Roca, 1995. p. 251-272.
36. SAMPAIO, I. B. M. **Estatística Aplicada à Experimentação Animal**. Belo Horizonte: Fundação de ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2002. 221p.

37. 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.
38. SPARKS, N. H.; BOARD, R. G. Bacterial penetration of the recently oviposited shell of hen's eggs. **Australian Veterinary Journal**, Austrália, v. 62, p. 169-170.
39. STEVENSON, W. J. **Estatística aplicada à Administração**. 2.ed. São Paulo: Harbra Ltda., 1986, 495 p.

CAPÍTULO 3 – AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO, ASPECTOS CLÍNICOS E HISTOPATOLÓGICOS DE PERUS DE UM DIA INOCULADOS EXPERIMENTALMENTE COM *Salmonella* Enteritidis

RESUMO: No presente estudo, 135 perus de corte de um dia oriundos de inoculação via casca e via água de bebida foram avaliados quanto aos efeitos de *Salmonella* Enteritidis em colonizar o trato gastrointestinal, estabelecimento de infecção sistêmica, desenvolvimento de alterações histopatológicas e alteração das variáveis de desempenho. As aves foram distribuídas em três tratamentos (controle, inoculado com *Salmonella* Enteritidis via casca e via câmara de ar) de nove repetições e cinco unidades experimentais por parcela. Aos 10, 20 e 28 dias, as aves foram avaliadas em relação ao desempenho. Após a pesagem, cinco aves de cada tratamento foram necropsiadas para realizar o isolamento bacteriano do intestino, fígado, baço e coração. Foi empregado o teste do qui-quadrado para as variáveis qualitativas e o procedimento Anova para as quantitativas, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey (5%). A colonização intestinal aumentou ($P < 0,05$) durante a fase inicial no tratamento inoculado na casca, mas não no tratamento inoculado na água de bebida. O intestino apresentou maior peso ao primeiro, décimo e 28º dias quando *Salmonella* esteve presente. Por outro lado, não houve diferença ($P > 0,05$) entre os tratamentos em relação ao comprimento do intestino. *Salmonella* Enteritidis foi capaz de colonizar o trato gastrointestinal e estabelecer infecção sistêmica, sendo a recuperação do patógeno maior no fígado, baço e papo. A taxa de mortalidade foi alta durante os primeiros 10 dias de idade, com discretos sinais clínicos ou lesões anatomopatológicas. Conclui-se que a contaminação da casca do ovo antes da incubação gerou aves susceptíveis à infecção ao nascimento e a frequência de isolamento de *Salmonella* Enteritidis persistiu até 28 dias de idade. A inoculação de *Salmonella* pela água de bebida gerou aves infectadas, porém com menor recuperação do patógeno com o aumento da idade. Neste experimento, infecções por *Salmonella* Enteritidis causaram redução de desempenho (menor peso corporal, maior conversão alimentar e menor peso de órgãos) em relação ao tratamento controle, confirmando potenciais prejuízos para a produção avícola mundial.

Palavras-chaves: colonização intestinal, histomorfometria, invasão, *Meleagris gallopavo*, salmonelose.

CHAPTER 3 - ASSESSMENT OF PERFORMANCE, CLINICAL AND HISTOPATHOLOGIC ASPECTS OF DAY OLD TURKEYS INOCULATED WITH *Salmonella* enteritidis

ABSTRACT: In this study, 135 day old turkeys from inoculation via eggshell and via drinking water were evaluated as effects of *Salmonella* Enteritidis in colonization gastrointestinal tract, establishment systemic infection, development pathological changes and modification performance variables. Poults were divided into three treatments (control, inoculated with *Salmonella* Enteritidis via shell and air cell) in five replications of nine experimental units per plot. At 10, 20 and 28 days, turkeys were performance evaluated. After weigh, five birds from each treatment were necropsied to bacterial isolation in intestine, liver, spleen and heart. The χ -square test was employed for qualitative variables and Anova procedure for quantitative variables with averages compared by Tukey test (5%). Intestinal colonization increased ($P<0.05$) during the early phase in treatment inoculated in eggshell, but not in treatment inoculated in drinking water. The intestine showed high weight on first, tenth and 28th days when *Salmonella* was present. Moreover, there was no difference ($P>0.05$) among treatments with regard to length of intestine. *Salmonella* Enteritidis was able to colonize gastrointestinal tract, establish systemic infection. Recovery of the pathogen increased in liver, spleen and crop. The mortality rate was high during first 10 days with mild clinical signs or pathological injuries. It was concluded that eggshell contamination before hatching generated birds susceptible to infection at birth and *Salmonella* Enteritidis isolation persisted until 28 days old. *Salmonella* inoculation via drinking water generated infected birds, but with less recovery of the pathogen with increasing age. In this experiment, infections caused by *Salmonella* Enteritidis reduced performance (lower body weight, higher feed conversion and lower organs weight), comparing with control treatment, confirming potential damage to poultry production worldwide.

Key words: intestinal colonization, histomorphometry, invasion, *Meleagris gallopavo*, salmonellosis.

INTRODUÇÃO

Infecções por *Salmonella* sp. em perus estão distribuídas ubiquamente e resultam em severas perdas econômicas, causando altos custos com erradicação e medidas de controle (KRÜGER et al., 2008). Apesar da taxa de morbidade da salmonelose humana especificamente causada pela carne de perus ser difícil de avaliar (DAVIES et al., 2008), estudos pilotos têm sido desenvolvidos para gerar um banco de dados comparativos entre diversos países (KAESBOHRER et al., 2008).

Na Inglaterra, em 42% dos aviários positivos houve detecção do mesmo sorovar em dois lotes consecutivos mesmo aplicando-se um método intensivo de limpeza e desinfecção no intervalo entre lotes (CARRIQUE-MAS et al., 2008).

Na União Européia, apesar da Resolução 2160/2003 prever a ausência de *Salmonella* Enteritidis e *S. Typhimurium* em 25 gramas de amostra em três anos (ELLERBROEK, 2008), resultados ainda revelaram uma alta prevalência da bactéria em lotes de perus da Alemanha. O isolamento de *Salmonella* sp. foi de 13,7% em 2001, 17,6% em 2002 (HAFEZ, 2006) e estudo mais recente revelou que 10,5% das amostras de lotes de terminação apresentavam 12 diferentes sorovares, incluindo *S. Enteritidis* (KAESBOHRER et al., 2008).

Na América do Norte, em estudos conduzidos no Canadá, 86,7% das amostras ambientais (cama de aviário e poeira) em criações de perus comerciais (IRWIN et al., 1994) e 54% das amostras de ceco de peru coletadas ao abate (ARSENAULT et al., 2007) estavam contaminadas por *Salmonella* sp.. Nas criações comerciais dos Estados Unidos, COX et al. (2000) constataram a presença do patógeno em amostra cecais de até 40% de perus com 15 semanas de idade e SANTOS (2005) encontraram positividade de 70,1% para *Salmonella* sp. em perus com três semanas de idade.

No Brasil, infecções paratíficas em perus são observadas ocasionalmente, mas não têm sido associadas com doença clínica ou mortalidade (BACK, 2008). De acordo com BACK (2002), essas infecções subclínicas são mais preocupantes do ponto de vista da saúde pública, onde as

aves agem como reservatórios para introdução da *Salmonella* sp. na cadeia alimentar do homem.

O estudo da dinâmica microbiana intestinal representa uma importante ferramenta para a determinação da saúde e desempenho das aves, através dos efeitos sobre a morfologia intestinal, nutrição e patogênese de doenças intestinais (LEE et al, 2002).

Apesar do considerável desenvolvimento intestinal de peruzinhos durante a incubação, o órgão ainda é funcionalmente imaturo ao nascimento em termos da capacidade de digestão e absorção (SELL et al., 1991). A maturação do intestino envolve mudanças morfofisiológicas, como aumentos no comprimento do intestino, na altura e densidade dos vilos (MAIORKA, 2001), na superfície e proliferação de enterócitos (FRIEDMAN et al., 2003), produção de enzimas pancreáticas e intestinais, entre outros fatores que preparam a ave para o consumo e utilização de alimentos (TUCKER & TAYLOR-PICKARD, 2004).

Os ensaios morfométricos têm sido utilizados para mensurar os efeitos de patógenos sobre os processos fisiológicos e a capacidade de absorção dos alimentos (REZENDE, 2002; ANDRADE, 2005). A microbiota intestinal é bastante complexa e em conjunto com o epitélio intestinal, agem como uma barreira natural contra bactérias patogênicas. Qualquer distúrbio causado por patógenos pode alterar a permeabilidade desta barreira e afetar a renovação celular (*turnover*), levando a alterações morfológicas e funcionais do intestino (NITSAN, 1995; MAIORKA et al., 2002).

Em perus, o desenvolvimento intestinal imediatamente após a eclosão e até duas semanas de vida tem sido descrito na literatura (UNI et al., 1999; NOY et al., 2001; APPELEGATE et al., 2005), entretanto raramente relacionado com a infecção por *Salmonella* sp. (POTTURI et al., 2005). O estudo de inoculações experimentais do patógeno auxilia na determinação de infecções assintomáticas, assim como a habilidade de colonização intestinal (DHILLON et al., 2001; ANDRADE, 2005).

Por outro lado, em infecções naturais, a epidemiologia e a dinâmica de infecções por *Salmonella* sp. em aves ainda apresenta informações limitadas (CARRIQUE-MAS et al., 2008). Após a infecção oral, *Salmonella* atinge o lúmen intestinal e adere às células epiteliais, constituindo o primeiro

passo para se estabelecer a infecção. Concomitantemente, há indução de mudanças na estrutura da membrana plasmática do epitélio, levando à internalização da bactéria, em um processo chamado invasão. *Salmonella* passa a se multiplicar intracelularmente e devido à inflamação da parede intestinal, macrófagos migram dos vasos sangüíneos para a lâmina própria. Leucócitos realizam a fagocitose, mas diferentemente de outros patógenos, este processo não elimina a *Salmonella* pela presença de substâncias antimicrobianas. Posteriormente, os macrófagos retornam ao vaso sangüíneo e dissemina a bactéria pelos órgãos internos, estabelecendo um quadro de infecção sistêmica (VAN IMMERSEEL et al., 2005).

Os eventos envolvidos na patogênese da salmonelose aviária são determinados por diversos fatores. A habilidade da bactéria em colonizar o TGI parece estar relacionada com a imunidade inata da espécie hospedeira e gama de genes de virulência codificados pelo patógeno (BARROW et al., 1994). A severidade de infecções por *Salmonella* Enteritidis em aves pode ser influenciada pelas condições ambientais, grau de exposição e presença de infecções concomitantes (CHARLES & NAGARAJA, 1994). Finalmente, 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 (DESMIDT et al., 1998).

Em aves experimentalmente infectadas, a presença de *Salmonella* Typhimurium foi detectada principalmente no intestino, fígado e baço, demonstrando a capacidade de disseminação pelo organismo (ENDERSON et al., 1999). Em perus, a invasão de células epiteliais do intestino delgado foi relatada após inoculação *in vitro* de *Salmonella* (POTTURI et al., 2005).

O conhecimento da cinética de invasão da *Salmonella* nos diversos órgãos em inoculações experimentais de perus auxilia na determinação de órgãos de eleição para inferência da prevalência da bactéria nesta espécie avícola, assim como esclarece aspectos epidemiológicos da relação entre a bactéria, hospedeiro e ambiente (HARBAUGH et al., 2006).

Esta afirmação aliada à comprovação da importância da *Salmonella* Enteritidis para a avicultura do estado de Goiás (ROCHA, 2001; REZENDE, 2002) e também pela alta prevalência do sorovar no Brasil (SILVA & DUARTE, 2002), torna imprescindível a avaliação dos efeitos do patógeno na colonização

do trato gastrintestinal, determinação de infecção sistêmica, lesão intestinal e alteração das variáveis de desempenho em perus comerciais.

MATERIAL E MÉTODOS

Locais

O experimento foi conduzido no Setor de Doenças de Aves, no Isolamento do Hospital Veterinário e no Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Medicina Veterinária da Escola de Veterinária (EV) da Universidade Federal de Goiás (UFG).

Delineamento experimental

Foram utilizados 135 perus de corte da linhagem *British United Turkeys* (BUT) que foram distribuídos em delineamento inteiramente casualizado, com três tratamentos de nove repetições e cinco unidades experimentais por parcela.

QUADRO 1 – Delineamento experimental

Tratamento	Via de inoculação	Inóculo
Controle – casca (CC)	Casca	Solução salina a 0,85%
Inoculado – casca (IC)	Casca	4,2 X 10 ⁴ UFC/mL de <i>Salmonella</i> Enteritidis
Inoculado – água de bebida (IA)	Água no bebedouro	4,2 X 10 ⁴ UFC/mL de <i>Salmonella</i> Enteritidis

As aves foram alojadas em baterias aquecidas de aço galvanizado, equipadas com comedouros e bebedouros tipo linear e bandejas para a retirada de excretas. Os grupos controles foram alojados em sala separada dos grupos inoculados, evitando a contaminação entre tratamentos.

Foi utilizada uma lâmpada incandescente de 100 W por andar para manter a temperatura de conforto térmico compatível com a idade. Água e ração foram disponibilizadas *ad libitum*. Foi fornecida ração com ingredientes de origem vegetal a base de milho e farelo de soja, sem antibióticos ou

anticoccidiano, a qual foi elaborada segundo exigências nutricionais preconizadas pela linhagem *British United Turkey Big 9* (BUT, 2006).

Variáveis de desempenho

As aves foram identificadas por um número colocado no tarso-metatarso e pesadas individualmente no primeiro, décimo, 20º e 28º dias de vida. A ração e as sobras encontradas também foram pesadas e constituíram o cálculo das variáveis de desempenho.

As aves foram examinadas durante todos os dias do experimento por duas vezes ao dia, sendo os sinais clínicos anotados. Aquelas que morreram, foram pesadas, necropsiadas e as lesões anotadas em fichas próprias. A mortalidade foi utilizada para a correção do consumo médio de ração e do índice de conversão alimentar.

O consumo de ração foi obtido pela diferença entre os valores de ração oferecida no início e as sobras, corrigidos pela mortalidade. 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.

Biometria de órgãos

A biometria foi realizada com um, dez, 20 e 28 dias. Após a pesagem das aves, cinco aves de cada tratamento foram submetidas ao jejum alimentar por seis a oito horas, sendo posteriormente sacrificadas por deslocamento cervical e necropsiadas. Os intestinos delgado e grosso foram removidos, pesados (g) e medidos os comprimentos das alças intestinais (cm). O saco vitelino, fígado, coração e baço foram removidos e pesados. Os dados referentes aos pesos dos órgãos foram utilizados para calcular o peso relativo dos órgãos ($\text{Peso relativo do órgão} = \text{peso do órgão} \times 100, \text{ dividido pelo peso vivo}$), expresso na unidade de g/100 g de peso vivo.

Exames histopatológico

As amostras de intestino, coração, fígado e baço foram processadas de acordo com a metodologia convencional de LUNA (1968) adotada pelo Laboratório de Histologia da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás. Foram analisadas amostras dos três tratamentos, entretanto não foram processados os órgãos com resultado negativo para isolamento bacteriológico ou sorológico para *Salmonella* Enteritidis.

Cada órgão foi dividido em dois fragmentos, sendo fixado em formalina neutra tamponada a 10% e 9 mL de caldo selenito cistina. Os fragmentos permaneceram 24 h em formalina e posteriormente foram recortados em 5,0 mm de diâmetro para acondicionamento em cassetes.

Com relação ao intestino, três fragmentos de aproximadamente 3,0 cm de comprimento foram retirados das regiões: porção inicial do duodeno, jejuno a dois cm acima do divertículo de Meckel e íleo próximo da junção ileocecal. Água destilada estéril foi afluída gentilmente no interior dos segmentos para remover o conteúdo intestinal. As peças foram seccionadas longitudinalmente, abertas e suas extremidades presas com grampos em um pedaço de madeira. Cada fragmento foi colocado em frascos previamente identificados, contendo formol tamponado a 10%.

Após a identificação, as peças foram lavadas em água corrente para retirada de excessos de pigmentos de formol e posteriormente desidratadas em álcool etílico em série crescente, desde 70% até álcool absoluto.

Posteriormente, foi realizada a clarificação com xilol e impregnação em parafina histológica com ponto de fusão a 56°C. Foram confeccionados blocos de parafina para serem seccionados a 5,0 µm em micrótomo rotativo (AMERICAN-OPTICAL, modelo SPENCER-820), utilizando navalhas descartáveis laminadas.

Os cortes foram colocados para flutuar em água aquecida, de onde foram colocados sobre lâminas de vidro e corados pelo método de hematoxilina-eosina (HE).

As lesões foram classificadas de acordo com a gravidade (acentuada, moderada e discreta) e quanto à distribuição (focal, multifocal e difusa).

Exames histomorfométricos

Os fragmentos de duodeno, jejuno e íleo corados pela HE foram submetidos aos índices morfométricos com o auxílio do 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 digital e a placa de captura.

Em seguida, foi realizada a histometria quantificada em micra, adotando os critérios propostos por UNI et al (1998). A altura do vilo foi medida usando o ápice do vilo até a base da junção do vilo com a cripta. Já a profundidade da cripta foi definida com a profundidade da invaginação da cripta com os vilos adjacentes.

Para cada lâmina foram lidos cinco campos com cinco leituras para altura do vilo e cinco leituras para profundidade da cripta, totalizando 25 leituras de altura de vilosidade e 25 leituras de profundidade de cripta por lâmina. A leitura de foi realizada sempre da direita para a esquerda do corte.

Pesquisa de *Salmonella*

No primeiro, décimo, 20º e 28º dias de vida foram coletadas ao acaso cinco aves por tratamento e encaminhadas para o Laboratório de Doenças de Aves, onde permaneceram em jejum alimentar por no mínimo seis e máximo oito horas. As aves foram sacrificadas por deslocamento cervical e, com auxílio de materiais e equipamentos esterilizados, foram coletadas amostras de saco vitelino, papo, coração, fígado, vesícula biliar, baço, intestino, mecônio/conteúdo cecal e *swab* cloacal.

Com um, 15 e 28 dias de idade foram coletadas amostras de mecônio e/ou excretas de todas as aves por compressão da região dorso-ventral da cloaca ou por *swab* cloacal.

A pesquisa de *Salmonella* foi realizada de acordo com o proposto em BRASIL (2003) e GEORGIA POULTRY LABORATORY (1997), com algumas modificações descritas a seguir.

Aproximadamente 1 g de cada amostra foi transferida para 9 mL de caldo selenito cistina e incubado a 37°C por 24 h. Alíquotas do caldo foram transferidas para os meios seletivos ágar MacConkey, ágar Hektoen e ágar verde brilhante, sendo incubados a 37°C por 24 h.

Três a cinco UFCs com característica morfológicas de *Salmonella* foram transferidas para tubos contendo ágar triplice açúcar ferro (TSI), incubados a 37°C por 24 h.

Tubos de TSI com crescimento sugestivo de *Salmonella* foram submetidos ao teste de urease, indol, motilidade, produção de gás sulfídrico, reação de vermelho metila, malonato, citrato 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 à Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) em meio ágar nutriente para confirmação do sorovar inoculado e recuperado.

Análise estatística

Foi empregado o teste paramétrico do qui-quadrado (χ^2) para avaliar a taxa de mortalidade e a frequência de peruzinhos nascidos infectados entre as duas vias de inoculação pela *Salmonella* Enteritidis (STEVENSON, 1986; SAMPAIO, 2002). Para as análises estatísticas das variáveis quantitativas foi utilizado o programa SAEG (Sistema de Análise Estatística e Genética) com o procedimento *Anova* e as médias foram comparadas pelo teste de *Tukey* com α igual a 5% (EUCLIDES, 1983).

RESULTADOS

Os resultados referentes à análise bacteriológica através do mecônio e das excretas dos peruzinhos podem ser observados na Tabela 1. O mecônio e as excretas dos peruzinhos que receberam placebo foram bacteriologicamente negativos em todas as idades.

TABELA 1 – Isolamento de *Salmonella* Enteritidis em mecônio e swab cloacal de peruzinhos inoculados na casca e água de bebida com um, 15 e 28 dias de idade

Idade (dias)	Inoculado – Casca		Inoculado – Água bebida	
	número	%	número	%
1	6/57	10,5%	-	-
15	14/36	38,9%	7/26	26,9%
28	11/27	40,7%	3/18	16,7%

* Letras diferentes na mesma linha indicam diferença ($P < 0,05$) pelo teste χ^2 .

A via de inoculação não influenciou ($P > 0,05$) a excreção de *Salmonella* Enteritidis no dia da eclosão, aos 15 e 28 dias (Tabela 1). No entanto, observou-se que peruzinhos oriundos de ovos inoculados na casca apresentaram maior frequência de excreção fecal com 15 e 28 dias.

Pelos resultados da Tabela 2, observou-se que a via de inoculação não influenciou ($P > 0,05$) o comprimento do intestino de perus com um, dez, 20 e 28 dias de idade. Quando se analisou o peso relativo do intestino (g/100g de peso vivo), verificou-se que houve diferença ($P < 0,05$) no primeiro, 10º e 28 dias. No primeiro e 10º dias, notou-se maior peso dos intestinos dos perus inoculados com *Salmonella* Enteritidis na casca. Aos 28 dias de idade, o maior peso de intestino foi verificado em perus inoculados com *Salmonella* Enteritidis na água de bebida em relação aos tratamentos controle e inoculado na água de bebida.

TABELA 2 - Peso relativo (g/100 g de peso vivo) do intestino (PI), comprimento do intestino (CI) de peruzinhos com um, dez, 20 e 28 dias de idade

Via de inoculação	1 dia		10 dias		20 dias		28 dias	
	PI	CI	PI	CI	PI	CI	PI	CI
Controle	4,0A	36,0	7,2B	80,2	5,7	131,5	3,9B	100,2
Casca	5,3B	40,9	10,2A	79,7	6,5	93,5	4,0B	110,7
Água	-	-	8,0B	80,9	5,7	105,3	4,6A	116,5

* Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença ($P < 0,05$) pelo teste Tukey 5%.

Os dados de peso relativo (g/100g de peso vivo) do saco vitelino, fígado, coração e baço ao primeiro, 10º, 20º e 28º dias de idade podem ser observados na Tabela 3. Verifica-se que houve diferença ($P<0,05$) no peso do coração aos dez e 28 dias, sendo que as aves inoculadas com *Salmonella* Enteritidis apresentaram menor peso do órgão. Aos 20 dias de idade, o maior peso de fígado foi verificado em perus inoculados com *S. Enteritidis*, independente da via de inoculação. Com relação ao baço, não foi possível realizar a pesagem ao primeiro dia, priorizando-se a análise bacteriológica do órgão.

TABELA 3 - Valores médios do peso relativo (g/100g de peso vivo) dos órgãos (saco vitelino, fígado, coração e baço) de perus com um, dez, 20 e 28 dias de idade

Via de inoculação	Saco vitelino	Fígado	Coração	Baço
1 dia				
Controle	5,1	3,2	1,0	-
Casca	8,4	3,2	0,9	-
Água	-	-	-	-
10 dias				
Controle	0	2,89	0,9A	0,1
Casca	0	4,19	0,8B	0,1
Água	0	3,29	0,8AB	0,1
20 dias				
Controle	0	2,6B	0,6	0,1
Casca	0	3,0A	0,7	0,1
Água	0	2,7A	0,8	0,1
28 dias				
Controle	0	2,1	0,7A	0,1
Casca	0	2,0	0,6AB	0,1
Água	0	2,5	0,6B	0,1

*Letras diferentes na mesma coluna e mesma idade indicam diferença ($P<0,05$) pelo teste Tukey 5%.

Observou-se na Figura 1 que nas aves inoculadas com *Salmonella* Enteritidis na casca do ovo, o patógeno foi recuperado em 87,50% (14/16) dos papos, em 68,75% (11/16) dos fígados, em 64,29% (9/14) dos baços, 60,00% (3/5) dos sacos vitelinos, em 43,75% (7/16) dos cecos, em 41,67% (5/12) dos swabs cloacais e 31,25% (5/16) dos corações.

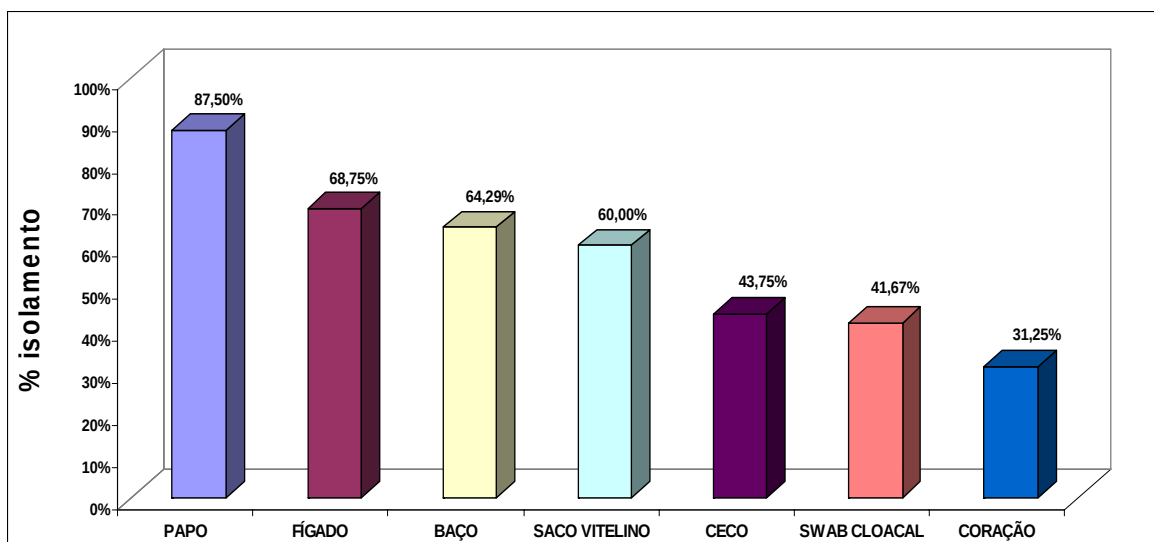


FIGURA 1 – Frequências de isolamentos de *Salmonella* Enteritidis ao primeiro, décimo, 20º e 28º dias de idade em órgãos de perus de corte oriundos de ovos inoculados na casca.

Quando *Salmonella* Enteritidis foi inoculada na água de bebida, o patógeno foi recuperado em 83,33% (10/12) dos fígados, em 83,33% (10/12) dos baços, em 75,00% (9/12) dos papos, 58,33% (7/12) dos cecos, em 50,00% (6/12) dos swabs cloacais e 33,33% (4/12) dos corações.

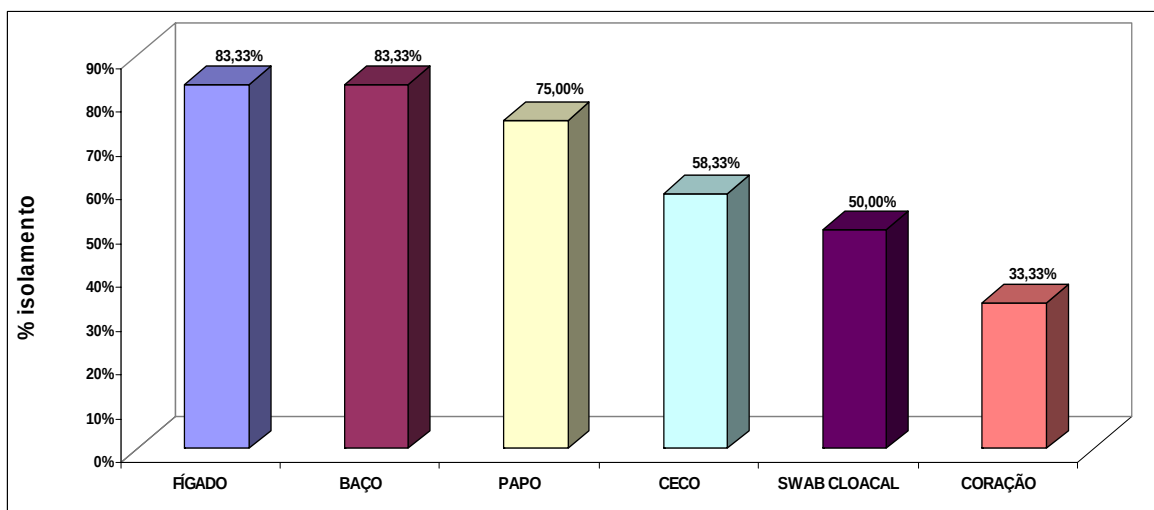


FIGURA 2 - Frequências de isolamentos de *Salmonella* Enteritidis ao primeiro, décimo, 20º e 28º dias de idade em órgãos de perus de corte inoculados via água de bebida.

Notou-se que, dos 28 conteúdos de cecos analisados, 14 (50%) foram positivos para *Salmonella* Enteritidis (Tabela 4).

TABELA 4 – Isolamento de *Salmonella* Enteritidis em conteúdo cecal de perus

com um, dez, 20 e 28 dias de idade

Via de inoculação	Idade (dias)			
	1	10	20	28
Casca	4/4	1/4	0/4	2/4
Água	-	3/4	2/4	2/4
Total positivo	4/4	4/8	2/8	4/8

Da análise dos resultados histopatológicos sumarizados no Quadro 1, observou-se que, no fígado, a inflamação consistiu de infiltrado inflamatório heterofílico (Figura 3) com severa congestão. No intestino foi observada descamação de ápice de vilosidade, hiperemia, infiltrado inflamatório mononuclear (Figura 4) e heterofílico. Os achados histopatológicos foram escassos e em várias idades não foi possível observar alterações histológicas.

QUADRO 1 – Principais alterações histopatológicas observadas em órgãos de perus de corte inoculados via casca e via água de bebida com *Salmonella* Enteritidis e sacrificados aos um, dez, 20 e 28 dias

Órgãos	Idade (dias)						
	1	10		20		28	
	IC	IC	IA	IC	IA	IC	IA
Coração	P**	-	-	-	-	-	P*
Fígado	C***	C***	-	C***	-	C*	IIH*
Duodeno	-	D*	D*	D*	D*; IIM*	IIM*	D*
Jejuno	H*	H*	-	-	D*	-	-
Íleo	H*	-	-	-	D*	-	IIH*, D*

IC=inoculados na casca; IA=inoculados na água de bebida. - = sem alteração histológica; P = pericardite transmural; C = congestão; D = descamação de ápices de vilosidades; H = hiperemia; IIM = infiltrado inflamatório mononuclear; IIH= infiltrado inflamatório heterofílico. * Discreto, ** Moderado, *** Severo.

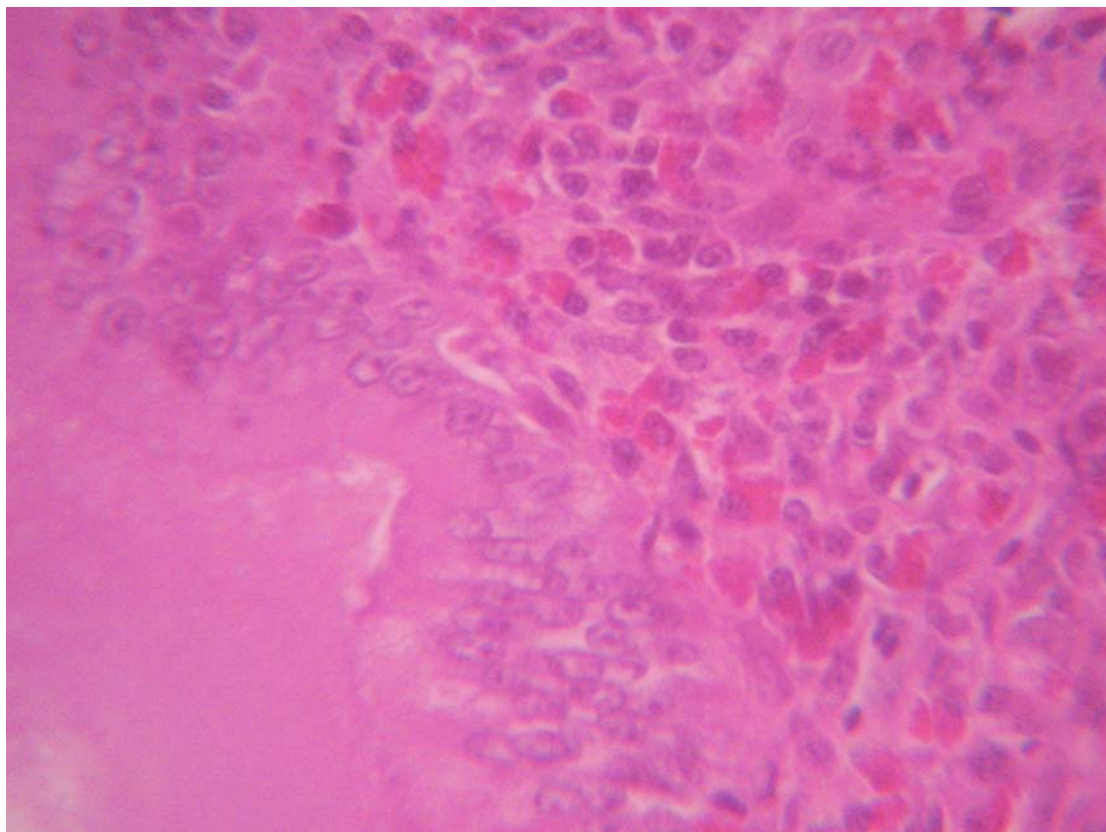


FIGURA 3 – Lesão histopatológica no fígado. Infiltrado inflamatório heterofílico.

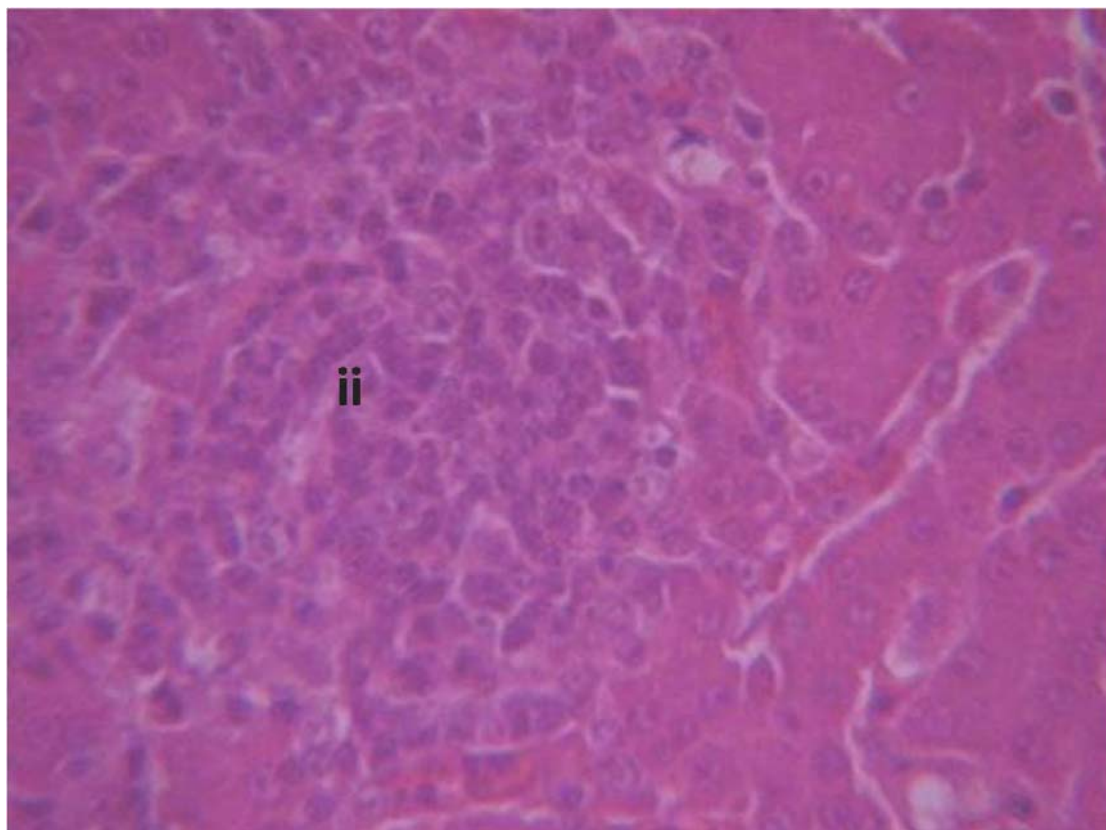


FIGURA 4 – Lesão histopatológica no fígado. ii = Infiltrado inflamatório mononuclear.

As alturas de vilos do duodeno (Tabela 5) diferiram ($P<0,05$) entre os tratamentos em todas as idades. Observou-se valores maiores ($P<0,05$) no primeiro quando *Salmonella* foi inoculada na casca e no 10º dia quando o patógeno foi inoculado via água. Aos 20 dias, as aves não desafiadas apresentaram alturas de vilos maiores ($P<0,05$) que as aves inoculadas via água de bebida, enquanto a inoculação via casca foi inferior ($P<0,05$) aos demais tratamentos. Entretanto, esta diferença ($P<0,05$) pôde ser observada no 28º dia de idade, quando os tratamentos controle e inoculado na água diferiram do tratamento inoculação pela casca.

Por outro lado, quando a variável estudada foi a profundidade de cripta, verificou-se um valor mais alto, com diferença ($P<0,05$) no primeiro dia nos perus originados das inoculações com *Salmonella* Enteritidis na casca do ovo e no 28º dias quando a bactéria foi inoculada na água de bebida. No 10º e 20º dias, *Salmonella* Enteritidis influenciou ($P<0,05$) a profundidade das criptas duodenais independente da via de inoculação.

TABELA 5 - Alturas dos vilos (AV) e profundidade de cripta (PC) do duodeno (μm) de perus de corte de um a 28 dias de idade

Vias de inoculação	AV				PC			
	1 dia	10 dias	20 dias	28 dias	1 dia	10 dias	20 dias	28 dias
Controle	494,7B	804,8C	1133,6A	1143,7A	80,3B	140,5B	147,8B	120,2C
Casca	634,8A	860,3B	831,9C	1149,6B	128,6A	152,4A	218,7A	175,9B
Água	-	966,1A	955,9B	945,7A	-	146,8A	230,9A	195,6A

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

Como demonstrado na Tabela 6, as alturas dos vilos do jejuno foram significativamente maiores ($P<0,05$) nas aves que não foram desafiadas com *Salmonella* Enteritidis. No 20º dia, o excesso de artefatos impossibilitou a leitura do tratamento controle e as aves oriundas da inoculação via casca apresentaram valores maiores ($P<0,05$) de altura de vilos em relação às aves inoculadas via água.

O patógeno inoculado na casca dos ovos provocou aumento da profundidade de criptas ($P<0,05$) nos dias um, 20 e 28.

TABELA 6 - Alturas dos vilos (AV) e profundidade de cripta (PC) do jejuno (μm) de perus de corte de um a 28 dias de idade

Vias de inoculação	AV				PC			
	1 dia	10 dias	20 dias	28 dias	1 dia	10 dias	20 dias	28 dias
Controle	414,1A	708,3A	-	957,8A	84,7B	117,6	-	178,4B
Casca	360,1B	533,5B	676,6A	504,2C	109,7A	137,4	261,2A	479,3A
Água	-	448,6C	382,2B	676,3B	-	118,6	199,2B	141,8B

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

Os valores médios das alturas de vilos e profundidade de criptas dos íleos estão demonstrados na Tabela 7. No 10º dia, aves oriundas de ovos inoculados com *Salmonella* Enteritidis via casca apresentaram valores maiores ($P<0,05$) de altura de vilosidade. Entretanto, nas medições seguintes, com 20 e 28 dias, peruzinhos oriundos da inoculação via casca obtiveram resultados inferiores ($P<0,05$) ao grupo controle e inoculado via água de bebida. Aos 20 dias, os valores médios da altura dos vilos foram maiores ($P<0,05$) no grupo controle e inoculado via água de bebida e aos 28 dias, o desenvolvimento foi maior ($P<0,05$) nas aves controles.

Notou-se que a maior profundidade de criptas ($P<0,05$) ocorreu no primeiro e 28º dias quando *Salmonella* Enteritidis foi inoculada através da casca e no 20º dia quando o patógeno foi fornecido às aves na água de bebida (Tabela 6).

TABELA 7 - Alturas dos vilos (AV) e profundidade de cripta (PC) do íleo (μm) de perus de corte de um a 28 dias de idade

Vias de inoculação	AV				PC			
	1 dia	10 dias	20 dias	28 dias	1 dia	10 dias	20 dias	28 dias
Controle	349,1	561,5B	612,8A	799,1A	130,7B	-	162,6B	224,6B
Casca	311,7	691,2A	351,8B	505,4C	159,9A	-	214,1B	351,6A
Água	-	358,6C	605,6A	683,4B	-	-	411,3A	230,1B

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

Observou-se que a inoculação de *Salmonella* Enteritidis influenciou o peso médio de perus ao primeiro, 10º e 20º dias de idade ($P<0,05$), sendo que aqueles que foram inoculados via casca apresentaram menor desempenho para essa variável (Tabela 8) em relação aos outros tratamentos.

TABELA 8 - Peso médio de perus de corte ao primeiro, décimo, 20° e 28° dia de idade

Vias de inoculação	1° dia	10° dia	20° dia	28° dia
Controle	63,95A	210,15A	548,98A	977,47
Casca	60,07B	154,49B	438,64B	811,67
Água	62,41A	187,14A	472,70AB	927,62
CV(%)	3,11	12,65	12,69	16,98

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

A conversão alimentar (Tabela 9) diferiu ($P < 0,05$) entre os tratamentos aos dez dias de idade, constatando-se piora quando a via de inoculação de *Salmonella* Enteritidis utilizada foi a casca do ovo.

TABELA 9 - Conversão alimentar de perus de corte ao décimo, 20° e 28° dia de idade

Vias de inoculação	10° dia	20° dia	28° dia
Controle	1,12A	1,55	1,74
Casca	1,46B	1,55	2,16
Água	1,26A	2,14	1,46

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

A frequência de mortalidade entre os tratamentos durante os 28 dias de idade (Tabela 10) apresentou diferença ($P < 0,05$). Enquanto 17,78% e 28,89% das aves oriundas da exposição experimental de *Salmonella* Enteritidis na casca do ovo e na água de bebida, respectivamente, morreram nos primeiros dez dias, nenhuma ave morreu no tratamento controle durante este período. Já na segunda e terceira dezenas de idade, não houve diferença ($P > 0,05$) entre os tratamentos.

TABELA 10 – Frequência de mortalidade atribuída a *Salmonella* Enteritidis em perus de corte experimentalmente inoculados

Idade (dias)	VIA DE INOCULAÇÃO		
	Controle	Casca	Água
1 – 10	0 (0/45)A	17,78% (8/45)B	28,89% (13/45)B
11 – 20	0 (0/45)	0 (0/34)	7,14% (1/28)
21 – 28	0 (0/45)	0 (0/30)	0 (0/24)
Acumulada	0 (0/45)A	17,78% (8/45)B	31,11% (14/45)B

Letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente pelo teste χ^2 .

Em todas as aves mortas, *Salmonella* Enteritidis pôde ser isolada no mínimo em um dos órgãos analisados. Entretanto, em nenhuma ave morta foram encontrados achados macroscópicos.

Os sinais clínicos registrados podem ser visualizados na Tabela 11. O desenvolvimento corporal das aves inoculadas foi desigual (Figura 4). A sonolência e a cloaca suja foram os sinais clínicos mais freqüentes na inoculação via casca. Por outro lado, na inoculação de *Salmonella* Enteritidis pela água de bebida, as aves morreram sem sinais clínicos, ou apresentaram somente apatia e cloaca suja.

TABELA 11 – Sinais clínicos observados em perus de corte inoculados com *Salmonella* Enteritidis

Sinais clínicos	VIA DE INOCULAÇÃO	
	Casca	Água
Mortas sem sinais	6,7% (3/45)	22,2% (10/45)
Asas caídas	2,2% (1/45)	0,0%
Apatia	6,7% (3/45)	6,7% (3/45)
Sonolência	24,4% (11/45)	0,0%
Cloaca suja	24,4% (11/45)	11,1% (5/45)
Emplastramento de cloaca	15,6% (7/45)	0,0%



FIGURA 4 – Sinais clínicos de desenvolvimento desigual (A) e emplastramento de cloaca (B)

Na maioria das aves que manifestaram sinais clínicos, verificou que essas se recuperaram no decorrer do experimento, podendo-se afirmar que se recuperaram clinicamente.

À necropsia, foram detectadas alterações no saco aéreo, compatível com aerossaculite discreta – aspecto espumoso, sem formação caseosa – em apenas quatro aves (4,4%; 4/90), sendo 75,0% em aves inoculadas na casca e 25,00% em aves inoculadas na água de bebida. Em todas as amostras de sacos aéreos alterados foi possível confirmar o isolamento bacteriológico e a sorotipagem do sorovar Enteritidis.

O saco vitelínico foi o órgão mais afetado, onde a onfalite e a persistência do saco da gema foram os achados macroscópicos predominantes em 22,2% (10/45) das aves inoculadas via casca e em 6,7% (3/45) dos perus que receberam *Salmonella* Enteritidis via água de bebida.

DISCUSSÃO

O contato com bactérias do ambiente permite que a ave desenvolva sua microbiota intestinal dentro dos primeiros dias após a eclosão (TUCKER & PICKARD, 2004). Ao nascimento, 10,53% dos peruzinhos oriundos da inoculação via casca foram susceptíveis à infecção por *Salmonella* Enteritidis. A constatação de que o sorovar é mais freqüente em galinhas que em perus (BACK & OLIVEIRA, 2006) é complementada por estudo realizado por ANDRADE (2005), que encontrou positividade de 63,33% em frangos de corte oriundos da inoculação via casca.

A via de inoculação na casca incrementou a colonização intestinal por *Salmonella* Enteritidis até o 28º 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 de frangos de corte no período de um a sete dias de idade.

Estudos realizados em perus indicam um período mais longo de excreção de *Salmonella* sp.. CHARLES et al. (1994) não isolaram *Salmonella* Enteritidis de amostras de swab cloacal no primeiro dia após desafio, apesar de alta taxa de isolamento ser mantida nas quatro semanas seguintes (60%, 67%, 56% e 44%, respectivamente). HOOVER et al. (1997) afirmaram que uma vez os níveis de *Salmonella* tenham aumentado devido a excreção do microrganismo no ambiente, uma maior quantidade de *Salmonella* pode ser descarregada no ar através da movimentação das aves e trabalhadores.

No presente estudo notou-se ainda que a taxa de recuperação do patógeno diminuiu no decorrer do experimento na inoculação pela água de bebida. Resultados semelhantes foram observados por BARROW (1991), quando pintos de corte recém eclodidos foram inoculados com *Salmonella* Enteritidis e observou-se que a excreção diminuiu com o tempo e persistiu até oito semanas.

Peruzinhos recém eclodidos são mais susceptíveis à colonização por *Salmonella* que aves mais velhas devido à imaturidade da microflora intestinal. A microflora intestinal não está estabelecida no intestino delgado até aproximadamente duas semanas após a eclosão, entretanto pode levar mais

de quatro semanas para o desenvolvimento da microflora dentro do ceco (HOOVER et al., 1997).

Uma segunda hipótese pode estar relacionada ao desenvolvimento do sistema imune. Ao inocular o patógeno no primeiro dia de idade, *Salmonella* Enteritidis encontraria respostas imunes sistêmicas e locais formadas (BERTHELOT-HÉRAULT et al., 2003), tornando o organismo mais adverso à colonização intestinal que na inoculação *in ovo*. Esta hipótese poderia ser comprovada através de análises sorológicas das aves nos tratamentos inoculados após o nascimento, após a inoculação na água de bebida e no decorrer da fase inicial.

Pelo exame biométrico do intestino, verifica-se que o maior peso de intestino ocorreu aos dez dias de idade, como descrito por SELL et al. (1991) e UNI et al. (1999). O peso do intestino aumenta paralelamente ao peso corporal até a eclosão, passando a aumentar mais rapidamente que a massa corporal após o nascimento. Este rápido crescimento relativo do intestino delgado é máximo em seis a oito dias para peruzinhos (SELL et al., 1991). Em contraste, outros órgãos digestivos como moela e pâncreas não demonstram melhoria do tamanho relativo (UNI et al., 1999).

Perus inoculados com *Salmonella* Enteritidis apresentaram peso relativo de intestino maior com um, dez e 28 dias de idade. Estes dados foram respaldados por ANDRADE (2005) que encontrou valores maiores com um, 14 e 21 dias também em aves desafiadas. Este maior peso relativo pode ser explicado pelo estímulo antigênico da *Salmonella* Enteritidis no intestino no primeiro dia de idade (ANDRADE, 2005). De acordo com NOY & SKLAN (1997), a presença de qualquer material exógeno no TGI é suficiente para estimular a atividade e o desenvolvimento da mucosa intestinal.

Por outro lado, pela análise do comprimento do intestino, não foram observadas diferenças ($P>0,05$) entre os tratamentos. Estes dados poderiam ser melhor explorados através da pesagem individual de segmentos intestinais (duodeno e jejuno) como apresentado em estudos anteriores (SELL et al., 1991; APPLEGATE et al., 2005; POTURRI et al., 2005).

Pelo exame biométrico do saco vitelino, fígado, coração e baço foi possível verificar que as aves desafiadas com *Salmonella* Enteritidis

apresentaram pesos menores de coração aos dez e 28 dias, possivelmente pela influência do patógeno na dinâmica do desenvolvimento deste órgão.

Comparando o desenvolvimento dos órgãos nas diferentes idades, observou-se que o peso relativo do fígado e coração foram maiores no primeiro dia de idade, correspondendo às observações de SELL et al. (1991). O pâncreas, intestino delgado, fígado e conteúdo do intestino delgado aumentam mais rapidamente que o peso corporal. O crescimento alométrico (definido como a relação entre o aumento do peso do órgão e o aumento do peso corporal) enfatiza a importância destes órgãos supridores (TGI, fígado, pulmão e coração) durante o crescimento inicial e confirma que o processo digestivo não está completamente desenvolvido no peruzinho recém-eclodido (SELL et al, 1991).

Ao se comparar os exames histomorfométricos dos segmentos do intestino avaliados, as alturas das vilosidades no duodeno e no jejuno aumentaram rapidamente com a idade e esses segmentos cresceram em paralelo e mais rapidamente que o íleo, conforme descrito por UNI et al. (1999).

No duodeno, *Salmonella* Enteritidis promoveu aumento da altura de vilosidade até dez dias de idade, sendo sobrepujado pelo tratamento controle aos 20 dias e igualando-se aos 28 dias ao tratamento inoculado na casca. Por outro lado, a profundidade de cripta se manteve maior nos tratamentos onde o patógeno esteve presente, exceto no 20º dia. Dados deste trabalho sugeriram que esses aumentos foram diretamente relacionados com a renovação das células epiteliais (*turnover*) 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.

As alterações histomorfométricas observadas no jejuno demonstram que o tratamento controle alcançou índices superiores de altura de vilos em todas as idades, exceto aos 20 dias, onde não foi possível realizar a leitura das lâminas histológicas pela descamação nos ápices das vilosidades nos

fragmentos processados. Com relação à profundidade de cripta, observa-se que a inoculação de *Salmonella* Enteritidis aumentou significativamente ($P < 0,05$) essa variável no primeiro, 20º e 28º dias.

MACARI & MAIORKA (2000) relataram 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 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 perda celular, ocorrerá conseqüentemente aumento na produção de células da cripta e na profundidade de cripta.

No presente estudo, os hospedeiros reagiram de forma semelhante aos estímulos na mucosa do duodeno e íleo, havendo aumento na altura dos vilos deste fragmento no tratamento controle aos 20 e 28 dias com aumento da profundidade de cripta nas aves inoculadas com *Salmonella* Enteritidis. Esta hiperplasia de criptas provavelmente resulta da atividade metabólica compensatória à destruição celular (ROSE et al., 1992) e estão relacionados com a recuperação da integridade intestinal, que demora de 90 a 96 horas para se completar (FURLAN et al., 2004).

Para UNI et al. (1999), há um aumento progressivo na área de absorção e na capacidade de hidrólise da mucosa intestinal de perus. Foi observado rápido desenvolvimento morfológico depois da eclosão com diferentes taxas de aumento no volume das vilosidades do duodeno, jejuno e íleo. O aumento da profundidade da cripta com a idade foi maior no duodeno e menor no íleo. As criptas do intestino delgado crescem rapidamente no período pós-eclosão, aumentando em número de células e em tamanho à medida que ocorreram as ramificações.

Salmonella Enteritidis foi recuperada em órgãos coletados de perus aparentemente saudáveis com um, dez, 20 e 28 dias de idade. Nas amostras de ceco analisadas, 43,75% e 58,33% foram bacteriologicamente positivas nas inoculações via casca e via água de bebida, respectivamente. Paralelamente, em 41,67% e 50,00% das amostras de swab cloacal foi realizado o isolamento do patógeno.

COX et al. (2001) desafiaram perus de três dias com 10^4 UFC de *Salmonella* Typhimurium e encontraram positividade de 46,7% em amostras conteúdo cecal quando as aves estavam com seis semanas de idade. Em estudo realizado por ROSTAGNO et al. (2006), amostras de *swab* cloacal não foram eficientes em identificar aves positivas, com sensibilidade de 36,7%. *Salmonella* foi isolada em 24,4% dos conteúdos cecais e 12,3% dos conteúdos cloacais.

Na análise histológica do intestino, os achados patológicos foram: descamação de ápice de vilosidades, hiperemia, infiltrado inflamatório mononuclear e heterofílico. Em amostra de ceco de frangos de corte, GORHAM et al. (1994) detectaram *debris* necróticos, infiltrados de heterófilos, macrófagos e aglomerados de bactérias, entretanto, diversos pesquisadores encontram predominantemente infiltrados inflamatórios mononucleares (DESMIDT et al., 1997; DESMIDT et al., 1998; DHILLON et al., 2001; VAN IMMERSEEL et al., 2002; ANDRADE, 2005).

No baço, a recuperação de *Salmonella* Enteritidis ocorreu em 64,29% e 83,33% das amostras dos tratamentos na casca e água de bebida, respectivamente. ROSTAGNO et al. (2006) demonstraram que a prevalência de 15% do patógeno no baço em lotes comerciais de perus naturalmente infectados.

Apesar da alta frequência de isolamento, não foi possível observar lesões histológicas. A idade parece influenciar o número de bactérias translocadas para o baço, onde há uma redução significativa no número cinco dias após a alimentação (POTTURI et al., 2005).

Com relação à patogênese hepática, foi possível observar que *Salmonella* Enteritidis foi recuperada de 75% das amostras de fígado em perus de um dia de idade. Em infecções por *S. arizonae*, o patógeno foi isolado do saco vitelino, fígado, saco aéreo, cérebro, olho e intestino (GENOVESE et al., 1998). Por outro lado, ROSTAGNO et al. (2006), avaliando lotes de perus comerciais a idade de abate, encontrou prevalência de *Salmonella* em 3,3% no fígado.

Histologicamente, a inflamação do fígado consistiu de infiltrado inflamatório mononuclear e congestão severa. Em frangos de corte, o infiltrado inflamatório mononuclear também foi observado, acompanhado de necrose de

hepatócitos e hiperemia (ANDRADE, 2005). Já em infecções severas por *S. arizonae* em perus, lesões hepáticas constituíram necrose multifocal de hepatócitos com leve a moderada infiltração de linfócitos e macrófagos randomizados (CRESPO et al., 2004).

Em 31,25% dos corações de frangos de corte de linhagem de crescimento rápido, a bactéria foi recuperada (ANDRADE, 2005). Resultados semelhantes foram encontrados no presente estudo, onde 31,25% e 33,33% das amostras de coração da inoculação via casca e via água de bebida, respectivamente foram bacteriologicamente positivos para *Salmonella* Enteritidis.

No coração foi observada pericardite com um e 28 dias. GORHAM et al. (1994), DESMIDT et al. (1997), DHILLON et al. (1999) também detectaram inflamação do pericárdio, principalmente de heterófilos, macrófagos e linfócitos, respectivamente em frangos de corte.

Salmonella Enteritidis foi recuperada em 87,50% dos papos da inoculação via casca e 83,33% dos papos da inoculação via água de bebida. Em perus de corte naturalmente infectados, 9,4% dos papos obtiveram resultados positivos para o patógeno (ROSTAGNO et al., 2006).

O isolamento do patógeno no papo pode ser atribuído ao jejum de seis a oito horas a que as aves foram submetidas. Esta possibilidade também foi apontada por HUMPHREY et al. (1993) que relataram alta frequência de *Salmonella* Enteritidis recuperada do papo após 24 h de privação de alimentos.

O menor ganho de peso médio do tratamento inoculado na casca ao primeiro, dez e 20º dias podem ser atribuídos à presença do agente infeccioso no TGI, provocando alterações histomorfométricas nos vilos e criptas à eclosão até os 28 dias de idade. Esta ação perniciosa sobre a mucosa pelo patógeno afetou a digestão e a absorção adequadas dos nutrientes, pois ocorreram perdas de peso médio aproximado de 6,07%, 26,49% e 20,50% com um, dez e 20 dias, respectivamente, para os perus inoculados com *Salmonella* Enteritidis.

Essa redução no desempenho também foi observada em frangos de corte. GORHAM et al. (1994), DHILLON et al. (1999) e ANDRADE (2005) encontraram aves com ganho de peso em inoculações com *Salmonella* Enteritidis.

O peso médio observado ao nascimento (60,07 a 63,95 g) foi semelhante aos dados de estudos anteriores. SELL et al. (1991) encontraram pesos de $64,8 \pm 6,9$ g, enquanto APPLEGATE et al. (2005) encontraram variação de 62,19 a 65,63 g no peso corporal de peruzinhos à eclosão. POTTURI et al. (2005), avaliando os efeitos do descanso no desenvolvimento intestinal obteve peso médio de 59 g em perus recém eclodidos e de 120,5 g aos sete dias de idade.

Com dez, 20 e 28 dias, pode-se afirmar que os pesos médios foram abaixo das recomendações da linhagem, exceto no tratamento controle. É possível verificar variação entre lotes sexados, entretanto o peso médio recomendado é de 210 g com dez dias, 540 a 620 g com 20 dias e 950 a 1.130 g com 28 dias (BUT, 2006b).

Os valores de conversão alimentar do tratamento controle e inoculado na casca foram diferentes, provavelmente pelas lesões nas células epiteliais do intestino causadas pela *Salmonella* Enteritidis até os 28 dias. A recomendação da linhagem para conversão alimentar é de 0,93 a 0,98 na primeira semana; 1,22 a 1,26 na segunda semana; 1,35 a 1,42 da terceira semana e 1,44 a 1,55 na quarta semana (BUT, 2006b).

A frequência de mortalidade nos tratamentos inoculados na casca e na água de bebida foi elevada nos primeiros dez dias de idade, podendo-se inferir que as aves se infectaram, enquanto nenhuma ave no tratamento controle veio a óbito durante o período experimental.

Inoculações experimentais por diversas vias têm apresentado altos índices de mortalidade na primeira semana de idade em frangos de corte, com variação entre 5 a 36,66% (GAST & BENSON, 1995; DHILLON et al., 1999; 2001; FERNÁNDEZ et al., 2001).

Apesar da capacidade invasiva de *Salmonella* Enteritidis e a presença do patógeno em órgãos internos, as alterações histológicas não resultaram em severas alterações macroscópicas. *Salmonella* Enteritidis pôde ser isolada de quatro sacos aéreos em processo inflamatório e os achados anatomopatológicos predominantes foram a onfalite e a persistência do saco da gema. Esses dados aliados à recuperação clínica na maioria das aves comprovam a importância de perus como portadores de *Salmonella* Enteritidis.

Estudos realizados por BARROW (1991), GORHAM et al. (1991,1994), DESMIDT et al. (1997), DHILLON et al. (1999, 2001) mostraram achados de onfalite e aerossaculite, 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 aerossaculite em pintos infectados naturalmente infectados, mas detectaram também a ocorrência de esplenomegalia, pericardite, perihepatite e nefrite.

No presente estudo, notou-se que os sinais clínicos gerais foram compatíveis com um quadro septicêmico aliado a distúrbios do trato gastrointestinal. A sonolência e a cloaca suja foram os sinais clínicos mais frequentes na inoculação via casca. Por outro lado, na inoculação de *Salmonella* Enteritidis pela água de bebida, as aves morreram sem sinais clínicos, ou apresentaram somente apatia e cloaca suja.

Em experimento realizado por CHARLES et al. (1994), perus desafiados com *Salmonella* Enteritidis não apresentaram sinais de doença. 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 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).

CONCLUSÕES

A contaminação da casca do ovo antes da incubação gerou aves susceptíveis à infecção ao nascimento e a frequência de isolamento de *Salmonella* Enteritidis persistiu até 28 dias de idade. A patogênese da infecção envolveu a colonização intestinal e disseminação para os órgãos internos (papo, fígado, baço e coração).

Por outro lado, a contaminação de perus pela água contaminada, que simularia a contaminação no galpão de criação, gerou aves infectadas, porém com menor recuperação do patógeno com o aumento da idade.

Na criação de perus, infecções por *Salmonella* causaram redução de desempenho (menor peso corporal, maior conversão alimentar e menor peso de órgãos), com alta mortalidade nos primeiros 10 dias.

Em perus, a infecção por *Salmonella* Enteritidis não foi determinada através do exame bacteriológico do coração, da mensuração do comprimento do intestino e das avaliações clínica, macroscópica, histopatológica e histomorfométrica. Esta afirmação comprova que perus podem ser portadores assintomáticos do patógeno.

REFERÊNCIAS

1. ANDRADE, M. A. **Inoculação de *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar Enteritidis fagotipo 4 em ovos embrionados de duas linhagens de frango de corte.** 2005. 110 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.
2. APPLGATE, T. J.; KARCHER, D.M.; LILBURN, M. S. Comparative Development of the small intestine in the turkey poult and Pekin duckling. **Poultry Science**, Estados Unidos, v. 84, n.3, p. 426-431, 2005.
3. ARSENAULT, J.; LETELLIER, A.; QUESSY, S.; NORMAND, V.; BOULIANNE, M. Prevalence and risk factors for *Salmonella* spp. and *Campylobacter* spp. caecal colonization in broiler chicken and turkey flocks slaughtered in Quebec, Canada. **Preventive Veterinary Medicine**, Holanda, v. 81, n.4, p. 250-264, 2007.
4. BACK, A. **Manual de doenças das aves.** Cascavel-PR, 2002 p 62-78.
5. BACK, A. Ongoing turkey diseases in Brazil. In: 7th INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TURKEY DISEASES, 2008, Berlim, **Anais...**, Berlim, German Branch of World Veterinary Poultry Association, 2008, p. 24.
6. BACK, A.; OLIVEIRA, H. Controle Sanitário na Produção de Perus. In: CONFERÊNCIA APINCO 2006 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2006, Campinas. **Anais...**, Campinas: FACTA, v. 1, 2006, p. 49-54.
7. BAILEY, J. S.; COX, N. A.; BERRANG, M. E. Hatchery-Acquired *Salmonellae* in broiler chicks. **Poultry Science**, v. 73, n.9, p.1153-1157, 1994.
8. BARROW, P. A. Experimental infection of chickens with *Salmonella enteritidis* **Avian Pathology**, Inglaterra, v.20, n.1, p 145-153, 1991.
9. BARROW, P. A. The paratyphoid *Salmonellae*. **Revue scientifique et technique**, França, v.19, n.2, p 351-75, 2000.
10. 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**, Estados Unidos, v. 62, n.10, p 4602-4610,1994.
11. 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, n.1, p. 43-52, 2003.

12. 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, 2003, 226p.
13. BRITISH UNITED TURKEYS. **BUT Performance Goals**. 5ed. Inglaterra: British United Turkeys, 2006a. 6p.
14. BRITISH UNITED TURKEYS. **BUT Big9 Commercial Performance Goals**. 5.ed. Inglaterra: British United Turkeys, 2006b. 7.p.
15. CARRIQUE-MAS, J.; MULLER-DOBLIES, D.; MCLAREN, I.; DAVIES, R. *Salmonella* infection in turkey holdings in the UK. In: 7th INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TURKEY DISEASES, 2008, Berlim, **Anais...**, Berlim, German Branch of World Veterinary Poultry Association, 2008, p. 58.
16. CHARLES, S. D.; HUSSAIN I.; CHOI, C.; NAGARAJA, K. V.; SIVANANDAN, V. Adjuvanted subunit vaccines for the control of *Salmonella enteritidis* infection in turkeys. **American Journal of Veterinary Research**, Estados Unidos, v. 55, n.5, p. 636-642, 1994.
17. CHARLES, S. D.; NAGARAJA, K. V. Adjuvanted subunit vaccines for the control of *Salmonella enteritidis* infection in turkeys. **American Journal of Veterinary Research**, Estados Unidos, v. 55, n. 5, p. 636-642, 1994.
18. COX , N. A.; BERRANGE, M. E.; CASON, J. A. *Salmonella* penetration of eggs shells and proliferation in broiler hatching eggs. **Poultry Science**, Estados Unidos, v. 79, n.11, p. 1571-1574, 2000.
19. COX, N. A.; BAILEY, J. S.; STERN, N. J. Effectiveness of an undefined mucosal competitive exclusion treatment to control *Salmonella* in turkeys during brooding. **Journal of Applied Poultry Research**, Estados Unidos, v.10, n.2, p.319-322, 2001.
20. CRESPO, R.; JEFFREY, J.S.; CHIN, R. P.; SENTÍES-CUÉ, G.; SHIVAPRASAD, H.D. Phenotypic and Genotypic characterization of *Salmonella arizonae* from an integrated turkey operation. **Avian Diseases**, Estados Unidos, v. 48, n.2, p. 344-350, 2004.
21. DAVIES, R.; DOBLIES, D. M.; CARRIQUE-MAS, J.; MCLAREN, I. Recent observations on improved monitoring and control of *Salmonella* in turkey production. In: 7th INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TURKEY DISEASES, 2008, Berlim, **Anais...**, Berlim, German Branch of World Veterinary Poultry Association, 2008, p. 59.
22. DESMIDT, M.; DUCALETTE, R.; HAESEBROUCK, F. Immunohistochemical observations in the ceca of chickens infected with *Salmonella* Enteritidis phage types four. **Poultry Science**, Estados Unidos, v.77, n.1, p.73-74.1998.

23. DESMIDT, M.; DUCALLETTE, R.; HAESEBROUCK, F. Pathogenesis of *Salmonella* Enteritidis phage types four after experimental infection of young chickens. **Veterinary Microbiology**, Holanda, v.56, n.1, p.99-109.1997.
24. DHILLON, A. N.; 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**, Estados Unidos, v. 43, n.3, p.506-515,1999.
25. 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**, Estados Unidos, v. 80, n.9, p. 11323-1138, 2001
26. ELLERBROEK, L. Reduction of the prevalence of *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium in turkeys: implementing regulation (EC) nº2160/2003. In: 7th INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TURKEY DISEASES, 2008, Berlim, **Anais...**, Berlim, German Branch of World Veterinary Poultry Association, 2008, p. 53.
27. EUCLIDES, R.F. **Manual de utilização do SAEG (Sistema para Análise Estatística e Genética)** Minas Gerais: Universidade Federal de Viçosa, 1983. 59p.
28. 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**, Inglaterra, v.24, n. 4, p.207-216, 2001.
29. 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.
30. FRIEDMAN, A.; BAR-SHIRA, E.; SKLAN, D. Ontogeny of gut associated immune competence in the chick. **World's Poultry Science Journal**, Inglaterra, v.59, n. 2, p.209-219, 2003.
31. FURLAN, R. L.; MACARI, M.; LUQUETTI, B. C. Como avaliar os efeitos 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.
32. GAST, R. K. Understanding *Salmonella enteritidis* in laying chickens: the contribution of experimental infections. **International Journal of Food Microbiology**, v.21, n.1, p.107-116, 1994.
33. GAST, R. K. Paratyphoid infection. In: CALNEK, B. W. **Diseases of Poultry**, 10 ed. Ames: Iowa University Press, 1997. p. 97-121.

34. GENOVESE, K.J.; LOWRY, V.K.; STANKER, L.H.; KOGUT, M.H. Administration of *Salmonella enteritidis*-immune lymphokine to day-old turkeys by subcutaneous, oral, and nasal routes: a comparison of effects on *Salmonella enteritidis* liver invasion, peripheral blood heterophilia and heterophil activation. **Avian Pathology**, v. 27, n.2, p.597-604, 1998.
35. GEORGIA POULTRY LABORATORY. **Monitoring and detection of *Salmonella* in poultry and poultry environments**. Oakwood: Georgia Poultry Laboratory, 1997.293p. [Workshop]. GEORGIA POULTRY LABORATORY, 1997
36. GORHAM, S.L.; KADAVIL, K.; LAMBERT, H.; VAUGAHAN, E.; ABEL, J.; PERT, B. Persistence of *Salmonella enteritidis* in young chickens. **Avian Pathology**, v.20, n.2, p.433-437, 1991.
37. 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**, Estados Unidos, v.38, n.3, p.816-821, 1994.
38. HAFEZ, H.M. Current legislation on *Salmonella* control in the EU. In: 6th INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TURKEY DISEASES, 2006, Berlim, **Anais...**, Berlim, German Branch of World Veterinary Poultry Association, 2006, p. 94-99.
39. HARBAUGH, E.; TRAMPEL, D.; WESLEY, I.; HOOFF, S.; GRIFFITH, R.; HURD, H.S. Rapid aerosol transmission of *Salmonella* among turkeys in simulated holding-shed environment. **Poultry Science**, v. 85, n.10, p. 1693-1699, 2006.
40. HENDERSON, S. C.; BOUNOUS, D. I.; LEE, M. D. Early events in the pathogenesis of avian salmonellosis. **Infection and Immunity**, Estados Unidos, v.67, n.7, p. 3580-3586, 1999.
41. HOOVER, N.J.; KENNEY, P.B.; AMICK, J.D.; HYPES, W.A. Preharvest sources of *Salmonella* colonization in turkey production. **Poultry Science**, Estados Unidos, v. 76, n.9, p. 1232-1238, 1997.
42. HUMPHREY, 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. **Veterinary Record**, v.132, n.5, p.407-409, 1993.
43. IRWIN, R.J.; POPPE, C.; MESSIER, S.; FINLEY, G.G.; OGGE, J. A national survey to estimate the prevalence of *Salmonella* species among Canadian registered commercial turkey flocks. **Canadian Journal of Veterinary Research**, Canadá, v. 58, n.1, p. 263-267, 1994.
44. KAESBOHRER, A.; WEGELER, C.; SCHROETER, A.; DORN, C.; HELMUTH, R. *Salmonella* prevalence on turkeys- results of a pilot study in

- Germany. In: 7th INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TURKEY DISEASES, 2008, Berlim, **Anais...**, Berlim, German Branch of World Veterinary Poultry Association, 2008, p. 55.
45. 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.
46. KRÜGER, A.; REDMANN, T.; KRAJEWSKI, V. Field investigations on the efficacy of a live vaccine of *Salmonella* Enteritidis in meat turkeys. In: 7th INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TURKEY DISEASES, 2008, Berlim, **Anais...**, Berlim, German Branch of World Veterinary Poultry Association, 2008, p. 60.
47. LEE, M. D.; LU, J.; IDRIS, U.; HARMON, B.; HOFACRE, C.; MAURER, J. J. Microbial dynamics of the broiler intestinal tract. In: The Elanco Global Enteritis Symposium, 2002, **Abstract...**, Elanco, 2002, p. A3-A8.
48. 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.
49. LUNA, L.G. **Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology**. 3ed. New York: McGraw-Hill, 1968. 258p.
50. MAIORKA, A. Adaptações digestivas pós-eclosão. In: CONFERÊNCIA APINCO 2001 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2001, Campinas. **Anais...**, Campinas: FACTA, v. 1, 2001, p. 141-152.
51. MAIORKA, A.; BOLELI, I. C.; MACARI, M. Desenvolvimento e reparo da mucosa intestinal. In: MACARI, M.; FURLAN, R. L.; GONZALES, E. **Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte**. 1.ed. Jaboticabal: FUNEP/ UNESP, 2002. cap. 8, p.113-123.
52. 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, n.10, p. 1667-1674, 2004.
53. 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.
54. NOY, Y.; SKLAN, D. Poshatch development in poultry. **Journal of Applied Poultry Research**, Estados Unidos, v.6, n.1, p.344-354, 1997.

55. NOY, Y.; GEYRA, A.; SKLAN, D. The effect of early feeding on growth and small intestinal development in posthatch poult. **Poultry Science**, Estados Unidos, v. 80, n. 7, p.912-919, 2001.
56. POTTURI, P. V. L.; PATTERSON, J. A.; APPLGATE, T. J. Effects of delayed placement on intestinal characteristics in turkey poults. **Poultry Science**, Estados Unidos, v. 84, n. 5, p. 816-824, 2005.
57. REZENDE, C. S. M. **Ocorrência de *Salmonella* em lotes de frangos de corte de agroindústrias goianas: identificação bacteriológica e perfil de sensibilidade a antimicrobianos**. 2002. 73 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária – Sanidade Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.
58. ROCHA, P. T. **Ocorrência de *Salmonella* spp. em granjas de integrações de frango de corte no Estado de Goiás**. 2001. 57 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária – Sanidade Animal) Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.
59. ROSE, M. E.; MILLARD, B. J; HESKETH. Intestinal changes associated with expression of immunity to challenge with *Eimeria vermiformis*. **Infection and Immunity**, Estados Unidos, v. 60, n.12, p.5283-5290,1992.
60. ROSTAGNO, M. H.; WESLEY, I. V.; TRAMPEL, D. W.; HURD, H. S. *Salmonella* Prevalence in marked-age turkeys on-farm and at slaughter. **Poultry Science**, Estados Unidos, v. 85, n.10, p. 1838-1842, 2006.
61. SAMPAIO, I. B. M. **Estatística Aplicada à Experimentação Animal**. Belo Horizonte: Fundação de ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2002. 221p.
62. SANTOS, F. B. O.; LI, X.; PAYNE, J.B.; SHELDON, B.W. Assessment of *Salmonella* populations, prevalence and serotype diversity from commercial North Carolina turkeys farms. **Animal Waste Management Symposium**, Estados Unidos, 2005.
63. SELL, J. L.; ANGEL. C.R.; PIQUER, . J.; MALLARINO, E.G.; AL-BATSHAN, H.A. Developmental patterns of selected characteristics of the gastrointestinal tract of young turkeys. **Poultry Science**, Estados Unidos, v. 70, n.10, p. 1200-1205, 1991.
64. SILVA, E.N.; DUARTE, A. *Salmonella* Enteritidis em Aves: Retrospectiva no Brasil. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, v. 4, n. 2, p. 1-16, 2002.
65. TUCKER, L. A.; TAYLOR-PICKARD, J.A. **Interfacing immunity, gut health and performance**. Reino Unido: Nottingham University Press, 2004, 119p.
66. UNI, Z.; GANOT, S.; SKLAND, D. Posthatch development of mucosal function in the broiler small intestine. **Poultry Science**. v.77, p.75-82, 1998.

67. UNI, Z.; NOY, Y.; SKLAN, D. Posthatch development of small intestinal function in the poult. **Poultry Science**, Estados Unidos, v. 78, n.2, p. 215-222, 1999.
68. 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. **Development and Comparative Immunology**, v.26, n.4, p. 355-364, 2002.
69. VAN IMMERSEEL, F.; PASINANS, J. D. F.; HAESERBROUCK, F.; DUCATELLE, R. The 'smart' bacteria. **World Poultry, Salmonella & Campylobacter Special**, 2005.

CAPÍTULO 4 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os prejuízos com a infecção aviária por *Salmonella sp.* são difíceis de serem medidos, mas compreendem a perda de animais, rendimento abaixo do potencial, gastos com medicamentos, e, além disso, a presença do patógeno em produtos avícolas tem sido incriminada como principal fonte de infecção para o homem.

Um dos maiores perigos desta zoonose está no fato de que a bactéria pode se propagar insidiosamente para várias espécies animais, veiculadas pelas fezes de aves infectadas ou por produtos contaminados.

Neste contexto, a salmonelose tem sido apontada como um dos principais problemas sanitários que restringem o comércio de aves e subprodutos em todo mundo. Patógeno de epidemiologia complexa, *Salmonella Enteritidis* tem requerido diferentes métodos de controle na produção de ovos (granja de matrizes), nos incubatórios, nos diferentes sistemas e segmentos de produção avícola e muitas vezes sem sucesso.

Neste estudo constatou-se que:

a) a presença de *Salmonella Enteritidis* em incubatórios causa prejuízos econômicos e afeta a qualidade do peruzinhos, pois os parâmetros de incubação foram afetados na inoculação *in ovo* do patógeno;

b) perus foram susceptíveis à infecção por *Salmonella Enteritidis*, havendo colonização intestinal e disseminação da infecção pelos órgãos internos;

c) a recuperação elevada do patógeno nos órgãos internos esteve associada com escassos sinais clínicos e lesões macroscópicas, comprovando que perus podem ser importantes portadores de *Salmonella Enteritidis* e, por ocasião do abate, tornam-se possíveis fontes de infecção para o homem;

Como esperado, observou-se que perus são susceptíveis à infecção por *Salmonella Enteritidis*, entretanto as pesquisas nesta espécie devem ser intensificadas pela diversidade de respostas encontradas quando se compara frangos de corte e perus comerciais.

Vale ressaltar que algumas variáveis poderiam ser incluídas no delineamento experimental, visto que há embasamento literário para

confrontação de resultados. Dentre as possibilidades que poderiam ser analisadas em experimentos posteriores, sugere-se:

- Pesagem de peruzinhos ao nascimento com e sem a gema aliada à medição do comprimento da ave;
- Separação dos segmentos do intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo) para pesagem e medição;
- Pesagem da bursa e outros órgãos digestivos, como pró-ventrículo, moela e pâncreas;
- Desenvolvimento histomorfométrico antes da eclosão;

Finalizando, o estudo da patogênese da salmonelose aviária em perus pode contribuir para o crescimento desta exploração, disponibilizando informações para a melhoria da sanidade do plantel.