

**UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR *Salmonella enterica* SUBSP  
*enterica* SOROVAR Kottbus EM PINTOS DE CORTE DE UM  
DIA E EM OVOS FÉRTEIS SPF.**

**Simone Alves Mendes Ribeiro**

**Orientador: Prof. Dr. Ângelo Berchieri Jr.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre no Programa de Medicina Veterinária (Patologia Animal).

Jaboticabal – São Paulo

Fevereiro de 2004

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**SIMONE ALVES MENDES RIBEIRO** - Nascida em 20 de dezembro de 1970, natural de Uberlândia, Estado de Minas Gerais, é formada em Medicina Veterinária no ano de 1994, pela Universidade Federal de Uberlândia. Atualmente inscrita no Conselho Regional de São Paulo sob nº 09973. Ingressou na área avícola em janeiro de 1995, na Cooperativa dos Avicultores de Catalão – GO, na qual assistiu criações de frango de corte. No mesmo período foi representante da Organização das Cooperativas de Goiás (OCG) em reuniões do Plano Nacional de Sanidade Avícola (PNSA). Em novembro de 1996 foi contratada pela Fundação Apinco de Ciência e Tecnologia Avícolas para trabalhar no Laboratório Regional de Apoio Animal (LARA) do Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento (MAPA). Desde então, atuante no Setor Aviárias, o qual tem suas atividades fundamentadas no PNSA e no controle de qualidade de vacinas utilizadas pela avicultura nacional. Em maio de 2001 passou a ser a responsável pela Área de Bacteriologia do Setor Aviárias, função que desempenha até o momento.

E-mail: [simone\\_ribeiro2002@yahoo.com.br](mailto:simone_ribeiro2002@yahoo.com.br)

Agradeço a Deus,

“Teu Senhor, é o poder, a grandeza, a honra, a vitória e a majestade; porque teu é tudo quanto há nos céus e na terra; teu Senhor é o reino.” (I Crônicas 29:11).

Ao meu esposo Denilson, por todo o amor,  
carinho, estímulo e compreensão da minha ausência  
durante a realização deste curso.

À minha filhinha Isabelle,  
por ser o presente de Deus em nossas vidas  
e por ter sempre um sorriso em seu rosto.

**Dedico**

Aos meus pais Norvandır (*in memorian*) e Nilde,  
que sempre me amaram e através deste amor souberam disciplinar, ensinar a  
ser humilde, valorizar as pessoas e lutar pelos ideais.

À minha irmã Francielle,  
pelo seu amor, amizade e por ser tão prestativa, em todos os  
momentos que precisei de sua ajuda para cuidar de minha filha.

**Ofereço**

## AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Jaboticabal, especialmente ao Departamento de Patologia Veterinária, pela acolhida e aprendizagem.

Ao Prof. Doutor Ângelo Berchieri Júnior pela amizade, incentivo, orientação e disponibilidade em me ajudar, todas as vezes em que se fez necessário.

À amiga Gláucia pelo apoio, auxílio e amizade durante a execução deste trabalho.

Ao Prof. Doutor Hélio José Montassier e sua esposa Fátima pelos ensinamentos, amizade e compreensão.

À amiga Lurdinha pela amizade, auxílio e pelos momentos de descontração.

À Fundação Apinco de Ciência e Tecnologia Avícolas pela oportunidade de realização deste curso.

À Fundação Oswaldo Cruz pela identificação da bactéria estudada.

À empresa Cobb-Vantress pela doação das aves utilizadas durante o experimento.

Ao Laboratório Regional de Apoio Animal do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, pela disponibilidade de recursos financeiros utilizados durante todo o experimento.

Ao Dr. José Guedes Deák pelo apoio e incentivo.

À Dra. Gonçala Arita pelo estímulo à pós-graduação.

À Dra. Maria Ângela Orsi pela amizade, incentivo, confiança em nosso trabalho e principalmente pela oportunidade.

Ao Dr. Luciano Doretto Júnior pela amizade, incentivo e colaboração no ingresso à pós-graduação.

Aos amigos André, Shirley e Analí pela amizade, companheirismo e auxílio na execução deste trabalho.

Ao Luís Carlos pelo apoio fundamental durante o experimento.

Aos funcionários do Setor Meios de Cultura e Histocultura pelo preparo de meios e pela amizade.

A todos do Setor Aviárias pelos momentos que estivemos juntos, sejam estes de alegrias ou não.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram não somente para a realização deste trabalho, como também para o meu aprimoramento profissional.

## SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	x
RESUMO.....	xi
SUMMARY.....	xiii
I. INTRODUÇÃO.....	1
II. OBJETIVOS.....	3
III. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
IV. MATERIAL E MÉTODOS.....	13
4.1. Preparo da amostra.....	13
4.1.1. Preparo, purificação e caracterização da bactéria.....	13
4.2. Estudo da infecção em aves jovens.....	13
4.2.1. Preparo das amostras.....	14
4.2.2. Aves utilizadas no experimento.....	14
4.2.3. Controle bacteriológico das aves .....	14
4.2.4. Ensaio experimental.....	14
4.2.5. Colheita de amostras.....	15
4.2.5.1. Suabes cloacais.....	15
4.2.5.2. Amostras de órgãos e conteúdo cecal.....	15
4.2.6. Procedimento microbiológico.....	15
4.2.6.1. Suabes cloacais.....	15
4.2.6.2. Amostras de órgãos e conteúdo cecal.....	15
4.3. Estudo da infecção de ovos.....	16
4.3.1. Inoculação.....	16
4.3.2. Contaminação da casca.....	16
4.3.3. Controle bacteriológico dos ovos.....	16



4.3.4. Procedimento microbiológico.....	17
V. RESULTADOS.....	18
VI. DISCUSSÃO.....	23
VII. CONCLUSÕES.....	27
VIII. REFERÊNCIAS .....	28

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1	Número de <i>Salmonella</i> Kottbus ( $\text{Log}_{10}$ ) em amostras de fígado, baço e conteúdo cecal colhidas de pintos de corte de um dia inoculados diretamente no papo.	20
Tabela 2	Isolamento de <i>S. Kottbus</i> a partir de suabe cloacal de pintos de corte de um dia, inoculados diretamente no papo.	21
Tabela 3	Isolamento de <i>S. Kottbus</i> a partir de ovos embrionados SPF, experimentalmente contaminados via casca e via saco alantóide, utilizando como inóculo cultura diluída a $10^{-5}$ e de ovos controles.	22

## **INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR *Salmonella enterica* SUBSP *enterica* SOROVAR Kottbus EM PINTOS DE CORTE DE UM DIA E EM OVOS FÉRTEIS SPF.**

**RESUMO-** A amostra utilizada neste trabalho foi *Salmonella enterica subsp enterica* sorovar Kottbus (6,8:e,h:1,5) isolada de patos importados de um dia de idade no Laboratório Regional de Apoio Animal (LARA) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) do Brasil. Devido à falta de informação disponível sobre esta *Salmonella* e tendo sido isolada de aves de um dia de idade, foi delineado este estudo para avaliar a infecção de aves comerciais de um dia de idade por esta bactéria. *S. Kottbus* foi inoculada oralmente em pintos de corte de um dia de idade, os quais foram divididos em três grupos: 20 aves receberam 0,1mL da cultura não diluída de *S. Kottbus* contendo  $10^8$  fcu/mL, 20 aves de outro grupo receberam a mesma quantia da cultura diluída a  $10^{-3}$  e 10 aves foram utilizadas como controle. Os resultados foram similares nos dois grupos infectados: suabes cloacais demonstraram que a bactéria estava presente nas fezes 24 hs após a infecção e persistiu até o fim do experimento (42 dias pós-infecção - dpi). Aos 15 e 42 dpi, realizou-se a necrópsia de aves para exame bacteriológico e analisou-se o conteúdo cecal, fígado e baço. Aos 15dpi havia a presença de células viáveis de *S. Kottbus* em todos os órgãos. No entanto, aos 42 dpi a *Salmonella* estava presente em algumas aves e com pequeno número de células viáveis no fígado e baço, enquanto que no conteúdo cecal permanecia grande número de células em quase todas as aves analisadas.

Estudo adicional foi conduzido com ovos embrionados Specific Pathogen Free – SPF, os quais foram divididos em três grupos: 10 ovos infectados através da casca com o auxílio de um suabe estéril embebido em cultura de *S. Kottbus* diluída a  $10^{-3}$ , 10 inoculados diretamente no interior do ovo e 10 ovos controle. O grupo que teve a casca contaminada não produziu embriões infectados. Todos os ovos infectados internamente apresentaram-se positivos à pesquisa da bactéria e apenas uma ave deste grupo nasceu. Esta ave contaminou outra que não havia sido inoculada, durante o nascimento dentro da máquina incubadora de ovos.

Os resultados deste trabalho sugerem que se *S. Kottbus* estiver presente em ovos ou em aves comerciais de um dia de idade poderá facilmente se disseminar por toda a cadeia produtiva da avicultura comercial.

**Palavras-chave:** avicultura, *Salmonella* Kottbus, salmonelose, ovos embrionados, transmissão

**EXPERIMENTAL INFECTION BY *Salmonella enterica* SUBSP *enterica* SEROVAR  
Kottbus IN DAY-OLD COMMERCIAL BROILER CHICKEN AND IN SPF  
EMBRIONATING EGGS.**

**SUMMARY** – The strain used in this work was a *Salmonella enterica* subsp *enterica* serovar Kottbus (6,8:e,h:1,5) isolated from imported day-old duckling by the Laboratório Regional de Apoio Animal do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento of Brazil. In view of the lack of information available about this *Salmonella* and also because it was detected in day-old imported birds, this study was carried out to assess day-old commercial birds to assessed the chicks infection potential by it. *S. Kottbus* was inoculated in day-old commercial broiler chick orally. The birds were placed in three groups: One group of of 20 birds received 0.1 mL of the neat culture of *S. Kottbus*, containing approximately  $10^{8-9}$  fcu/mL, the second group of 20 birds received the culture diluted at  $10^{-3}$  and the third group of 10 birds received nothing (control). The results were similar to both infected groups of birds. Cloacal swabs done showed the bacterium was presented in the feces from the next day after the experimental infection till the end of the trial (42 day post-inoculation). At 15 and 42 days post-inoculation (dpi), some birds were killed for bacteriological examination of the caecal contents, liver and spleen. At 15 dpi viable count of *S. Kottbus* was obtained in all of them, however, at 42 dpi *Salmonella* was presented in the feces of few birds but uncountable in the liver and spleen while it still remained in large amount in the caecal contents of almost all examined birds.

An additional study was done with specific-pathogen-free embryonating chicken eggs, which were infected either by cotton swab soaked in *S. Kottbus* broth culture and spread on the shell (10 eggs) or by inoculation of the broth culture in the chorioallantoic sac (10 eggs) and control (10 eggs received nothing). The contamination on the shell did not yield infected embryos. Only one bird was born from the eggs inoculated internally. This bird contaminated one bird born from an noninoculated egg which was hatched together. From those dead embryos *Salmonella* was recovered from cecum, liver and spleen.

The results from this work suggest that whether *Salmonella* Kottbus is present in eggs or in day-old commercial chicken spread out along commercial poultry flocks.

**Key-words:** embrionated eggs, poultry, *Salmonella* Kottbus, salmonelosis, transmittion

## I. INTRODUÇÃO

Na atualidade, as salmoneloses têm sido a causa mais comum de enfermidades de origem alimentar em humanos, exteriorizando-se pelas suas características de endemicidade, morbidade e pela dificuldade de seu controle.

As salmonelas estão amplamente difundidas na natureza e são capazes de infectar o homem e os animais, provocando gastroenterites e doenças sistêmicas.

O sistema intensivo adotado em avicultura favorece a introdução e a disseminação de salmonelas. A transmissão vertical tem sido considerada a via que originou os surtos em vários países. Tendo em vista que a avicultura brasileira depende da importação de aves avós, é possível postular que salmonelas são introduzidas nos plantéis brasileiros através de aves importadas. Ressalta-se que os surtos ocorridos mundialmente, provocados por *Salmonella* Enteritidis, deveram-se à disseminação da bactéria pela via vertical. Surtos esses que também ocorreram no Brasil e que culminaram com a inclusão do controle de *Salmonella* sorotipos Gallinarum, Pullorum, Typhimurium e Enteritidis no Programa Nacional de Sanidade Avícola. As normas estabelecidas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento (MAPA) prevêm, em plantéis avícolas, a investigação e o controle dos sorotipos mencionados anteriormente. No entanto, outras salmonelas isoladas de aves já foram identificadas como agentes etiológicos de salmoneloses humanas e animais como *Salmonella* Agona, *S. Infantis*, *S. Heidelberg*, *S. Senftenberg*, etc..

No Brasil, *Salmonella enterica* subsp *enterica* serovar Kottbus (6,8:e,h:1,5) foi isolada de aves importadas - patos e marrecos de um dia de idade - pela primeira vez em 1999. *Salmonella* Kottbus tem sido associada a casos humanos e animais de salmonelose.

Diante desse quadro, em vista de *Salmonella* Kottbus ter sido isolada pela primeira vez e, de aves importadas, elaborou-se um plano de trabalho para estudar experimentalmente o comportamento desse sorotipo de *Salmonella* em aves recém nascidas e em ovos.

Seria oportuno observar os resultados decorrentes da presença dessa *Salmonella* em aves recém-nascidas e em ovos férteis.



## II. OBJETIVOS

- Devido à escassa literatura com referência à *Salmonella* Kottbus em aves, a qual foi introduzida em nosso país através de aves importadas recentemente, elaborou-se o trabalho com a finalidade de:

- Analisar a relação entre *Salmonella enterica* subsp *enterica* sorotipo Kottbus e aves de exploração comercial inoculadas experimentalmente, através do estudo sintomatológico das aves e a pesquisa da bactéria tanto em órgãos como em suabes cloacais.

- Estudar a implicação da presença de *Salmonella* Kottbus em ovos férteis, durante a incubação e o nascimento.

### III. REVISÃO DE LITERATURA

A salmonelose é uma zoonose de importância mundial. A ampla distribuição de espécimes do gênero *Salmonella* entre os animais e sua permanência no ambiente contribuem para que este microrganismo assuma um papel importante em saúde pública como agente de enfermidades de origem alimentar (WEISS et al, 2002).

A salmonelose é causada por organismos do gênero *Salmonella* apresentando duas espécies: *Salmonella enterica* e *S. bongori*. A espécie *S. enterica* é dividida em seis subespécies (*enterica, salamae, arizonae, diarizonae, houtenae* e *indica*). As cepas são classificadas em sorovares com base na extensa diversidade de antígenos “O” (lipopolissacarídeo) e antígenos flagelares “H” (proteína) conforme o esquema de Kauffman-White, reconhecendo-se cerca de 2.500 sorovares (OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES, 2000).

Os membros desse gênero, embora sejam primariamente invasores do trato entérico, estão difundidos no meio ambiente, sendo comumente encontrados em efluentes de granjas, esgoto humano e em materiais com contaminação fecal. Também têm sido encontrados em matérias-primas de ração, causando doença em animais, particularmente em aves e suínos (BERCHIERI JR., 1989; OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES, 2000). Casos de salmonelose têm sido reportados em quase todos os países, entretanto, parece ser mais prevalente em áreas de criações intensivas. A doença afeta, praticamente, todas as espécies de animais domésticos, sendo mais susceptíveis os animais jovens, prenhes e lactentes. Animais, especialmente suínos e aves, mantidos em sistema de criação intensivo, podem estar infectados sem demonstrar sinais clínicos, e desta forma, difundir a bactéria tanto no rebanho como para outras espécies, incluindo o homem (OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES, 2000).

Dependendo do sorovar da *Salmonella* e da espécie animal envolvida, podem haver variações no curso da infecção, nos sinais clínicos, nos achados pós-morte e na epidemiologia. Deve ser dada particular atenção ao isolamento de salmonelas de

animais com infecção subclínica, pois eles podem excretar a bactéria intermitentemente ou em pequeno número (OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES, 2000).

Segundo LIRIO et al (1998), alimentos à base de carne e ovos são os principais veículos em casos de salmonelose humana, embora muitos outros alimentos possam ser contaminados secundariamente. Analisando diversos alimentos recebidos pelo Laboratório de Controle de Alimentos da Secretaria Municipal de Abastecimento de São Paulo - SP, os mesmos autores observaram um aumento anual de isolamentos de *Salmonella*, particularmente do sorovar Enteritidis, em alimentos de origem animal, como carne de aves, ovos e derivados.

BÄUMLER et al (2000) observaram que o aumento nos casos de salmonelose em humanos ocorridos por volta de 1960 na Inglaterra e EUA coincidiram com o declínio de aves comerciais soropositivas para *Salmonella* Pullorum. Estes fatos sugerem que a eliminação de *S. Pullorum* pode ter favorecido a colonização do trato alimentar das aves por outros sorovares.

*Salmonella* Enteritidis foi inicialmente introduzida em granjas avícolas através de ratos, que são considerados um reservatório natural desta bactéria. Esta bactéria foi isolada de roedores presentes em áreas urbanas já em 1930, no entanto, somente na década de 80 *Salmonella* Enteritidis disseminou-se em grandes proporções em plantéis avícolas (BÄUMLER et al, 2000). Uma provável razão para este fato seria a infecção de lotes de aves reprodutoras, que através da via vertical disseminou-a para a progênie (LISTER, 1988). *Salmonella* Enteritidis foi isolada de roedores e de seu habitat, sendo também encontrada em tecidos fetais, sugerindo transmissão vertical. O roedor uma vez infectado, pode fazer parte da rota de infecção de aves reprodutoras de corte e postura (DAVIES et al, 1955).

Segundo PERESI et al (1998), no Estado de São Paulo, a *Salmonella* Enteritidis representou 0,4 a 1,0% de todos os sorovares isolados de infecções humanas, até meados da década de 90. Segundo esses autores, a partir de 1993, verificou-se aumento crescente no seu isolamento e, em 1995 passou a ser o sorovar predominante, correspondendo a 64,9% dos isolamentos de material de origem humana e 40% de outras origens.

BAÚ et al (2001), analisando amostras de produtos procedentes de frangos encontraram prevalência de 10,48% de amostras contaminadas por *Salmonella*. Após caracterização, observaram que em 77% destas amostras contaminadas havia a presença de *Salmonella* Enteritidis. Este alto índice confirma uma tendência que vem ocorrendo mundialmente, desde o fim da década passada (RODRIGUE et al, 1990).

Considerado como um microrganismo de ampla disseminação, a *Salmonella* é capaz de se difundir com facilidade através dos alimentos, a partir de um produto contaminado. O isolamento de *Salmonella* Enteritidis em alimentos não considerados veiculadores, sugere a ocorrência de contaminação cruzada durante o preparo. Este fato demonstra a importância das boas práticas de higiene no preparo de alimentos e reforça a necessidade da implantação de programas de orientação a manipuladores dos mesmos (PERESI et al, 1998).

Na Suécia, o fator mais importante na prevenção da contaminação por *Salmonella* é o controle de aves importadas. As aves devem possuir certificado de origem como livres de *Salmonella* e, após ingresso, sofrem quarentena durante 15 semanas, período durante o qual são submetidas a quatro exames bacteriológicos. Caso o microrganismo seja isolado, as aves são sacrificadas. Desta forma, naquele país, os ovos e poedeiras estão livres de *Salmonella*, devido à introdução de regulamentos governamentais desde 1961 (GREIN et al, 1997).

Considerando a importância da produção avícola para a economia do Brasil e os avanços obtidos pelo setor que posicionavam o país em segundo lugar no mercado internacional de carne de aves, instituiu-se o Programa Nacional de Sanidade Avícola em setembro de 1994 (BRASIL, 1994). A estrutura dos serviços veterinários públicos e privados permite dar apoio ao setor nas áreas de campo, laboratório e inspeção de produtos de origem animal. Além disso, a atual situação sanitária da avicultura viabiliza a implantação de estratégias de combate e/ou erradicação dos principais agentes infecciosos de interesse em avicultura e saúde pública, entre os quais as salmonelas. Em agosto de 1999, foram aprovadas as Normas Técnicas para Controle e Certificação de Núcleos e Estabelecimentos Avícolas, como Livre de *Salmonella* Gallinarum e de *S. Pullorum* e Livre ou Controlado para *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* (BRASIL, 1999). A

colheita de material de aves e ovos importados para realização de exames laboratoriais é realizada, por ocasião da inspeção veterinária no local de entrada (fronteira) e encaminhado ao laboratório oficial - Laboratório Regional de Apoio Animal (LARA) em Campinas. O lote de aves importadas é então encaminhado à granja, na qual permanecem por um período mínimo de 30 dias em isolamento e a liberação do mesmo fica condicionada aos resultados oficiais (BRASIL, 1999).

A literatura consultada demonstra a importância e a implicação da presença de *Salmonella* em animais, sobretudo, quando são criados em sistema de confinamento, favorecendo a disseminação de microrganismos excretados junto com as fezes. Em alguns casos, mesmo que o ovo não contenha *Salmonella*, ele acaba sendo contaminado durante a passagem pela cloaca devido à presença de *Salmonella* nas fezes (FORSYTHE et al, 1967) . OKAMURA et al (2001b), após inoculação intravaginal de *S. Enteritidis* e análise da postura de aves, observaram que 25% dos ovos estavam contaminados e que a bactéria estava presente apenas na superfície interna da casca. Entretanto, *Salmonella* foi encontrada nas fezes destas aves, indicando que pode ocorrer contaminação indireta durante a postura. Entretanto, OKAMURA et al (2001a), analisando sorovares de *Salmonella* quanto à capacidade em infectar órgãos, observaram que alguns colonizam mais freqüentemente os órgãos do trato reprodutivo, podendo redundar em ovos contaminados, enquanto que outros restringem-se ao fígado, baço e ceco.

Fica claro ainda, que no caso de aves, as salmonelas que conseguem ser transmitidas para a progênie, são mais difíceis de serem combatidas. Ocorrerá a disseminação através das fezes nos primeiros dias, perpetuando-se na granja até a fase adulta, resultando na produção de aves e ovos contaminados (GAMA et al, 2003; GAST et al, 1998; ZANCAN et al, 2000).

Pouco se conhece a respeito da relação hospedeiro-parasita entre *Salmonella* Kottbus e aves de exploração comercial. A literatura consultada refere-se à presença deste sorovar acometendo diversas espécies de animais, inclusive o ser humano. No Brasil, esta salmonela foi introduzida através de aves recém-nascidas importadas, sugerindo transmissão vertical (GALETTI et al, 1999).

A falta de conhecimento a respeito da epidemiologia de salmoneloses aviárias pode gerar enormes transtornos para a avicultura industrial. Na década de 70, *Salmonella* Agona foi introduzida em granjas através da utilização de farinha de peixe oriunda do Peru, desencadeando um processo mundial de salmonelose em aves e em seres humanos em decorrência da ingestão de produtos de origem avícola (CLARK & THATCHER, 1973). Posteriormente, *Salmonella* Agona passou a ser isolada com certa frequência de componentes de ração para aves, de aves (BERCHIERI JR., 2000; HOFER et al, 1998) e historicamente, tem estado entre os quatro mais isolados de seres humanos no Brasil (TAVECHIO et al, 1996).

Na década de 80, *Salmonella* Enteritidis, de forma rápida e astronômica, passou a ser a maior preocupação mundial referente aos casos humanos de salmonelose (RODRIGUE et al, 1990; TAUNAY et al, 1996). Segundo TAVECHIO et al (2002), de um total de 4.581 isolamentos de *Salmonella* pelo Instituto Adolfo Lutz – SP – Brasil, entre 1996 e 2000, *Salmonella* Enteritidis foi o sorovar predominante, correspondendo a 32,7% dos isolados. A difusão mundial deu-se através da via vertical (BÄUMLER et al, 2000). Essa explosão foi responsável pela formação de grupos de trabalho para estudar e prevenir a infecção de aves de exploração comercial e a enfermidade em seres humanos. No Brasil, resultou no PNSA (BRASIL, 1994). Contudo, o PNSA está voltado para quatro sorovares de *Salmonella*, não contemplando da mesma maneira, as demais salmonelas. Diante desse cenário, a avicultura industrial continuará sendo vulnerável aos fenômenos microbiológicos envolvendo salmonelas.

Os conhecimentos a respeito da relação entre salmonelas paratíficas e aves são restritos a alguns sorovares, devido a importância que têm em saúde animal e saúde pública. Alguns se restringem ao trato digestivo, enquanto outros são mais invasivos.

A relação parasita-hospedeiro entre diferentes sorotipos de *Salmonella* e aves comerciais pode ser avaliada experimentalmente através da inoculação oral de pintos de um dia e acompanhamento das aves até a idade adulta (SMITH et al, 1980; BARROW et al, 1987; GAST et al, 1992; GAST et al, 1998; MUIR et al, 1998).

SMITH et al (1980), após inoculação oral de pintos de um dia com amostras de *Salmonella* Typhimurium, observaram que as mesmas variavam na capacidade em

provocar mortalidade. Amostras oriundas de toxinfecção alimentar foram praticamente não letais para aves com dois dias de idade inoculadas oralmente; já em aves com um dia, a letalidade era alta, sendo que a excreção do microrganismo via fezes persistia por várias semanas em ambos os grupos. MUIR et al (1998), após a inoculação oral de *Salmonella* Typhimurium observaram que a porcentagem de isolamento em amostras de órgãos decresce com o tempo, mas a excreção via fezes persiste por um longo período. BARROW et al (1988) encontraram resultado semelhante a respeito de *Salmonella* Typhimurium.

Analisando a excreção fecal de aves inoculadas aos quatro dias de idade com um sorotipo de *Salmonella*, SMITH et al, (1980), observaram diferenças entre os períodos de excreção entre os grupos de aves. Aves infectadas por *Salmonella* Infantis, *Salmonella* Heidelberg e *Salmonella* Menstson, eram capazes de excretar a bactéria pelo período de até 41 dias. Inoculadas com *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Senftenberg, *Salmonella* Oranienburg, *Salmonella* Montevideo e *Salmonella* Anatum, excretavam por período não muito superior a 15 dias. Aves infectadas por *Salmonella* Agona corresponderiam a um grupo intermediário, com excreção variando entre os dois anteriores.

No que concerne ao sorotipo Kottbus, os relatos são escassos e variados.

Nos EUA, durante o período de 1968 a 1998, a média de salmonelose humana foi de 43 casos por ano segundo o Sistema de Informação do Laboratório de Saúde Pública (CENTER OF DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2002). De acordo com esse documento, de fevereiro a maio de 2001, ocorreu infecção por *S. Kottbus* em 23 seres humanos após ingestão de brotos de alfafa. O Departamento de Serviço de Saúde da Califórnia observou que este foi o segundo caso associado a este sorovar desde 1985 e o primeiro associado com este tipo de alimento. Os pacientes residiam na Califórnia e 21 desenvolveram diarreia aguda, sendo que três apresentaram infecção do trato urinário e três foram hospitalizados. Os brotos podem ter sido contaminados durante a produção da semente, germinação, processamento ou manejo durante o preparo para consumo. Na lavoura, podem ser contaminados pelo uso de água não tratada, fertilizantes, excreção de animais ou limpeza inadequada de

máquinas utilizadas na colheita (CENTER OF DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2002).

Entre 21 cepas de *Salmonella*, isoladas na Líbia a partir de crianças sadias e com diarreia, uma era pertencente ao sorotipo S. Kottbus (EL\_GHODBAN et al, 2002). A cepa de S.Kottbus apresentava multi-resistência a drogas antimicrobianas, a qual era mediada por plasmídeo.

Segundo NELIUS et al (1969), muitas infecções por *Salmonella* processam-se como gastroenterites. Entretanto, 1/30 dos casos evoluem para processos septicêmicos, sendo que quase todos são fatais. Estes autores relataram um caso de septicemia por S. Kottbus em paciente com leucose mielóide crônica. Neste caso, a doença hematológica foi o fator decisivo, mas se o paciente for bebê, idoso ou possuir doença imunossupressora pode também haver favorecimento de doença septicêmica (NELIUS et al 1969).

O desencadeamento de salmonelose em seres humanos acometidos por S. Kottbus pode ocorrer mesmo após a ingestão de um pequeno número de células bacterianas, conforme observação de RICHARDSON et al (2002), em pessoas após a ingestão de chocolate. Esses autores sugerem que os componentes do alimento possam ser capazes de neutralizar a ação dos sucos gástricos ou conter substâncias que protegem a bactéria contra as condições ácidas do estômago, favorecendo assim que pequeno número destes microrganismos possam colonizar o trato gastrointestinal e provocar o aparecimento de sintomas clínicos.

Dos 207 casos de eqüinos hospitalizados com salmonelose no Hospital de Medicina Veterinária da Universidade da Califórnia (EUA) , ocorridos no período de 11 anos, S. Kottbus foi responsável por 5,7% dos casos e 21,4% da mortalidade observada. Esta doença é o maior problema entre eqüinos em hospitais veterinários. Durante o curso da enfermidade é produzido grande volume de fezes líquidas, causando a contaminação do ambiente e infectando o homem e outros animais (CARTER et al, 1986)

IONOVA et al (1981), estudando a distribuição de *Salmonella* em carcaças e órgãos de bovinos e suínos durante o abate na Bulgária, encontraram 4,29% de suínos



contaminados pela bactéria. Entre os sorovares isolados de suínos encontrava-se *Salmonella* Kottbus. No Brasil, SANTOS et al (2000), analisando amostras de carcaças de frango congeladas encontrou 32% delas contaminadas por *Salmonella*. Segundo JAKABI et al (1999), o consumo de alimentos à base de aves e ovos contaminados por *Salmonella* tem sido a via mais comum de transmissão destes microrganismos para o homem. Portanto, tendo *Salmonella* Kottbus sido encontrada em aves importadas, ela poderia também ser facilmente disseminada em alimentos de origem animal.

MIAN et al (2002), estudando *Musca domestica* oriunda de granjas avícolas na Califórnia, EUA, isolaram *Salmonella* Kottbus, sendo mais expressivo o isolamento em fêmeas.

HOSZOWSKI et al (2002), analisando 791 amostras de *Salmonella* isoladas em laboratórios veterinários na Polônia, em 2001, encontraram 32 sorovares, entre os quais, *S. Kottbus*, procedente de patos.

No Reino Unido, entre outubro e dezembro de 2002, foram observados 15 lotes de carneiros contaminados por *Salmonella*, enquanto que no mesmo período de 2001 apenas nove lotes haviam sido contaminados com a bactéria (VETERINARY LABORATORIES AGENCY, 2003). Foram observados quatro sorovares, entre estes, *S. Kottbus*, a qual havia sido isolada de cordeiros pertencentes a um grupo de 200 animais, sendo que 16 deles morreram no período de três dias.

Apesar de existirem poucos relatos na literatura, os casos de salmonelose por *S. Kottbus* apresentam-se principalmente como diarreia aguda de mortalidade variável. Foram observados em eqüinos, carneiros, suínos, patos, além do homem e em insetos próximos a granjas avícolas. Pelo exposto, nota-se que *S. Kottbus* é agente causal de salmonelose em várias espécies inclusive no homem. No entanto, no Brasil, este sorovar é desconsiderado, levando-se em conta que o PNSA assegura apenas que todos os lotes de aves importadas estejam livres de *S. Gallinarum*, *S. Pullorum*, *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis*. Lotes contaminados com qualquer uma destas salmonelas é imediatamente sacrificado, fato que não ocorre com outro sorovar.

Nas circunstâncias atuais, é possível que lotes de aves importadas, contaminados por salmonelas não contempladas pelo PNSA estejam disseminando-as

no plantel avícola nacional e, muito provavelmente, entre outras espécies, inclusive o homem.

## IV. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1- Preparo da amostra

#### 4.1.1-Preparo, purificação e caracterização da bactéria

A cepa de salmonela utilizada neste trabalho foi isolada de patos importados com um dia de vida pelo Laboratório Regional de Apoio Animal (LARA) e identificada pela Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ como *Salmonella enterica* subsp *enterica* serovar Kottbus (6,8:e,h:1,5).

O preparo da cepa resistente ao ácido nalidíxico seguiu a metodologia utilizada por BARROW et al (1988). Uma cultura desta cepa de *S. Kottbus* em caldo infusão de cérebro e coração (BHI) (Oxoid CM225), foi incubado a 37°C/24 horas em agitação. A seguir, a cultura foi centrifugada a 4.000 rpm sob refrigeração e o sedimento foi ressuspenso em 1mL de tampão fosfato pH 7,4 (PBS), o qual foi semeado em placa de ágar verde brilhante (Merck 7232) contendo novobiocina (40µg/mL) e ácido nalidíxico (25µg/mL) (VBNalNov). Após incubação a 37°C/24 horas, colônias emergentes não fermentadoras de lactose foram semeadas em ágar VBNalNov. Esta operação foi repetida oito vezes. Posteriormente, uma colônia foi submetida ao antibiograma para confirmação da resistência ao ácido nalidíxico. Prosseguindo, submeteu-se a bactéria a testes com soros anti-antígenos somáticos e flagelares de *Salmonella* (Probac®) e selecionou-se uma colônia para utilização no presente estudo.

#### 4.2- Estudo da infecção em aves jovens

A metodologia para infecção em aves jovens seguiu o modelo utilizado por BARROW et al (1988) com algumas variações, exceto para o procedimento microbiológico.

#### **4.2.1-Preparo das amostras**

*Salmonella* Kottbus foi semeada em caldo BHI que foi incubado a 37°C/24 horas em agitação. Após este período, preparou-se dois inóculos: um contendo a cultura de 24 horas em caldo BHI, contendo  $1,2 \times 10^8$  unidades formadoras de colônias/mL (UFC/mL) (cultura sem diluição) e o outro contendo a cultura diluída em PBS a  $10^{-3}$  (cultura diluída a  $10^{-3}$ ).

#### **4.2.2-Aves utilizadas no experimento**

Para a realização dos experimentos, utilizou-se pintos de um dia de idade, da linhagem de corte Cobb, mantidos pelo LARA – Campinas/SP. O experimento foi conduzido em isoladores com controle de temperatura, luminosidade e ventilação, com nível de biossegurança dois. As aves foram separadas em dois grupos de 20 animais, por isolador, que receberam água e ração esterilizadas, à vontade.

#### **4.2.3-Controle bacteriológico das aves**

Além das 40 aves utilizadas durante o experimento, outras 10 aves do mesmo lote foram examinadas quanto à presença de *Salmonella*. Estas aves foram sacrificadas e colheu-se o fígado das mesmas, armazenando-os em gral. Após colheita, cada pool de amostra foi macerado e posteriormente, inoculado em caldo Selenito (Merck 107717) com novobiocina (40µg/mL) (SN) na proporção de 1:10. O mesmo procedimento foi realizado para amostras de baço, gema e conteúdo cecal. Os caldos foram incubados a 37°C/24 horas, depois foram semeados em ágar VBNalNov e incubados a 37°C/24 horas.

#### **4.2.4-Ensaio experimental**

As aves foram separadas em dois grupos de 20 aves. Em um deles as aves receberam 0,1mL da cultura sem diluição e no outro 0,1 mL da cultura diluída a  $10^{-3}$ . Em ambos, a administração foi diretamente no papo, com o auxílio de uma cânula esofágica. Duas vezes ao dia, as aves eram observadas para verificar a presença de sinais clínicos e mortalidade.

#### **4.2.5-Colheita de amostras**

##### **4.2.5.1- Suabes cloacais**

Após a inoculação de *S. Kottbus*, nos intervalos de tempo de 24 horas, 3, 7,14, 21, 28, 35 e 42 dias, colheu-se amostras de fezes da cloaca de cada ave, usando-se suabe de algodão estéril e posteriormente, cada amostra foi processada individualmente.

##### **4.2.5.2- Amostras de órgãos e conteúdo cecal**

Foram realizadas duas necrópsias durante o experimento: metade do lote de aves foi sacrificado aos 15 dias pós-infecção (dpi) e a outra metade aos 42 dpi. Colheu-se o fígado, o baço e o conteúdo cecal de cada ave e cada material foi processado individualmente.

#### **4.2.6-Procedimento microbiológico**

O procedimento microbiológico para exame dos suabes e contagem bacteriana seguiu o modelo empregado por PINHEIRO et al (2001) com algumas modificações.

##### **4.2.6.1- Suabes cloacais**

Os suabes foram semeados em ágar VBNalNov e posteriormente, colocados em tubos contendo caldo SN. A seguir, os tubos e as placas foram incubados a 37°C/24 horas. Na ausência de crescimento em placa, o suabe foi novamente semeado em placa contendo ágar VBNalNov, utilizando as mesmas condições de incubação.

##### **4.2.6.2- Amostras de órgãos e conteúdo cecal**

Realizou-se a contagem do número de células viáveis de *Salmonella* por grama de amostra analisada. Cada material foi acondicionado em frasco estéril, adicionando-se PBS na proporção de 1:10 (diluição  $10^{-1}$ ). A partir daí, foram feitas diluições seriadas decimais em PBS. Para as amostras de fígado e baço, a diluição chegou até a  $10^{-4}$  e para o conteúdo cecal até a  $10^{-6}$ . De cada diluição, transferiu-se 0,1mL para uma placa

de ágar VBNalNov, que foi incubada a 37°C/24 horas. O número de colônias de *Salmonella* presente era convertido em  $\log_{10}$ . Na ausência de crescimento, a amostra da diluição  $10^{-1}$ , recebia igual volume de caldo SN (concentração dupla), sendo que o material era incubado a 37°C/24 horas e a seguir, semeado em ágar VBNalNov, nas mesmas condições utilizadas anteriormente.

A confirmação do sorotipo era realizada mediante avaliação bioquímica presuntiva de colônias não fermentadoras de lactose e prova de aglutinação em lâmina com soro anti antígeno somático e soro anti antígeno flagelar de *Salmonella* (Probac®).

### **4.3-Estudo da infecção de ovos**

Utilizou-se 30 ovos embrionados SPF (*Specific Pathogen Free*) sem incubação e a cultura de *S. Kottbus* diluída a  $10^{-5}$  em PBS.

#### **4.3.1- Inoculação**

Para a inoculação, foram utilizados 10 ovos, sendo que após a perfuração da casca, introduziu-se com uma seringa acoplada a agulha (13x8) 0,1mL da cultura diluída a  $10^{-5}$  no interior de cada ovo, logo abaixo da membrana da casca.

#### **4.3.2- Contaminação da casca**

Com o auxílio de um suabe de algodão estéril embebido em cultura de *S. Kottbus* diluída a  $10^{-5}$ , foi realizada a contaminação da casca de 10 ovos. Este procedimento consistiu em introduzir o suabe na cultura diluída e passá-lo sobre a superfície dos ovos.

#### **4.3.3-Controle bacteriológico dos ovos**

Além dos 20 ovos infectados experimentalmente, separou-se outros 10 sem incubação para fazerem parte do grupo controle. Todos os 30 ovos foram colocados na mesma incubadora com controle de temperatura, viragem, umidade e ventilação.

#### **4.3.4- Procedimento microbiológico**

Após o sétimo dia de incubação, os ovos foram examinados com auxílio de ovoscópio para o acompanhamento do desenvolvimento embrionário. Quando constatava-se que o embrião havia morrido, colhia-se o conteúdo interno do ovo e, com o auxílio de suabe, procedia-se ao plaqueamento em ágar Hektoen (HE) (Merck 11681) que era incubado a 37°C/24 horas.

Quando ocorria nascimento, a ave era sacrificada para a colheita de fígado, gema e cecos para exame bacteriológico. Cada material colhido era macerado individualmente em gral, e colocado em caldo SN, incubando a 37°C/24 horas. A seguir, cada material era semeado em ágar Hektoen (HE) (Merck 11681) nas mesmas condições utilizadas anteriormente.

A confirmação do sorotipo era realizada mediante avaliação bioquímica presuntiva de colônias não fermentadoras de lactose e prova de aglutinação em lâmina com soro anti antígeno somático e flagelar de Salmonella (Probac®).

## V. RESULTADOS

O controle bacteriológico das aves utilizadas no experimento, não inoculadas e que foram sacrificadas no momento da chegada não revelou a presença de *Salmonella*.

Durante os experimentos, não se observou sinais clínicos sugestivos de salmonelose nas aves infectadas. Houve redução do número de aves durante a primeira semana, devido a mortalidade. Entretanto, esta não foi acompanhada de sintomatologia clínica. Morreram três aves no grupo inoculado com a cultura diluída e uma ave no grupo inoculado com a cultura pura.

Na Tabela 1 encontram-se os resultados referentes aos exames realizados 15 e 42 dias após a inoculação de *Salmonella* Kottbus nas aves.

Nas 10 aves sacrificadas 15 dpi do grupo que recebeu o inóculo de cultura sem diluição, todos os órgãos analisados (fígado e baço) apresentaram-se positivos à pesquisa de *S. Kottbus*, sendo que as contagens variavam de 3,30 a 4,9 UFC/mL. Já no grupo de nove aves que receberam a cultura diluída a  $10^{-3}$ , apenas o fígado de uma ave apresentou contagem de valor 5,30 UFC/mL, sendo que entre os demais órgãos analisados, três fígados e seis baços, apresentaram-se negativos à pesquisa de *Salmonella* Kottbus.

Entre as nove aves sacrificadas 42 dias pi do grupo que recebeu o inóculo de cultura sem diluição, todos os órgãos analisados apresentaram-se negativos à pesquisa de *S. Kottbus*, exceto um baço com contagem de valor 2,48 UFC/mL. Das oito aves analisadas que receberam o inóculo de cultura diluída a  $10^{-3}$ , apenas três fígados e três baços apresentaram-se positivos à pesquisa de *Salmonella* Kottbus.

Em todo o experimento, o número de UFC/mL de *Salmonella* foi sempre maior em amostras do conteúdo cecal em relação a amostras de órgãos, tanto para o grupo que recebeu o inóculo de cultura sem diluição quanto para o que recebeu da cultura diluída a  $10^{-3}$ . Entre as aves do mesmo grupo de inóculo observa-se que houve redução entre as contagens realizadas aos 15 dpi e aos 42 dpi, entretanto, com persistência de valores elevados em amostras de conteúdo cecal.



Durante os 42 dias de experimento procedeu-se ao exame das fezes excretadas, mediante exame de cloaca (Tabela 2).

*Salmonella* Kottbus foi isolada em aves dos dois grupos de aves inoculadas 24 horas pi, sendo que 35% das aves inoculadas com a cultura sem diluição e 25% das inoculadas com a cultura diluída a  $10^3$  apresentaram-se positivas à pesquisa de *S. Kottbus*. Aos 21 dpi todas as aves dos dois grupos excretavam a bactéria através das fezes e aos 42 dpi 55% das aves inoculadas com a cultura sem diluição e 87% das aves inoculadas com a cultura diluída a  $10^3$  ainda excretavam *S. Kottbus*.

Quanto ao exame dos ovos (Tabela 3), dos trinta utilizados no experimento, sete apresentaram mortalidade embrionária durante a primeira semana de incubação, sendo que três estavam claros (inférteis).

Dos embriões que apresentaram mortalidade durante o experimento, *Salmonella* Kottbus foi isolada de todos os ovos inoculados com a cultura diluída a  $10^3$ , enquanto que todos do grupo controle e contaminados na casca estavam negativos.

Ao final do período de incubação, observou-se nove ovos bicados: cinco cuja contaminação foi feita sobre a casca com a cultura diluída  $10^5$  e três controles (ausência de contaminação), sendo que todos apresentavam-se negativos. Além destes, havia um ovo bicado, inoculado com a cultura diluída a  $10^5$  que apresentava-se positivo.

Houve nascimento de nove pintainhos, sendo cinco do grupo controle, três que tiveram a casca contaminada e um inoculado com a cultura diluída. Entre as nove aves, duas apresentaram-se positivas à pesquisa de *S. Kottbus*.

Tabela 1: Número de *Salmonella* Kottbus em amostras de fígado, baço e conteúdo cecal colhidas de pintos de corte de um dia inoculados diretamente no papo.

nº	cultura sem diluição						cultura diluída a 10 <sup>-3</sup>					
	15 dpi			42 dpi			15 dpi			42 dpi		
	F	B	C	F	B	C	F	B	C	F	B	C
01	3,78	-	7,00	-	-	6,90	-	-	8,30	-	-	-
02	4,30	3,78	7,70	-	-	7,00	-	+	7,30	-	-	6,30
03	3,30	3,30	+	-	-	6,30	5,30	-	6,30	+	-	4,00
04	+	+	7,70	-	-	6,60	+	-	7,60	-	+	4,30
05	+	+	7,90	-	-	6,00	+	-	7,30	+	-	5,48
06	3,30	+	6,60	-	-	7,30	-	-	8,30	+	+	4,60
07	3,60	3,30	7,70	-	-	6,30	+	+	8,00	-	-	6,30
08	4,60	4,90	7,60	-	2,48	6,30	+	-	8,60	-	+	7,30
09	3,78	3,60	7,60	-	-	+	+	+	7,95	NR	NR	NR
10	4,90	4,30	7,78	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR

+ ou - = resultado positivo ou negativo para pesquisa de *Salmonella* após o cultivo em caldo SN.

F= fígado; B= baço; C= conteúdo cecal;

NR= não realizado (mortalidade na 1ª semana).

Tabela 2: Isolamento de *S. Kottbus* a partir de suabe cloacal de aves inoculadas oralmente com cultura sem diluição e cultura diluída a  $10^{-3}$ .

Tempo pi	Inoculação da cultura sem diluição				Inoculação da cultura diluída a $10^{-3}$			
	D	E	T	%	D	E	T	%
24 hs	03	04	07/20	35	02	03	05/20	25
03d	06	03	09/20	45	05	04	09/18*	50
07d	16	01	17/19*	89	06	02	08/17*	47
14d	10	07	17/19	89	13	03	16/17	94
21d	05	04	09/09**	100	06	02	08/08**	100
28d	09	00	09/09	100	04	02	06/08	75
35d	08	01	09/09	100	06	01	07/08	87
42d	04	01	05/09	55	03	04	07/08	87

D = *S. Kottbus* isolada a partir de cultivo direto;

E = *S. Kottbus* isolada após enriquecimento em caldo SN;

T = n° de aves positivas(D + E) / n° de aves examinadas;

% = valor de "T" em porcentagem;

pi = pós-inoculação;

\* redução do n° de aves devido à mortalidade;

\*\* redução do n° de aves devido ao sacrifício de metade do lote.

Tabela 3: Isolamento de *S. Kottbus* a partir de ovos embrionados SPF, experimentalmente contaminados via casca e via saco alantóide, utilizando como inóculo cultura diluída a  $10^{-5}$  e de ovos controles

Tempo de incubação	Cultura diluída a $10^{-5}$		Controle
	casca *	saco alantóide **	
07d	01 (-)	05(+)	01(-)
10d	01 (-)	-----	-----
14d	-----	02(+)	01(-)
18d	-----	01(+)	-----
Ovos bicados	05 (-)	01(+)	03(-)
Nascimentos	03	01	05
Total	10	10	10

(+) = Positivo para o isolamento de *S. Kottbus*;

(-) = Negativo para o isolamento de *S. Kottbus*.

\* contaminação superficial da casca com cultura de *S. Kottbus* diluída a  $10^{-5}$ ;

\*\* inoculação de ovos com cultura de *S. Kottbus* diluída a  $10^{-5}$ .

## VI. DISCUSSÃO

A avicultura do Brasil além de ser uma atividade de importância para o país, ocupa cada vez mais espaço no cenário internacional. Sendo assim, o controle de qualidade de seus produtos, ovos e carne, inclui obrigatoriamente a pesquisa de microrganismos patogênicos, entre eles, a *Salmonella*.

Considerada uma enfermidade de difícil controle após seu aparecimento, a salmonelose continua sendo foco de extensas investigações, não só por sua implicação como enfermidade de plantéis avícolas, como também por estar presente em surtos de origem alimentar em seres humanos.

A relação parasita-hospedeiro entre diferentes sorotipos de *Salmonella* e aves comerciais pode ser avaliada experimentalmente através da inoculação oral de pintos de um dia e acompanhamento das aves até a idade adulta (SMITH et al, 1980; BARROW et al, 1987; GAST et al, 1992; GAST et al, 1998; MUIR et al, 1998).

No presente trabalho, aves de um dia de idade foram inoculadas pela via oral com *Salmonella* Kottbus e analisou-se tanto a excreção da bactéria através das fezes como a presença da mesma em órgãos (fígado e baço).

Conforme o exame das amostras de fígado e baço procedentes de aves inoculadas experimentalmente com cultura de *S. Kottbus* sem diluição, observa-se na tabela 1 que aos 15 dpi *Salmonella* foi recuperada de todas as amostras de fígado e apenas uma amostra de baço apresentou-se negativa. Entretanto, aos 42 dpi apenas uma amostra de baço permaneceu positiva. Fato semelhante também ocorreu com amostras de fígado provenientes de aves inoculadas com cultura de *S. Kottbus* diluída a  $10^{-3}$ , nas quais o número de isolamentos decresceu aos 42 dpi.

Segundo BARROW et al (1987), a presença de *Salmonella* nas vísceras não é devido a septicemia, podendo ser decorrente do seqüestro da bactéria por células do sistema retículo-endotelial. Neste caso, explicando o elevado número de células isoladas do fígado e baço. Segundo esses autores, após inoculação oral de cepas de *Salmonella* Typhimurium, observou-se que as mesmas eram encontradas em órgãos e

no trato alimentar. Gradualmente, houve declínio no número de células dos órgãos e subsequentemente, os isolamentos foram observados apenas a partir do trato alimentar.

MUIR et al (1998), no 8º dia pós-inoculação oral de *Salmonella* Typhimurium observaram que a porcentagem de isolamento nas aves inoculadas era de 40% no fígado e no baço e de 100% no ceco. Entretanto, no 15º dia, estes valores eram de 0% no fígado, 25% no baço e de 75% no ceco, demonstrando que o número de bactérias em órgãos do sistema retículo-endotelial decresce com o tempo. Segundo estes autores, foi observado um aumento substancial de isolamentos de *S. Typhimurium* na cama das aves entre os dias 8 e 15 pós-inoculação, refletindo o impacto adicional da infecção e a contínua eliminação da bactéria pelas fezes em aves desafiadas.

Os resultados encontrados no presente trabalho demonstram a importância de aves infectadas na disseminação de *S. Kottbus*, pois foi possível o seu isolamento a partir de suabe cloacal, 24 horas após a contaminação das aves, à semelhança do que descreveu BARROW et al (1988) a respeito de *Salmonella* Typhimurium.

No presente estudo, observou-se que *S. Kottbus* foi isolada das aves através de suabe cloacal até aos 42 dpi, época que coincide com o abate de aves para corte. Desse modo, a existência de animais contaminados representa uma fonte de contaminação para todo o lote abatido, uma vez que nas etapas de produção, os procedimentos adotados podem favorecer a disseminação da mesma. SANTOS et al (2000), analisando amostras de carcaças de frango congeladas encontrou 32% delas contaminadas por *Salmonella*. Estes resultados indicam que a carcaça, mesmo que congelada pode prosseguir veiculando a bactéria para seres humanos.

A disseminação de *Salmonella* pelas fezes pode comprometer também a produção de aves de postura. Segundo FORSYTHE et al (1967), após inoculação oral de *Salmonella* Lexington e Anatum em aves poedeiras, não ocorreu isolamento em órgãos reprodutivos. Entretanto, *Salmonella* foi encontrada nas fezes destas aves, indicando que pode ocorrer contaminação indireta durante a postura. Mais recentemente, GAMA et al (2003) demonstraram que a introdução de aves de um dia

de idade infectadas, resulta na presença de *Salmonella* em ovos produzidos por essas aves na idade adulta.

Segundo JAKABI et al (1999), o consumo de alimentos à base de aves e ovos contaminados por *Salmonella* tem sido a via mais comum de transmissão destes microrganismos para o homem. No estado de São Paulo, dos surtos de salmonelose analisados pelo Instituto Adolfo Lutz no período de 1994 a 1997, a maioria estava relacionada ao consumo destes alimentos (JAKABI et al, 1999).

OKAMURA et al (2001b), após inoculação intravaginal de *S. Enteritidis* e análise da postura de aves, observaram que 25% dos ovos estavam contaminados e que a bactéria estava presente na superfície interna da casca. Neste local, não é possível a ação de métodos convencionais de desinfecção e, desta forma, a bactéria pode ser transmitida aos alimentos. A casca, mesmo sendo uma barreira natural do ovo, permite a penetração de microrganismos durante o resfriamento que ocorre pós-postura. Isto porque neste processo, é produzida pressão negativa com subsequente sucção para o interior do ovo. Diante do exposto, realizou-se a contaminação da casca de ovos SPF com *Salmonella* Kottbus, para avaliar a possível infecção dos mesmos através desta via. Conforme os resultados obtidos, verificou-se que não ocorreu contaminação do conteúdo interno dos ovos Assim sendo, considerando-se que no momento da postura, o ovo seria mais facilmente contaminado, contaminações posteriores deveriam ser menos freqüentes.

OKAMURA et Al (2001a), analisando sorovares de *Salmonella* (Enteritidis, Typhium, Infantis, Hadar, Heidelberg e Montevideo) quanto à capacidade de infectar órgãos, observaram que fígado, baço e ceco foram colonizados por cada sorovar de forma semelhante. Quanto à *Salmonella* Enteritidis, verificaram que coloniza mais freqüentemente os órgãos do trato reprodutivo, podendo redundar em ovos contaminados.

Em se tratando de ovos embrionados, o perigo da presença de *Salmonella* no interior dos mesmos se traduz na produção de lotes de pintainhos contaminados. Analisando ovos inoculados com *Salmonella* Kottbus, observou-se que foi possível o isolamento da bactéria de todos os embriões, não importando se morreram em alguma

fase do desenvolvimento embrionário ou se chegaram a nascer. Além disso, um pintainho que estava contaminado transmitiu a bactéria a outro dentro do nascedouro. Este fato, aliado à alta concentração de ovos e depois pintainhos, dentro de máquinas incubadoras de ovos e nascedouro, justificam o temor advindo da possibilidade de apenas um ovo apresentar-se contaminado por *Salmonella* durante o nascimento.

SYNNOTT et al (1998), relataram uma doença de origem alimentar em humanos causada por *Salmonella* Agona em 1996, associada ao consumo de carne de peru mal processada. Estes autores alertam que o sucesso no controle da enfermidade deveu-se à investigação da fonte de infecção pela vigilância sanitária e a boa relação entre saúde pública e órgãos governamentais.

A finalidade da adoção de programas de segurança dos alimentos, no caso carne de aves e ovos, é a de reduzir, ao máximo possível, os riscos de doenças causadas pelo consumo destes produtos. Sendo assim, é necessário assegurar que sejam tomadas medidas apropriadas, prevenindo os perigos ou diminuindo a possibilidade de sua ocorrência.

No Brasil, o PNSA surgiu como uma ferramenta para assegurar que medidas sanitárias sejam cumpridas. Entretanto, no que concerne ao controle de salmonelose, este programa restringe-se apenas a quatro sorovares, sendo que dois afetam a produção avícola (*Pullorum* e *Gallinarum*) e dois não possuem hospedeiro definido, afetando também o homem (*Enteritidis* e *Typhimurium*). Estas medidas foram tomadas mesmo existindo referências na literatura internacional sobre o perigo da introdução de uma *Salmonella* em um país: exatamente o que ocorreu no Brasil com a *Salmonella* Enteritidis. Assim, o presente trabalho pode servir de alerta às autoridades competentes para que medidas cabíveis sejam tomadas no intuito de se abranger na legislação vigente, toda e quaisquer *Salmonella*, vedando a sua entrada através de material genético importado.

Dentro dos objetivos a que foi proposto este trabalho, há de se ressaltar que a *Salmonella enterica* subsp *enterica* serovar Kottbus é capaz de se disseminar através das fezes de aves infectadas com grande intensidade e colocar em risco a avicultura, atividade de grande importância para o nosso país e em plena expansão.



## VII. CONCLUSÕES

Dentro do modelo experimental adotado, concluiu-se que:

- *Salmonella* Kottbus foi excretada através das fezes de aves infectadas oralmente, desde 24 horas pi até 42 dpi;
- Aves inoculadas com *Salmonella* Kottbus apresentaram a bactéria no fígado e baço 15dpi. Após este período, houve declínio nos isolamentos, sendo que aos 42dpi, a bactéria era encontrada apenas em algumas aves e com poucas células viáveis por grama;
- Embora quatro aves tivessem morrido durante a primeira semana do experimento, não foram observados sinais clínicos sugestivos de salmonelose;
- Todos os ovos embrionados que foram inoculados com cultura de *Salmonella* Kottbus apresentaram-se positivos à pesquisa da bactéria, fato observado tanto entre os embriões que morreram, quanto entre os nascimentos;
- Todos os ovos que tiveram sua casca contaminada apresentaram-se negativos à pesquisa da mesma;
- Dentro do nascedouro, a presença de um pinto contaminado com *Salmonella* Kottbus contaminou outra ave, durante o nascimento.

## VIII. REFERÊNCIAS

BARROW, P.A.; HUGGINS, M.B.; LOVELL, M.A.; SIMPSON, J.M. Observations on the pathogenesis of experimental *Salmonella typhimurium* infection in chickens. **Veterinary Science**, Amsterdam, v. 42, p.194-199, 1987.

BARROW, P.A.; SIMPSON, J.M.; LOVELL, M.A. Intestinal colonization in the chicken by food-poisoning *Salmonella* serotypes; microbial characteristics associated with faecal excretion. **Avian Pathology**, Compton, v.17, p.571-588, 1988.

BAÚ, A.C.; CARVALHAL, J.B.; ALEIXO, J.A.G. Prevalence of *Salmonella* in chicken products and hen's eggs from Pelotas, RS, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.31, n.2, p.303-307, 2001.

BÄUMLER, A.J.; HARGIS, B.M.; TSOLIS, R.M. Tracing the origins of *Salmonella* outbreaks. **Science**, Washington, v.287, p.50-52, 2000.

BERCHIERI JR., A.; ADACHI, S.Y.; CALZADA, C.T.; PAULILLO, A.C.; SCHOKEN-ITURRINO, R.P.; TAVECHIO, A.T. Farinha de carne como fonte de *Salmonella* em granja avícola. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.9, n.1/2, p.9-12, 1989.

BERCHIERI JR., A. Salmoneloses Aviárias. In: BERCHIERI JR., A.; MACARI, M. **Doenças das aves**. Campinas: FACTA, 2000, p.185-195.

BRASIL. Programa nacional de sanidade avícola. Atos Legais. Portaria 193. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília - DF, 19 set 1994. Seção 1.

BRASIL. Programa nacional de sanidade avícola. Atos Legais. Instrução Normativa 3. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília - DF, 12 ago 1999. Seção 1.

CARTER, J.D.; HIRD, D.W.; FARVER T.B.; HJERPE S.A. Salmonellosis in hospitalized horses: seasonality and case fatality rates. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v.188, n.2, p.163-167, 1986.

CENTER OF DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Outbreak of Salmonella serotype Kottbus Infections Associated with Eating Alfafa Sprouts. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v.51, n.1, p.7-9, 2002.

Disponível em < [www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml](http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml)>. Acesso em 15 maio 2003.

CLARK, D.S.; THATCHER, F.S. Analisis microbiológico de los alimentos. In: ----. **Alimentos – Microbiologia Manuais de laboratório**. Zaragoza: ACRIBIA, 1973. p.271.  
DAVIES, R.H; WRAY, C. Mice as carriers of *Salmonella enteritidis* on persistently infected poultry units. **Veterinary Record**, London, v.137, p.337-341, 1995.

EI\_GHODBAN, A.; GHENGHESH, K.S.; MARIALIGETI, K.; ABEID, S. Serotypes, virulence factors, antibiotic sensitivity, beta-lactamase activity and plasmid analysis of Salmonella from children with diarrhea in Tripoli (Libya). **Acta Microbiologica Immunologica Hungarica**, Hungary, v.49, n.4, p.433-444, 2002.

FORSYTHE, R.H.; ROSS, W.J.; AYRES, J.C. *Salmonellae* Recovery Following Gastro-Intestinal and Ovarian Inoculation in the Domestic Fowl. **Poultry Science**, Champaign, v.46, n.4, p. 849-855, 1967.

GALLETTI, M.C.M.; RIBEIRO, S.A.M.; REIS, E.M.F.; DORETTO JR., L.; ORSI, M.A. Isolamento de *Salmonella enterica* subsp *enterica* serovar Kottbus em aves importadas.

In: CONFERÊNCIA APINCO 1999 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 1999, Campinas. **Anais ...** Campinas:FACTA, 1999. p.36.

GAST, R.K.; BEARD, C.W. Evaluation of a Chick Mortality Model for Predicting the Consequences of *Salmonella enteritidis* Infections in Laying Hens. **Poultry Science**, Champaign, v.71, p.281-287, 1992.

GAST, R.K.; HOLT, P.S. Persistence of *Salmonella enteritidis* from one day of age until maturity in experimentally infected layer chickens. **Poultry Science**, Champaign, v.77, p.1759-1762, 1998.

GAMA, N.M.S.Q; BERCHIERI JR., A.; FERNANDES, S.A. Occurrence of *Salmonella* sp in Laying Hens. **Brazilian Journal of Poultry Science**, Campinas, v.5, n.1, p.15-21, 2003.

GREIN, T.; O'FLANAGAN, D.; McCARTLY, T.; PRENDERGAST, T. **Eurosurveillance Monthly**, London, v.2, n.11, p., 86-88, 1997.

Disponível em <[www.eurosurveillance.org/em/v02n11/0211-423.asp?langue=044&](http://www.eurosurveillance.org/em/v02n11/0211-423.asp?langue=044&)>. Acesso em 13 maio 2003.

HOFER, E.; SILVA FILHO, S.J.; REIS, E.M.F. *Salmonella* Serovars Isolated from Feedstuff and Poultry Feeds in Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.18, n.1, p.21-27, 1998.

HOSZOWSKI, A.; WASYL D. *Salmonella* serovars found in animals and feeding stuffs in 2001 and their antimicrobial resistance. **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy**, Pulawy, v. 46, p.165-178, 2002.

- IONOVA, I.; MONOV, G. KUNEV ZH. Carrier state and body distribution of *Salmonella* bacteria in healthy piglets and calves. **Veterinarno Meditsinski Nauki**, Sofia, v.18, n.7, p.98-104, 1981.
- JAKABI, M.; BUZZO, A.A.; RISTORI, C.A.; TAVECHIO, A.T.; SAKUMA, H.; PAULA, A.M.R.; GELLI, D.S. Observações laboratoriais sobre surtos alimentares de *Salmonella* sp, ocorridos na grande São Paulo, no período de 1994 a 1997. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v.58, n.1, p.47-51, 1999.
- LIRIO, V.S.; SILVA, E.A.; STEFONI, D.C.; RECCO, E.A.P.; MALUF, Y.T.; MIYAZAWA, T.T.; NEVES, D.V.D.A.; OLIVEIRA, V.M.R. Frequência de 17 sorotipos de *Salmonella* isolados em alimentos. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 12, n.55, p. 36-41, 1998.
- LISTER, S.A. *Salmonella* Enteritidis infection in broilers and broiler breeders. **Veterinary Record**, London, v.123, n.13, p.350, 1988.
- MIAN, L.S.; MAAG,H.; TACAL, J.V. Isolation of *Salmonella* from muscoid flies at commercial animal establishments in San Bernardino Count, California. **Journal of Vector Ecology**, Santa Ana, v.27, n.1, p.82-85, 2002.
- MUIR, W.I.; BRYDEN, W.L.; HUSBAND A.J. Comparison of *Salmonella* typhimurium challenge models in chickens. **Avian Diseases**, Athens, v.42, p.257-264, 1998.
- NELIUS, D.; NEUMANN, P.; HERMANN, H.; KOHLER, F. Septic opyemia caused by *Salmonella* Kottbus (6,8:eh:1,5). **Deutsche Gesundheitswesen**, Berlin, v.24, n.51, p.2408-2411, 1969.
- OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES. **Manual of Standards Diagnostic Tests and Vaccines**, part 3, section X, chapter X.4, 2000.

Disponível em< [www.oie.int/eng/normes/mmanual/A\\_summry.htm](http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_summry.htm)>. Acesso em 20 out 2003.

OKAMURA, M.; KAMIJIMA, Y.; MIROYUKI, T.; KAZUMI, S.; BABA, E. Differences Among Six Salmonella Serovars in Abilities to Colonize Reproductive Organs and to Contaminate Eggs in Laying Hens. **Avian Diseases**, Athens, v.45, p.61-69, 2001a.

OKAMURA, M.; MIYAMOTO, T.; KAMIJIMA, Y.; TANI, H.; SASAI, K.; BABA, E. Differences in Abilities to Colonize Reproductive Organs and to Contaminate Eggs in Intravaginally Inoculated Hens and in Vitro adherences to vaginal explants between Salmonella Enteritidis and other Salmonella serovars. **Avian Diseases**, Athens, v.45, p.962-971, 2001b.

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. Food borne disease outbreaks caused by *Salmonella* Enteritidis. **Saúde Pública**, Lisbon, v.32, n.5, 1998.

PINHEIRO, L.A.S.; OLIVEIRA, G.H.; BERCHIERI JR., A. Experimental Salmonella entérica serovar Pullorum infection in two commercial varieties of laying hens. **Avian Pathology**, Compton, v.30, p.129-133, 2001.

RICHARDSON, K.; GEORGE, B. A bulletin for the Australian Food Industry. **Food Safety and Hygiene**, North Ryde, 2002.

Disponível em< [www.dfst.csiro.au/fshbull/fshbull29.htm](http://www.dfst.csiro.au/fshbull/fshbull29.htm)>. Acesso em 16 maio 2003. .

RODRIGUE, D.C.; TAUXE R.V.; ROWE B. International increase in Salmonella enteritidis: a new pandemic? **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v.105, p.21-27,1990.

SANTOS, D.M.S.; BERCHIERI JR., A.; FERNANDES, S.A.; TAVECHIO, A.T.; AMARAL, L.A. Salmonella em carcaças de frango congeladas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.20, n.1, p.39-42, 2000.

SMITH, H.W.; TUCKER, J.F. The virulence of Salmonella strains for chickens: their excretion by infected chickens. **Journal of Hygiene**, Cambridge, v. 84, n.3, p.479-488, 1980.

SYNNOT M.B.; BRINDLEY M.; GRAY, J.; DAWSON, J.K. An outbreak of Salmonella agona infection associated with precooked turkey meat. **Communicable Disease and Public Health**, London, v.1, n.3, p.176-179, 1998.

TAUNAY, A.E.; FERNANDES, S.A.; TAVECHIO, A.T.; NEVES, B.C.; DIAS, A.M.G.; IRINO, K. The role of public health laboratory in the problem of salmonellosis in São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v.38, n.2, p.119-127, 1996.

TAVECHIO, A.T.; FERNANDES, S.A.; NEVES, B.C.; DIAS, A.M.G.; IRINO, K. Changing patterns of *Salmonella* serovars: increase of *Salmonella* Enteritidis in São Paulo, Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v.38, n.5, p.315-332, 1996.

TAVECHIO, A.T.; GHILARDI, A.C.; PERESI, J.T.; 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 of Food Protection**, Ames, v.65, n.6, p.1041-1044, 2002.

VETERINARY LABORATORIES AGENCY, Surveillance Report Small Ruminants, **Quarterly Report**, Surrey, v.6, n.4, p.7-9, 2003.

Disponível em <[www.defra.gov.uk/corporate/vla.htm](http://www.defra.gov.uk/corporate/vla.htm)>. Acesso em 15 maio 2003.

WEISS, L.H.N.; NONIG, R.; CARDOSO, M.; COSTA, M. Occurrence of *Salmonella* sp in finishing pigs in Rio Grande do Sul, Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.22, n.3, p.104-108, 2002.

ZANCAN, F.T.; BERCHIERI JR, A.B.; FERNANDES, S.A., GAMA, N.M.S.Q. Salmonella investigation in transport boxes of day-old birds. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.31, p.230-232, 2000.