

EDSON RYUITI KATAYAMA

**DETECÇÃO DE *Salmonella* Enteritidis EM OVOS DE CODORNAS JAPONESAS  
SUBMETIDAS A DIETAS COM DIFERENTES NÍVEIS DE CÁLCIO E FÓSFORO**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação  
apresentado à Faculdade de Medicina Veterinária  
e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista  
"Júlio de Mesquita Filho", Campus de Botucatu,  
SP, para obtenção do grau de Médico Veterinário.

Preceptor: Prof. Adj. Raphael Lucio Andreatti Filho

Botucatu  
2010

EDSON RYUITI KATAYAMA

**DETECÇÃO DE *Salmonella* Enteritidis EM OVOS DE CODORNAS JAPONESAS  
SUBMETIDAS A DIETAS COM DIFERENTES NÍVEIS DE CÁLCIO E FÓSFORO**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação  
apresentado à Faculdade de Medicina Veterinária  
e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista  
“Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu,  
SP, para obtenção do grau de Médico Veterinário.

Área de Concentração: Patologia Aviária

Preceptor: Prof. Adj. Raphael Lucio Andreatti Filho

Coordenadora de Estágios: Profa. Ass. Dra. Vania Maria de Vasconcelos Machado

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE

Katayama, Edson Ryuiti.

Detecção de *Salmonella Enteritidis* em ovos de codornas japonesas submetidas a dietas com diferentes níveis de cálcio e fósforo / Edson Ryuiti Katayama. - Botucatu, 2010

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, 2010

Orientador: Raphael Lucio Andreatti Filho

Capes: 50503014

1. *Salmonella Enteritidis*. 2. Codorna japonesa – ovos.

Palavras-chave: Cálcio; Codornas; Fósforo; Enteritidis; Ovos; *Salmonella*.

## AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu: funcionários, docentes e alunos.

Ao PIBIC / CNPq.

Ao Prof. Adj. Raphael Lucio Andreatti Filho.

Ao Anderson de Pontes Silva e ao Prof. Adj. Edivaldo Antonio Garcia.

Ao Prof. Ass. Dr. Adriano Sakai Okamoto.

Aos colaboradores deste trabalho: Ana Angelita Sampaio Baptista, Elisane Lenita Milbradt, Francine Vercese, Guilherme Augusto Marietto Gonçalves, Ricardo Seiti Yamatogi, Prof. Ass. Dr. Luciano Barbosa, Profa. Adj. Luzia Aparecida Trinca, Renata Ishiba, Roberta Pivesso Mazola, Tais Cremasco Donato, Ticiania Silva Rocha.

À Brasil Foods S.A. – Laboratório de Saúde Animal, Centro Tecnológico Agropecuário e Gerência Técnica de Agropecuária e Nutrição Animal: funcionários e estagiários – João Paulo Zuffo, Marilene Hawerth, Priscilla Karina Vitor Koerich, Ada Otir Padilha, Augusto Heck, Hugo Arcangeletti Urso, Uislei Orlando.

Aos meus pais: Rosa Kiyoko Katayama e Jorge Tacashi Katayama.

Muito Obrigado!

KATAYAMA, EDSON RYUITI. Detecção de *Salmonella* Enteritidis em ovos de codornas japonesas submetidas a dietas com diferentes níveis de cálcio e fósforo. Botucatu, 2010. 21p. Trabalho de conclusão de curso de graduação (Medicina Veterinária, Área de Concentração: Patologia Aviária). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

## RESUMO

Os ovos são apontados em diversos estudos como os principais causadores da salmonelose humana. Foram identificados que ovos quando consumidos crus ou mal processados são grandes responsáveis por surtos de infecção humana por *Salmonella* spp. Além de causar problemas à saúde pública, a presença da bactéria impede ou dificulta o comércio internacional de alimentos, sendo uma barreira sanitária. São vários os fatores que predispõe à contaminação do conteúdo interno de ovos à *Salmonella* spp., entre eles a qualidade da casca dos ovos, que tem relação com os níveis de cálcio (Ca) e fósforo (P) na dieta das aves. O experimento utilizou ovos de codornas japonesas submetidas a diferentes dietas contendo dois níveis de Ca (2,0 e 3,5%) e dois níveis de P disponível (0,25 e 0,45%). Foram utilizados ovos de 120 codornas japonesas, divididas em 4 tratamentos com 3 repetições. O experimento foi dividido em 3 fases de produção: inicial, intermediária e final. Foram avaliados em cada fase a presença da bactéria no conteúdo interno e na casca dos ovos experimentalmente contaminados nos períodos de zero, 24, 96 e 168 horas após a imersão em caldo contendo *Salmonella* Enteritidis. Foi detectada *Salmonella* Enteritidis na casca durante todos os períodos de armazenamento, em quantidades decrescentes, em todos os tratamentos. Em nenhum dos tratamentos, dentro das três fases de produção analisadas, foi detectada quantidades significativas da bactéria no interior dos ovos, nas condições experimentais deste trabalho. Portanto, os níveis de Ca e P nas dietas das codornas não determinam maiores ou menores riscos à saúde pública em relação à penetração da *Salmonella* Enteritidis no interior dos ovos.

Palavras-chave: Ovos de codorna; *Salmonella* Enteritidis; Cálcio; Fósforo.

KATAYAMA, EDSON RYUITI. Detection of *Salmonella* Enteritidis in eggs of japanese quails fed diet with different levels of calcium and phosphorus. Botucatu, 2010. 21p. Trabalho de conclusão de curso de graduação (Medicina Veterinária, Área de Concentração: Patologia Aviária). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

#### **ABSTRACT**

The eggs are pointed in several studies as the main cause of human salmonellosis. Have been identified that eggs are eaten raw or poorly processed are mainly responsible for outbreaks of human infection with *Salmonella* spp. Besides causing problems to public health, the presence of bacteria impedes or hinders the international food trade, as a sanitary barrier. Several factors predisposing to contamination of the internal contents of eggs for *Salmonella* spp., including the egg shell quality (shell quality), which is related to levels of calcium (Ca) and phosphorus (P) in the diet of quails . The experiment used eggs of Japanese quail under different diets containing two levels of Ca (2.0 and 3.5%) and two levels of available P (0.25 and 0.45%). Eggs of 120 japanese quails were divided into four treatments with three replicates. The experiment was divided into three production stages: initial, intermediate and final. Were assessed at each stage the presence of bacteria in internal and external content of experimentally contaminated eggs during periods of 0, 24, 96 and 168 hours after immersion in broth containing *Salmonella* Enteritidis. *Salmonella* Enteritidis was detected in the shell during all periods of storage, in decreasing amounts in all treatments. None of the treatments within the three production stages analyzed, we detected significant amounts of the bacteria inside the egg, in our experimental conditions. Therefore, the levels of Ca and P in the diets of quail do not determine higher or lower risks to public health represented by eggs.

Keywords: Quail eggs, *Salmonella* Enteritidis, Calcium, Phosphorus.

## SUMÁRIO

**Resumo**

**Abstract**

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>08</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>08</b>
<b>3. METODOLOGIA</b>	<b>10</b>
<b>3.1. Aves e tratamentos experimentais.....</b>	<b>10</b>
<b>3.2. Detecção de <i>Salmonella</i> Enteritidis em ovos.....</b>	<b>11</b>
<b>3.2.1. Amostra bacteriana.....</b>	<b>11</b>
<b>3.2.2. Preparo do inóculo.....</b>	<b>12</b>
<b>3.2.3. Ovos.....</b>	<b>12</b>
<b>3.2.4. Avaliação da contaminação.....</b>	<b>12</b>
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>13</b>
<b>4.1. Fase inicial de produção.....</b>	<b>13</b>
<b>4.2. Fase intermediária de produção.....</b>	<b>14</b>
<b>4.3. Fase final de produção.....</b>	<b>15</b>
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>17</b>
<b>Referências.....</b>	<b>17</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A coturnicultura é uma das atividades que mais tem se desenvolvido no Brasil. Nos últimos anos houve um grande crescimento na produção de ovos devido a mudanças no mercado, onde os ovos primordialmente comercializados “in natura” passaram também a ser processados em indústrias, originando os ovos descascados em conservas (FUGIKURA, 2002). Para manter e contribuir com o aprimoramento e o crescimento desta exploração, é essencial a busca pela qualidade dos produtos, principalmente os aspectos sanitários, onde a contaminação por *Salmonella* spp., além de causar problemas à saúde pública, impede ou dificulta o comércio internacional de alimentos, sendo uma barreira sanitária.

As salmoneloses aviárias são doenças provocadas por bactérias do gênero *Salmonella*, bastonete gram-negativo, anaeróbia facultativa, pertencente à família *Enterobacteriaceae*, com duas espécies atualmente reconhecidas: *Salmonella bongori* e *Salmonella enterica*. A *S. enterica* subespécie *enterica* apresenta aproximadamente 2500 sorotipos, sendo os sorotipos Pullorum e Gallinarum específicos de aves. A *Salmonella* pode causar três doenças distintas em aves: pulorose, cujo agente é a *S. Pullorum*; tifo aviário, causado pela *S. Gallinarum*; e paratifo aviário, causado por outros sorovares (ANDREATTI FILHO, 2007; EUZÉBY, 1999; GAST, 1997; HOLT *et al.*, 1994) A infecção humana geralmente ocorre através da ingestão de alimentos contaminados, especialmente por *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis (SE), que tem sido comumente identificada no Brasil em produtos avícolas, aves vivas e ambientes de granjas (FERREIRA *et al.*, 1990; GAMA *et al.*, 2003; SILVA & BOSQUIROLI, 1996; TAVECHIO *et al.*, 2002). Ovos consumidos crus ou alimentos usando ovos sem tratamento adequado foram identificados como os principais responsáveis por surtos de infecção humana por *Salmonella* spp. (GAST & BEARD, 1992; HUMPHREY, 1994; LATIMER *et al.*, 2000; MAYES & TAKEBALLI, 1983; PERESI *et al.*, 1998).

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

A contaminação bacteriana dos ovos pode ocorrer antes ou após a postura. A contaminação pré-postura ocorre por via ovariana ou na passagem pelo oviduto (HUMPHREY, 1994; MAYES & TAKEBALLI, 1983). A contaminação pós-postura ocorre principalmente por deficiências na higiene, pela presença de rachaduras ou defeitos na casca.

No período imediatamente após a postura, o resfriamento rápido do ovo é o principal fator que predispõe a contaminação interna dos ovos. Ao sair pela cloaca, o ovo está a 42°C, a mesma temperatura interna da ave. Em contato com o ambiente, principalmente com líquidos,



sua temperatura interna diminui, formando uma pressão negativa em seu interior. A SE presente na superfície do ovo podem ser forçada para seu interior (COX *et. al.*, 2000).

Os ovos possuem estruturas e mecanismos que protegem a gema de contaminação microbiológica, como cutícula, casca, membranas internas e o albúmen (TRANTER & BOARD, 1982). A *Salmonella* spp. presente na superfície da casca de ovos pode penetrar no seu interior, dependendo da qualidade da casca, condições de higiene, tempo e temperatura de estocagem, pH, número de poros, umidade (CLAY & BOARD, 1991; HUMPHREY, 1990a; HUMPHREY *et. al.*, 1991; PADRON, 1990; SCHOENI *et. al.*, 1995). Pode inclusive invadir o conteúdo de ovos de casca íntegra (BERRANG *et. al.*, 1999).

A espessura da casca está relacionada com sua capacidade de proteção contra a contaminação bacteriana. Ovos com gravidade específica igual ou superior a 1090g/L apresentaram um menor índice de contaminação quando comparados com ovos que apresentam gravidade específica menores, após 24 horas da contaminação da casca por imersão em caldo de cultura, utilizando gradiente de temperatura (SAUTER & PETERSEN, 1974). A velocidade da penetração microbiana em ovos é inversamente proporcional a sua gravidade específica. Outros fatores também interferem nesta invasão, como o esfriamento natural do ovo após a postura, umidade do ar e tratamento da superfície da casca (MAYES & TAKEBALLI, 1983; SAUTER & PETERSEN, 1974).

A matriz orgânica da casca propicia proteção à parte interna do ovo, mas apresentam baixa capacidade bacteriostática para bactérias gram-negativas (MINE *et. al.*, 2003). Já a membrana interna é a estrutura mais importante na retenção do microorganismo fora do conteúdo de ovos contaminados através da casca. Quando há integridade das membranas, mais tempo é necessário para que ocorra a penetração de microorganismos (LIFSHITZ *et. al.*, 1964). Por fim, o albúmen possui mecanismos químicos que impedem a multiplicação bacteriana, e mecanismos físicos que dificultam o movimento das bactérias até a gema, bem como a estrutura das chalazas, que impedem a aproximação da gema das membranas internas e da casca (BOARD & TRANTER, 1994).

A qualidade da casca do ovo está relacionada com os níveis de cálcio (Ca) e fósforo (P) da dieta. Codornas são aves altamente tolerantes às variações de Ca e P nas dietas, tendo condições de excretar o excesso dos minerais (OLIVEIRA & ALMEIDA, 2004).

A utilização do Ca pelo organismo depende principalmente da idade e da espécie animal. Nas aves em crescimento, o Ca é utilizado na formação óssea, enquanto que nas aves em postura, o Ca é utilizado para formação da casca do ovo. Assim, o Ca é um elemento fundamental para a manutenção e produção de ovos (SCHERER *et. al.*, 2004). Além disto, o Ca é

um componente necessário para formação da casca do ovo (BELL & WEAVER JR, 2002). O balanço positivo do Ca pode ser benéfico para manter a qualidade futura da casca do ovo, pois durante a produção do ovo, o fator principal que mantém a qualidade casca parece ser a manutenção de um balanço positivo do Ca (GILBERT *et. al.*, 1981).

O nível dietético de P pode alterar a qualidade da casca e muitas vezes, o nível de P que proporciona melhor qualidade de casca pode não ser o mesmo que proporciona melhor produção de ovos (VANDEPOPULIERE & LYONS, 1992). Devido à falta de padronização de fases no ciclo de produção na cortunicultura, há uma grande dificuldade na definição dos níveis de Ca e P ideais (GARCIA & PIZZOLANTE, 2004).

Desta forma, o objetivo do presente estudo foi detectar a *S. Enteriditis* em ovos de codornas experimentalmente contaminados, no conteúdo interno e externamente, nos períodos de 0, 24, 96 e 168 horas após a imersão em caldo contendo *S. Enteriditis*, em cada fase de produção. Os ovos são de codornas japonesas submetidas a dietas com diferentes níveis nutricionais de Ca (2,0 e 3,5%) e P (0,25 e 0,45%) durante todo o ciclo de produção (fase inicial, intermediária e final).

### **3. METODOLOGIA**

#### **3.1. Aves e tratamentos experimentais**

Foram utilizados ovos de 120 codornas japonesas (*Coturnix coturnix japonica*) alojadas nas instalações experimentais do Setor de Avicultura da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP - Campus de Botucatu, SP.

As aves receberam alimentação e água à vontade, sendo que a ração foi fornecida duas vezes ao dia. As rações foram produzidas na fábrica de rações da Fazenda Experimental do Lageado da UNESP - Campus de Botucatu. As rações, na forma farelada, eram à base de milho e farelo de soja satisfazendo todos os requerimentos nutricionais, seguindo as recomendações do NRC (1994), exceto para os níveis de Ca e P.

O experimento foi dividido em 3 fases: fase inicial de produção (4 primeiros ciclos de 28 dias: 7 a 22 semanas), fase intermediária (4 ciclos de 28 dias: 23 a 38 semanas) e fase final de produção (os últimos 4 ciclos de 28 dias: 39 a 54 semanas).

As aves foram distribuídas em um delineamento fatorial em blocos inteiramente casualizados com 4 tratamentos compostos por dois níveis de Ca (2,0 e 3,5 %) e dois níveis de P (0,25 e 0,45 %), com 3 repetições por tratamento (Tabela 1).

**Tabela 1** – Níveis de Ca (%) e P (%) na dieta de codornas japonesas nos diferentes tratamentos utilizados.

<b>Tratamento</b>	<b>% de Ca</b>	<b>% de P</b>
<b>T1</b>	2,0	0,25
<b>T2</b>	2,0	0,45
<b>T3</b>	3,5	0,25
<b>T4</b>	3,5	0,45

O nível de Ca de 2,0% está abaixo do indicado pelo NRC (1994), que sugere que exigência nutricional de Ca é de 2,5% para codornas japonesas em postura. Mas Masukawa *et. al.* (1996) forneceram às codornas japonesas dietas com diferentes níveis de Ca (2,0 à 3,5 %) e não encontraram efeitos significativos destes níveis sobre a gravidade específica, percentagem de casca e espessura de casca. Já Raju *et. al.* (1992) realizaram um experimento utilizando quatro níveis de Ca (2,0 à 3,5 %) e a espessura da casca foi significativamente afetada pelos níveis de Ca. Pedroso *et. al.* (1999) avaliaram níveis de Ca de 2,5; 3,0; e 3,5 % e níveis de P de 0,25; 0,45; 0,65 e 0,85 % para codornas em fase de produção de ovos e recomendaram níveis de 0,45 de P e 3,5 % de Ca para obtenção de melhoria na gravidade específica dos ovos.

### **3.2. Detecção de *Salmonella* Enteritidis em ovos**

Foi realizado no Laboratório de Ornitopatologia do Departamento de Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista - UNESP - Campus de Botucatu.

#### **3.2.1. Amostra bacteriana**

Foi utilizada amostra de *Salmonella* Enteritidis fagotipo 4, isolada de fígado de matrizes pesadas, sorotipada pelo Instituto Adolfo Lutz - São Paulo - SP, um mutante resistente ao ácido nalidíxico (Nal) e rifampicina (Rif), desenvolvido através de cultivos sucessivos em ágar verde brilhante (AVB) contendo Nal (100µg/mL de meio) e Rif (100 µg/mL de meio) (ANDREATTI FILHO *et. al.*, 2000).

### **3.2.2. Preparo do inóculo**

O inóculo constitui-se do alçamento de colônias puras de SE em placas de AVB contendo Nal e Rif e sua diluição em solução de cloreto de sódio (NaCl) a 0,85%, até atingir a turbidez visual padrão 01 na Escala MacFarland, e posteriormente confirmado no espectrofotômetro a 550 nm, atingindo 0,250 de absorbância, o que corresponde  $10^8$  unidades formadoras de colônia por mL (UFC/mL). No momento do uso, foi diluído em 100 vezes em água peptonada tamponada (APT). O número de UFC/mL foi determinado através de diluições decimais em APT, com posterior plaqueamento em AVB.

As determinações bacterianas da casca e do conteúdo interno foram realizadas pelo plaqueamento de 0,1mL das suspensões de APT e respectivas diluições decimais, em AVB acrescido de Nal e Rif, na quantidade de 100  $\mu$ g/mL do meio. A leitura das placas foram feitas após incubação a 40°C por 24 horas.

### **3.2.3. Ovos**

Utilizou-se 120 ovos em período não superior a 24 horas após postura, em cada ciclo de produção (inicial, intermediária e final). Foram oito ovos por gaiola de cada tratamento, uma amostra de 24 ovos por tratamento, totalizando 96 ovos. Concomitantemente, 24 ovos excedentes, dois ovos por gaiola de cada tratamento, foram examinados com o intuito de verificar contaminação prévia por *Salmonella* spp.

Os ovos foram imersos durante três minutos em cultura de SE, resistente ao Nal e a Rif, contendo  $10^6$  UFC/mL (BARROS *et. al.*, 2001). Os ovos e a cultura de SE estavam em temperatura ambiente (25°C) no momento da imersão.

### **3.2.4. Avaliação da contaminação**

Nos períodos de zero, 24, 96 e 168 horas após a imersão em caldo contendo SE, ovos de cada tratamento, *pool* de 2 ovos por repetição, totalizando 3 repetições, foram examinados através de plaqueamento, para verificar a quantidade de SE na casca e no conteúdo interno.

Para avaliação da contaminação da casca, cada *pool* de dois ovos foi colocado durante três minutos em bolsas plásticas contendo 15mL de APT, e diluições decimais também em APT foram plaqueadas em AVB acrescido de Nal e Rif na quantidade de 100 $\mu$ g/mL do meio. Posteriormente, imergiu-se os ovos em solução de etanol a 70%, durante 5 minutos. Após

secagem, estes foram quebrados e o conteúdo interno misturado a 30mL de APT, repetindo-se procedimento utilizado com a quantificação de SE nas cascas. Devido ao menor tamanho do ovo de codorna em relação ao ovo de galinha e a menor quantidade de ovos utilizados, foram reduzidos em cinco vezes os volumes de APT utilizados por Barros *et. al.* (2001).

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A quantidade de SE encontrada na casca e no interior dos ovos de codornas, nas diferentes fases de produção, estão apresentadas nas Tabelas 2, 3, 4, 5, 6 e 7.

##### 4.1 Fase inicial de produção

**Tabela 2** – Detecção de *Salmonella* Enteritidis (UFC/mL) nas cascas de ovos de codornas, após 0, 24, 96 e 168 horas de armazenamento, na fase inicial de produção.

Tratamentos	Local	Períodos de armazenamento			
		0h	24h	96h	168h
T1 (Ca: 2,0%; P: 0,25%)	Casca	1,4x10 <sup>3</sup> Aa	4,8x10 <sup>2</sup> Aa	1,2x10 <sup>3</sup> Aa	5,3x10 <sup>1</sup> Aa
T2 (Ca: 2,0%; P: 0,45%)	Casca	1,2x10 <sup>3</sup> Aa	2,0x10 <sup>2</sup> Aa	6,0x10 <sup>1</sup> Aa	5,9x10 <sup>2</sup> Aa
T3 (Ca: 3,5%; P: 0,25%)	Casca	1,0x10 <sup>3</sup> Aa	1,3x10 <sup>2</sup> Ab	3,7x10 <sup>1</sup> Ab	2,0x10 <sup>1</sup> Ab
T4 (Ca: 3,5%; P: 0,45%)	Casca	9,7x10 <sup>2</sup> Aa	1,3x10 <sup>2</sup> Ab	1,1x10 <sup>2</sup> Ab	5,7x10 <sup>1</sup> Ab

Letras maiúsculas distintas entre os tratamentos, dentro de cada período de armazenamento avaliado (coluna), e letras minúsculas distintas entre os períodos de armazenamento, dentro de cada tratamento avaliado (linha), diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

**Tabela 3** – Detecção de *Salmonella* Enteritidis (UFC/mL) no conteúdo interno de ovos de codornas, após 0, 24, 96 e 168 horas de armazenamento, na fase inicial de produção.

Tratamentos	Local	Períodos de armazenamento			
		0h	24h	96h	168h
T1 (Ca: 2,0%; P: 0,25%)	Interno	0Aa	0Aa	3,3x10 <sup>0</sup> Aa	0Aa
T2 (Ca: 2,0%; P: 0,45%)	Interno	0Aa	0Aa	0Aa	3,0x10 <sup>1</sup> Aa
T3 (Ca: 3,5%; P: 0,25%)	Interno	0Aa	0Aa	0Aa	0Aa
T4 (Ca: 3,5%; P: 0,45%)	Interno	0Aa	0Aa	0Aa	0Aa

Letras maiúsculas distintas entre os tratamentos, dentro de cada período de armazenamento avaliado (coluna), e letras minúsculas distintas entre os períodos de armazenamento, dentro de cada tratamento avaliado (linha), diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

#### 4.2 Fase intermediária de produção

**Tabela 4** – Detecção de *Salmonella* Enteritidis (UFC/mL) nas cascas de ovos de codornas, após 0, 24, 96 e 168 horas de armazenamento, na fase intermediária de produção.

Tratamentos	Local	Períodos de armazenamento			
		0h	24h	96h	168h
T1 (Ca: 2,0%; P: 0,25%)	Casca	2,6x10 <sup>3</sup> Aa	3,8x10 <sup>2</sup> Aa	1,2x10 <sup>4</sup> Aa	1,0x10 <sup>1</sup> Aa
T2 (Ca: 2,0%; P: 0,45%)	Casca	1,7x10 <sup>3</sup> Aa	8,1x10 <sup>2</sup> Aa	8,7x10 <sup>2</sup> Aa	4,4x10 <sup>2</sup> Ba
T3 (Ca: 3,5%; P: 0,25%)	Casca	3,7x10 <sup>3</sup> Aa	1,5x10 <sup>2</sup> Aa	1,3x10 <sup>2</sup> Aa	1,2x10 <sup>2</sup> ABa
T4 (Ca: 3,5%; P: 0,45%)	Casca	5,9x10 <sup>3</sup> Aa	2,5x10 <sup>2</sup> Ab	1,6x10 <sup>2</sup> Ab	7,5x10 <sup>1</sup> ABb

Letras maiúsculas distintas entre os tratamentos, dentro de cada período de armazenamento avaliado (coluna), e letras minúsculas distintas entre os períodos de armazenamento, dentro de cada tratamento avaliado (linha), diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

**Tabela 5** – Detecção de *Salmonella* Enteritidis (UFC/mL) no conteúdo interno de ovos de codornas, após 0, 24, 96 e 168 horas de armazenamento, na fase intermediária de produção.

Tratamentos	Local	Períodos de armazenamento			
		0h	24h	96h	168h
T1 (Ca: 2,0%; P: 0,25%)	Interno	0Aa	0Aa	7,5x10 <sup>2</sup> Aa	0Aa
T2 (Ca: 2,0%; P: 0,45%)	Interno	0Aa	3,3x10 <sup>0</sup> Aa	3,3x10 <sup>0</sup> Aa	9,3x10 <sup>1</sup> Aa
T3 (Ca: 3,5%; P: 0,25%)	Interno	0Aa	3,3x10 <sup>0</sup> Aa	0Aa	0Aa
T4 (Ca: 3,5%; P: 0,45%)	Interno	0Aa	3,3x10 <sup>0</sup> Aa	0Aa	0Aa

Letras maiúsculas distintas entre os tratamentos, dentro de cada período de armazenamento avaliado (coluna), e letras minúsculas distintas entre os períodos de armazenamento, dentro de cada tratamento avaliado (linha), diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

### 4.3 Fase final de produção

**Tabela 6** – Detecção de *Salmonella* Enteritidis (UFC/mL) nas cascas de ovos de codornas, após 0, 24, 96 e 168 horas de armazenamento, na fase final de produção.

Tratamentos	Local	Períodos de armazenamento			
		0h	24h	96h	168h
T1 (Ca: 2,0%; P: 0,25%)	Casca	1,8x10 <sup>3</sup> Aa	6,9x10 <sup>3</sup> Aa	1,6x10 <sup>2</sup> Aa	4,0x10 <sup>1</sup> Ab
T2 (Ca: 2,0%; P: 0,45%)	Casca	1,6x10 <sup>3</sup> Aa	2,9x10 <sup>2</sup> Aa	1,0x10 <sup>4</sup> Aa	9,3x10 <sup>1</sup> Aa
T3 (Ca: 3,5%; P: 0,25%)	Casca	4,1x10 <sup>3</sup> Aa	2,1x10 <sup>2</sup> Aa	2,1x10 <sup>2</sup> Aa	1,3x10 <sup>2</sup> Aa
T4 (Ca: 3,5%; P: 0,45%)	Casca	2,9x10 <sup>3</sup> Aa	2,8x10 <sup>2</sup> Aab	4,4x10 <sup>2</sup> Aab	7,0x10 <sup>1</sup> Ab

Letras maiúsculas distintas entre os tratamentos, dentro de cada período de armazenamento avaliado (coluna), e letras minúsculas distintas entre os períodos de armazenamento, dentro de cada tratamento avaliado (linha), diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

**Tabela 7** – Detecção de *Salmonella* Enteritidis (UFC/mL) no conteúdo interno de ovos de codornas, após 0, 24, 96 e 168 horas de armazenamento, na fase final de produção.

Tratamentos	Local	Períodos de armazenamento			
		0h	24h	96h	168h
T1 (Ca: 2,0%; P: 0,25%)	Interno	0Aa	0Aa	0Aa	0Aa
T2 (Ca: 2,0%; P: 0,45%)	Interno	0Aa	0Aa	8,3x10 <sup>1</sup> Aa	0Aa
T3 (Ca: 3,5%; P: 0,25%)	Interno	0Aa	0Aa	1,0x10 <sup>1</sup> Aa	0Aa
T4 (Ca: 3,5%; P: 0,45%)	Interno	0Aa	0Aa	0Aa	0Aa

Letras maiúsculas distintas entre os tratamentos, dentro de cada período de armazenamento avaliado (coluna), e letras minúsculas distintas entre os períodos de armazenamento, dentro de cada tratamento avaliado (linha), diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

A quantidade de SE na casca durante o armazenamento a 25°C foi decrescente em todos os tratamentos e em todas as fases de produção analisadas. Foi detectada SE na casca durante todos os períodos de armazenamento, em todos os tratamentos, concordando com os resultados observados em alguns estudos com ovos de galinhas poedeiras, onde detectou-se quantidades significativas de SE durante todo o período de análise (BARROS *et al.*, 2001; HUMPHREY *et al.*, 1991; GAST & BEARD, 1992; SCHOENI *et al.*, 1995). Na maioria das vezes, não houve diferenças significativas na contagem de SE nas cascas dos ovos entre os tratamentos, dentro de uma mesma fase de produção, devido a grande amplitude de variação na contagem de UFC/mL entre as três repetições de um mesmo tratamento. Pelo mesmo motivo, o decréscimo observado na contagem de SE durante o armazenamento, nem sempre foram significativamente diferentes, entre os diversos períodos de tempo analisados.

Em nenhum dos tratamentos, dentro das três fases de produção analisadas, foi detectada quantidades significativas de SE no interior dos ovos (albúmem e gema), concordando com os resultados de Barros *et al.* (2001), em ovos comerciais de galinhas poedeiras. Na maioria das vezes não foi detectado SE no interior dos ovos. Quando foi encontrado SE, somente detectou-se em uma das três repetições, dentro de um tratamento, em um mesmo período de armazenamento. Foi observado que nas repetições em que foram detectadas SE no conteúdo interno dos ovos, geralmente havia também uma alta concentração de SE na casca, dentro de



um mesmo período de armazenamento. Isto pode ocorrer devido a defeitos nas cascas (rachaduras) e/ou presença de matéria orgânica aderida à casca. Na fase inicial de produção, detectou-se SE no T1 (Ca: 2,0%; P: 0,25%) e no T2 (Ca: 2,0%; P: 0,45%), após 96 e 168 horas de armazenamento, respectivamente. Já na fase intermediária de produção, detectou-se SE em todos os tratamentos, no mínimo após 24 horas de armazenamento, sendo que no T2 (Ca: 2,0%; P: 0,45%) detectou-se SE após 24, 96 e 168 horas de armazenamento. Finalmente, na fase final de produção, foi detectado SE no T2 (Ca: 2,0%; P: 0,45%) e T3 (Ca: 3,5%; P: 0,25%), após 96 horas de armazenamento. Oliveira e Silva (2000) constataram a contaminação em ovos comerciais de galinhas poedeiras por SE em quantidades significativas, provenientes da casca, a partir de 24 horas após contaminação artificial, trabalhando isoladamente com gema. Fatores antibacterianos encontrados na clara, como a ação de enzimas antibacterianas e deficiência do íon ferro, podem explicar a redução da contagem ou mesmo o desaparecimento de SE no conteúdo interno dos ovos, já que utilizou-se todo o conteúdo interno dos ovos (clara e gema).

## 5. CONCLUSÕES

Ovos provenientes de codornas submetidas a dietas com diferentes níveis de Ca e P, não apresentaram modificações nas cascas dos ovos capazes de permitir uma contaminação significativa pós-postura por *Salmonella* Enteritidis no conteúdo interno, nas condições experimentais deste trabalho, após diversos períodos de armazenamento. Portanto, os níveis de Ca e P nas dietas das aves não determinam maiores ou menores riscos à saúde pública em relação a penetração da *Salmonella* Enteritidis no interior dos ovos.

## REFERÊNCIAS

ANDREATTI FILHO, R. L. Paratifo aviário. **Saúde Aviária e Doenças**, Editora Roca, São Paulo, cap.9, p.96-106, 2007.

ANDREATTI FILHO, R.L.; SILVA, E.N.; RIBEIRO, A.R., KONDO, N.; CURI, P.R. Use of anaerobic cecal microflora, lactose and acetic acid for the protection of broiler chicks against experimental infection with *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Enteritidis. **Brazilian Journal Microbiology**, v.31, p.107-12, 2000.

BARROS, M.R.; ANDREATTI FILHO, R.L.; LIMA, E.T.; SAMPAIO, H.M.; CROCCI, A.J. Survival of *Salmonella enteritidis* in eggs artificially contaminated, after disinfection and

stored at different temperatures. **Revista Brasileira Ciência Avícola**, Campinas. v.3, n.3, p.219-223, set-dez/2001.

BOARD, R.G.; TRANTER, H.S. The microbiology of eggs. IN: STADELMAN, W.J.; COTTERGIL, O.J. (eds.). **Egg science and technology**. 4.ed. Haworth Press: New York, cap.5, p.81-104, 1994.

CLAY, C.E.; BOARD, R.G. Growth of *Salmonella enteritidis* in artificially contaminated hens' shell eggs. **Epidemiology Infection**, v.106, p.271-81, 1991.

COX, N.A. BERRANG, M.E. CASON, J.A. *Salmonella* penetration of egg shells and proliferation in broiler hatching eggs – a review. **Poultry Science**, v. 79, p.1571-1574, 2000.

EUZÉBY, J.P. Revised *Salmonella* nomenclature: designation of *Salmonella enterica* (ex Kauffmann and Edwards 1952) Le Minor and Popoff 1987 sp. nov., nom. rev. as the neotype species of the genus *Salmonella* Lignieres 1900 (Approved Lists 1980), rejection of the name *Salmonella choleraesuis*(Smith 1894) Weldin 1927 (Approved Lists 1980), and conservation of the name *Salmonella typhi* (Schroeter 1886) Warren and Scott 1930 (Approved Lists 1980). Request for an Opinion. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v.48, p.927-930, 1999.

FERRREIRA, A.J.P; ITO, N.M.K.; BENEZ, S.M. Infecção natural e experimental por *Salmonella enteritidis* em pintos. In: **Conferência Apinco de Ciência e Tecnologia Avícolas**, 1990, p. 171, Campinas, SP. Anais. Campinas: FACTA, 1990.

FUGIKURA, W. S. Situação e perspectivas da coturnicultura no Brasil. **Simpósio Internacional de coturnicultura**, 1., 2002, Lavras. Anais. Lavras, p.1, 2002.

GAMA, N.M.S.Q.; BERCHIERI J.R.A.; FERNANDES, S.A. Occurrence of *Salmonella* sp. In laying hens. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v.5, p.15-21, 2003.

GARCIA, E.A. PIZZOLANTE, C.C. Nutrição de codornas para postura. **II Simpósio Internacional de coturnicultura**, 2004, Lavras. Anais... p. 65-76, 2004.

GAST, R.K.; BEARD, C.W. Detection and enumeration of *Salmonella enteritidis* in fresh and stored eggs laid by experimentally infected hens. **Journal Food Protection**, v.55, p.152-6, 1992.

GAST, R.G. *Salmonella* Infections. In: Diseases of Poultry. 10th. Calnek, B.W., H.J. Barnes, C.W. Beard, L.R. McDougald and Y.M. Saif. ed.**The Iowa State University Press**, Iowa. p.81-82, 1997.

GILBERT, A. B.; PEDDIE, J.; MITCHELL, G. G.; TEAGUE, P. W. The egg laying response of the domestic hen to variation in dietary calcium. **British Poultry Science**, Abingdon, v. 22 p. 537–548, 1981.

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

HUMPHREY, T.J. Growth of salmonellas in intact shell eggs: Influence of storage temperature. **Veterinary Record**, p.126: 292, 1990a.

HUMPHREY, T.J.; WHITEHEAD, A.H.; GAWLER, A.H.L.; HENLEY, A.; ROWE, B. Numbers of *Salmonella enteritidis* in the contents of naturally contaminated hens' eggs. **Epidemiology Infection**, v.106, p.489-96, 1991.

HUMPHREY, T.J. Contamination of eggshell and contents with *Salmonella enteritidis*: a review. **International Journal Food Microbiology**, v.21, p.31-40, 1994.

LATIMER, H.K., JAYKUS, L.A.; MORALES, R.A.; COWEN, P.; CRAWFORD-BROWN, D. Sensitivity analysis of *Salmonella enteritidis* levels in contaminated shell eggs using a biphasic growth model. **International Journal Food Microbiology**, v. 75, p.71-87, 2000.

LIFSHITZ, A.; BAKER, R.C.; NAYLOR, H.B. The relative importance of chicken egg exterior structures in resisting bacterial penetration. **Journal Food Science**. v. 29, p.94-99, 1964.

MASUKAWA, Y.; MORAES, V.M.B, ARIKI, J.; PEDROSO, A.A.; SALVADOR, D. Efeitos dos níveis de cálcio sobre o desempenho produtivo e qualidade dos ovos de codornas japonesas (*Coturnix coturnix japonica*). In: **Conferência APINCO de Ciência e Tecnologias Avícolas**, Curitiba, PR. Anais. Campinas: FACTA, p.35, 1996.

MAYES, F.J.; TAKEBALLI, M., A. Microbial contamination of the hen's egg: a review. **Journal Food Protection**, v.46, p.1092-1098, 1983.

MINE, Y., OBERLE, C., KASSAIFY, Z. Eggshell matrix proteins as defense mechanism of avian eggs. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.51, p.249-253, 2003.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL – NRC. Nutrient requirements of poultry. 9 ed. **Washington: National Academic Press**, p.155, 1994.

OLIVEIRA, E.G.; ALMEIDA, M.I.M. Algumas informações sobre nutrição de codornas para corte. In: **Simpósio Internacional de coturnicultura**, 02, 2004, Lavras, Anais. Lavras: UFLA. p.53-64, 2004.

OLIVEIRA, D.D.; SILVA, E.N. Salmonela em ovos comerciais: ocorrência, condições de armazenamento e desinfecção da casca. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.52, p.655-61, 2000.

PADRON, M.N. *Salmonella typhimurium* penetration through the eggshell of hatching eggs. **Avian Diseases**, v.34, p.463-465, 1990.

PEDROSO, A.; MORAES, V.M.B.; ARIKI, J. et al. Níveis de cálcio e fósforo na ração sobre o desempenho e qualidade dos ovos de codornas japonesas. **Ars Vet.**, v.15, n.2, p.135–139, 1999.

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

RAJU, M.V.L.N.; RAO, P.V.; REDDY, V.R. Effect of dietary calcium and inorganic phosphorus on the performance of laying coturnix quail. **Ind. J. Anim. Sci.**, 62(11), p.1072-1076, 1992.

SAUTER, E.A.; PETERSEN, C.F. The effect of egg shell quality on penetration by various *Salmonellae*. **Poultry Science**, v.53, p.2159-2162, 1974.

SCHERER, C.; NUNES, R. V.; POZZA, P C.; NUNES, C. G. V.; ROCHA, L. D.; KÜHL, R. Avaliação dos teores de cálcio para poedeiras semipesadas durante a fase de pré-postura, In: **Conferência APINCO de Ciência e Tecnologia Avícola**, 22., 2004, Santos. Anais... Santos: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícola, p.98, 2004.

SCHOENI, J.L.; GLASS, K.A.; MCDERMOTT, J.L.; WONG, A.C.L. Growth and penetration of *Salmonella enteritidis*, *Salmonella heidelberg* and *Salmonella typhimurium* in eggs. **International Journal Food Microbiology**, v.24, p.385-396, 1995.

SILVA, E.N.; BOSQUIROLI, S.L. Epidemiological occurrence of *Salmonella* in a broiler integrated company. In: **World Poultry Congress**, 22, 1996, New Delhi. Anais. New Delhi: WPSA, 1996.

TAVECHIO, A.T.; GHILARDI, A.C.R.; PERESI, J.T.M.; FUZIHARA, T.O .; YONAMINE, E.K.; JAKABI, M.; FERNANDES, S.A. *Salmonella* serotypes isolated from nonhuman sources in São Paulo, Brazil, from 1996 through 2000. **Journal Food Protection**, v.65, p.1041-1044, 2002.

TRANTER, H.S.; BOARD, R.G. The antimicrobial defense of avian eggs: biological perspective and chemical basis. **Journal of Applied Biochemistry**, v.4, p.295-338, 1982.

VANDEPOPULIERE, J. M.; LYONS, J. J. Effect of inorganic phosphate source and dietary phosphorus level on laying hen performance and eggshell quality. **Poultry Science**, Champaign, v.71, p.1022-1031, 1992.