

## EFEITOS DA INOCULAÇÃO DE *Salmonella* Enteritidis NA INCUBAÇÃO DE OVOS EMBRIONADOS DE PERUS

CARLA YOKO TANIKAWA ANDRADE<sup>1</sup>, MARIA AUXILIADORA ANDRADE<sup>2</sup>, MARCOS BARCELLOS CAFÉ<sup>2</sup>, JOSÉ HENRIQUE STRINGHINI<sup>2</sup>, JULIANA BONIFÁCIO ALCÂNTARA<sup>1</sup>, VALERIA DE SÁ JAYME<sup>2</sup>

1 – Mestre em Sanidade Avícola pela Universidade Federal de Goiás

2 – Professores Doutores Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás

### RESUMO

Objetivou-se avaliar o rendimento de incubação, a capacidade de penetração de *Salmonella* Enteritidis através da casca do ovo e a sua habilidade de colonização do trato gastrointestinal. Foram incubados 400 ovos embrionados de perus da linhagem BUT, distribuídos em quatro tratamentos de 100 unidades experimentais: CC e CCA (inoculação com placebo na casca e na câmara de ar, respectivamente); IC e ICA (inoculação com  $4,2 \times 10^4$  UFC/mL de *Salmonella* Enteritidis na casca e na câmara de ar, respectivamente). Os parâmetros de incubação calculados foram: fertilidade, eclodibilidade total e de ovos férteis, relação peso do peruzinho pelo peso do ovo. A presença de *Salmonella* foi pesquisada na casca, membrana, albume/gema e embrião de dois ovos por tratamento com um, sete, 14, 21 e 28 dias. Após o nascimento, foi determinada a frequência de recuperação do patógeno no mecônio de todas as aves. As variáveis foram analisadas pelos testes de  $\chi^2$  e de Fischer. Constatou-se que, durante todo o período de incubação, o agente manteve-se viável em 87,5% e 100% das amostras de casca dos tratamentos IC e ICA, respectivamente. Houve migração para o inte-

rior dos ovos em 33,33% das amostras analisadas no tratamento IC e em 95,45% das amostras analisadas no tratamento ICA. Os parâmetros de incubação não foram afetados quando o patógeno foi inoculado na casca. Constatou-se também que a inoculação do placebo e *Salmonella* Enteritidis na câmara de ar determinou baixa eclodibilidade total e de ovos férteis. Foi verificado que o tratamento controle da câmara de ar reduziu a eclosão com aumento ( $P < 0,05$ ) na mortalidade embrionária tardia em relação à inoculação do patógeno na casca. A colonização intestinal pelo patógeno ocorreu em peruzinhos oriundos da inoculação experimental na casca. Conclui-se que a análise da fertilidade, eclodibilidade e relação peso do peruzinho pelo peso do ovo não evidencia a presença de *Salmonella* Enteritidis no incubatório. Entretanto, a contaminação do incubatório pode ser determinada pela pesquisa de *Salmonella* Enteritidis nos componentes do ovo e no mecônio. A metodologia de inoculação via câmara de ar influenciou negativamente a eclodibilidade e a mortalidade embrionária.

PALAVRAS-CHAVE: inoculação experimental; isolamento bacteriano; *Meleagris gallopavo*; salmonelose.

### ABSTRACT

## EFFECTS OF *SALMONELLA* ENTERITIDIS IN INCUBATION OF EMBRYONATED TURKEY EGGS

This study aimed to evaluate the incubation performance, the *Salmonella* Enteritidis capacity of penetration through the eggshell and the ability of colonization of the gastrointestinal tract. Four hundred turkey eggs were

incubated and distributed into four treatments with 100 experimental units each: CC and CCA (inoculation with placebo in eggshell and air chamber, respectively), IC and ICA (inoculation with  $4.2 \times 10^4$  CFU/mL of

*Salmonella* Enteritidis in eggshell and air chamber, respectively). The parameters of incubation were fertility, total hatchability and hatchability of fertile eggs, and relative chick weight to egg weight. *Salmonella* was investigated in shell, membrane, albumen/yolk and embryo of two eggs per treatment at one, seven, 14, 21 and 28 days. After birth, the frequency of recovery of the pathogen in meconium of all birds was determined. The variables were analyzed by  $\chi$ -square test ( $\chi^2$ ) and Fischer test. During the whole incubation period, the agent has remained viable in 87.5% and 100% of eggshell samples in treatments IC and ICA, respectively. There was migration into eggs in 33.33% and 95.45% of the samples in treatments IC and ICA, respectively. The parameters of incubation were not affected when the pathogen was inoculated in the eggshell. It was also observed that

KEYWORDS: bacterial isolation; experimental inoculation; *Meleagris gallopavo*; salmonellosis.

## INTRODUÇÃO

O ovo fertilizado contém a célula reprodutiva e todo o material nutritivo e de proteção para o adequado desenvolvimento embrionário de uma ave (RUIZ & FOLEGATTI, 1995).

O ovo representa um meio propício para o desenvolvimento de microrganismos, sendo necessárias diversas barreiras intrínsecas de defesa contra bioagentes. A cutícula é uma cobertura glicoproteica da casca, transparente e delgada, que cobre por curto período a superfície externa do ovo, selando 99% dos poros. A casca e suas membranas constituem uma barreira física rígida que limita a penetração de bactérias, enquanto o albume possui uma série de substâncias antimicrobianas como a lisozima, coalbumina e avidina, que impedem a multiplicação e o deslocamento bacteriano (MESSENS et al., 2005).

Embora o ovo seja um excepcional invólucro natural, a contaminação inata de ovos pode ocorrer como resultado da infecção do tecido reprodutivo durante a formação do folículo da gema e/ou formação do albume no oviduto, antes da formação da casca, resultando em transmissão vertical. Os ovos contaminam-se também após a formação da casca, durante a passagem pela cloaca ou pelo contato com as fezes na cama, no material de ninho, mãos do tratador, água, bandejas, cama, piso ou em qualquer local contaminado, inclusive incubatórios, caracterizando-se a transmissão horizontal (HUMPREY, 1994; MIYAMOTO et al., 1997; COX et al., 2000).

Apesar do baixo percentual de ovos positivos para *Salmonella* após a postura, a via de transmissão vertical é particularmente importante para o proces-

so de amplificação da contaminação durante a incubação (GAST, 2003). Um único ovo contaminado com *Salmonella* na incubadora pode disseminar extensivamente a bactéria no ambiente (BAILEY et al., 1998).

A penetração de *Salmonella* na casca do ovo e na membrana da casca pode resultar em transmissão direta do agente para o embrião em desenvolvimento (GAST, 2003), causando aumento de mortalidade embrionária precoce e de ovos bicados com embriões vivos e mortos (BUT, 2005b). A transmissão horizontal também pode ocorrer através de penugens e resíduos de nascimento que liberam *Salmonella* no ar que circula nos nascedouros, expondo peruzinhos durante a eclosão (GAST, 2003). O reflexo dessa contaminação pode afetar a qualidade das aves, causando doença clínica e mortalidade nos primeiros dias de vida (BOLELI, 2003).

Inoculações experimentais de *Salmonella* têm sido conduzidas em diversos estudos, envolvendo infecções em matrizes (MIYAMOTO et al., 1997; GAST et al., 2004), inoculação através da casca do ovo (PADRON, 1990; BARROS et al., 2001, ANDRADE et al., 2008) ou cavidade alantóide (BRAUN & FEHLHABER, 1995; ANDRADE et al., 2008). Essas experimentações promovem conhecimentos sobre a interação do patógeno com o hospedeiro, melhorando a eficiência de estratégias de controle, com impacto significativo na redução da frequência de transmissão de doença em humanos (GAST, 2003).

Baseado nessa expositiva pretendeu-se avaliar a inoculação de *Salmonella* Enteritidis através da habilidade do patógeno de migrar para os componentes do ovo e dos índices de incubação, da morta-

lidade embrionária e da infecção do trato gastrintestinal ao nascimento.

## MATERIAL E MÉTODOS

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

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

Os tratamentos adotados foram: controle-casca (CC), inoculado via casca; controle-câmara de ar (CCA), inoculado via câmara de ar (ambos usando como inóculo solução salina a 0,85%); inóculo-casca (IC), inoculado via casca e inóculo-câmara de ar (ICA), inoculado via câmara de ar (ambos usando como inóculo uma solução  $4,2 \times 10^4$  UFC/mL de *Salmonella* Enteritidis. Tal inóculo foi preparado com *Salmonella* Enteritidis isolada de amostras oriundas de frangos de corte, segundo AN-DRADE et al. (2008).

A cepa foi replicada em ágar verde brilhante e incubada a 37°C por 18-20h. Em seguida, as células foram suspensas em solução salina tamponada a 0,85%, mantida a 4°C e em uma concentração de  $4,2 \times 10^4$  UFC/mL, ajustada com auxílio da escala de Mac Farland (BRADSHAW et al., 1990; FERNÁNDEZ et al., 2001). A concentração do inóculo foi confirmada por plaqueamento das diluições decimais seriadas em ágar verde brilhante, com posterior incubação a 37°C e contagem das UFC de *Salmonella* Enteritidis.

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

Os ovos inoculados na casca com *Salmonella* Enteritidis (IC) foram expostos ao inóculo por contato com as mãos revestidas com luvas descartáveis, simulando possível contaminação cruzada. Com auxílio de uma seringa de tuberculina, 0,1 mL de solu-

ção salina tamponada a 0,85% contendo  $4,2 \times 10^4$  UFC/mL foi depositado nas mãos revestidas com as luvas. Cada ovo foi mantido por um período de 20 segundos nas luvas contaminadas para que toda a superfície fosse umedecida. O mesmo procedimento foi realizado com os ovos inoculados com placebo via casca (CC) empregando-se solução salina a 0,85%.

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

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

A cada semana de incubação foram coletados dois ovos por tratamento que foram imediatamente processados. A casca foi retirada com o auxílio de tesouras e pinças esterilizadas e os fragmentos colocados em placas de Petri para pesagem de 1g em balança de precisão de 0,01 g e, posteriormente, em tubos de ensaio de 18X180 cm contendo 9 mL de caldo selenito cistina (CS). Os tubos inoculados contendo CS foram incubados a 37°C por 24h. O mesmo procedimento foi realizado para as seguintes estruturas: albume/líquido alantóide; membranas externas e internas; saco vitelínico/gema; embriões. As amostras de embriões foram obtidas através de macerado total de todos os órgãos e estruturas.

A pesquisa de *Salmonella* foi realizada de

acordo com o proposto em GEORGIA POULTRY LABORATORY (1997) e BRASIL (2003) com algumas modificações descritas a seguir.

Os fragmentos foram retirados, pesados e incubados em caldo selenito cistina a 37°C por 24h com auxílio de uma alça de níquel-cromo. Alíquotas do caldo foram plaqueadas por esgotamento em estrias para meios seletivos (ágar MacConkey, Hektoen e ágar verde brilhante) e incubados a 37°C por 24h. A leitura foi realizada através da seleção de unidades formadoras de colônias (UFC) com características morfológicas de *Salmonella*. De três a cinco UFC por placa foram transferidas para tubos contendo ágar triplice açúcar ferro (TSI), incubados a 37°C por 24h.

Os tubos de TSI com crescimento sugestivo de *Salmonella* foram submetidos ao teste de urease, produção de indol e H<sub>2</sub>S, vermelho metila, motilidade, lisina descarboxilase, teste do malonato e citrato. Isolados com reações bioquímicas compatíveis com *Salmonella* foram submetidos ao teste sorológico com soro polivalente anti-O e remetidos à Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) em ágar nutriente para confirmação do sorovar isolado.

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

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

O período de mortalidade foi considerado de

acordo com as descrições: infértil, o ovo com um denso ponto branco (blastodisco); mortalidade inicial com embriões mortos até sete dias; mortalidade intermediária com embriões mortos de oito a 22 dias; mortalidade final com embriões mortos de 23 a 28 dias.

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

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

Os testes de qui-quadrado ( $\chi^2$ ) ou exato de Fisher foram empregados para avaliar a frequência do rendimento de incubação, da mortalidade embrionária e de peruzinhos nascidos infectados (SAM-PAIO, 2002).

## RESULTADOS

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

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

Eclodibilidade	Tratamentos							
	CC		CCA		IC		ICA	
	Número	%	Número	%	Número	%	Número	%
Eclod. férteis	81/100a	80.22	64/100b	63.74	76/100a	76	1/95c	1,05
Eclod. total	78/100a	76.66	62/100a	61.70	77/100a	77	1/100b	1
Fertilidade	97/100a	97.00	97/100a	97.00	94/100a	94.00	95/114a	95.00

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

Foi observada diferença ( $P<0,05$ ) entre as vias de inoculação quando se utilizou o placebo (sem *Salmonella*) inoculado pela casca e pela câmara de

ar. A utilização da câmara de ar como via de inoculação determinou maior mortalidade do que ovos inoculados na casca com placebo (CC) e inoculados

na casca com *Salmonella* Enteritidis (IC). Foi verificada, ainda, redução da eclodibilidade ( $P<0,05$ ), tanto de ovos férteis quanto total, quando a inocula-

ção foi realizada pela casca e câmara de ar com *Salmonella* Enteritidis (Tabela 1), em relação aos placebos.

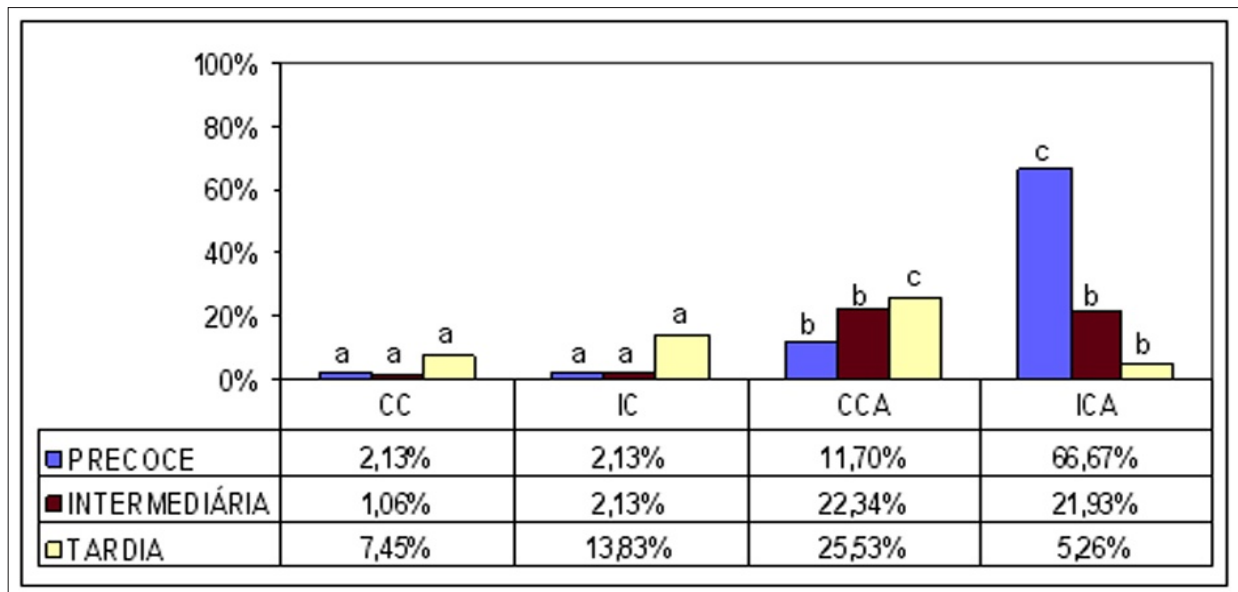


FIGURA 1 – Rendimento de incubação segundo os tratamentos

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

Com relação à mortalidade embrionária, não houve diferença ( $P>0,05$ ) entre os tratamentos quando a inoculação foi via casca. Quando *Salmonella* Enteritidis foi inoculada via câmara de ar, o efeito de perda de eclodibilidade foi agravado e mais intenso do que quando a inoculação foi realizada pela casca (Figura 1), evidenciando o efeito protetor da casca do ovo sobre a contaminação.

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

Componentes do ovo	VIA DE INOCULAÇÃO			
	Inoculado casca		Inoculado câmara de ar	
	Número	%	Número	%
Casca	7/8a	87,5	8/8a	100
Membrana da casca	6/8a	75	7/7b	100
Albume / Gema	2/8a	25	7/8b	87,5
Embrião	1/7a	14,29	7/7b	100

\* Letras diferentes na mesma linha indicam diferença ( $P<0,05$ ) pelo teste exato de Fisher

Na comparação com os ovos que receberam o agente infeccioso na câmara de ar, constatou-se diferença significativa ( $P<0,05$ ) nas análises bacteriológicas das membranas da casca,

albume/gema em relação aos inoculados na casca, mostrando que a bactéria migrou para os componentes do ovo com mais facilidade quando a via de inoculação foi a câmara de ar, reforçando o efeito protetor da casca (Tabela 3). Todas as análises dos ovos inoculados na casca e câmara de ar do grupo placebo foram negativas para o patógeno.

TABELA 3 – Frequência de isolamento de *Salmonella* Enteritidis nos componentes de ovos férteis durante a incubação

Componentes do ovo	VIA DE INOCULAÇÃO			
	Inoculado casca		Inoculado câmara de ar	
	Número	%	Número	%
Casca	7/8a	87,5	8/8a	100
Membrana da casca	6/8a	75	7/7b	100
Albume / Gema	2/8a	25	7/8b	87,5
Embrião	1/7a	14,29	7/7b	100

\* Letras diferentes na mesma linha indicam diferença ( $P<0,05$ ) pelo teste exato de Fisher

Verifica-se na Tabela 4 que a relação peso do peruzinho pelo peso do ovo esteve entre 69,31% e 73,43%, porém não houve diferença ( $P>0,05$ ) entre os tratamentos para esta variável.

TABELA 4 - Relação peso médio do ovo / peso médio segundo os tratamentos e a via de inoculação

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

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

Os peruzinhos inoculados na casca com *Salmonella* Enteritidis apresentaram colonização intestinal positiva em 16,22% (6/57) de peruzinhos eclodidos. Em relação aos ovos inoculados na câmara de ar, o único peruzinho nascido apresentava colonização intestinal positiva. Nos tratamentos controles (CC e CCA) não foram encontradas UFCs com características morfológicas, bioquímicas ou sorológicas compatíveis com *Salmonella* Enteritidis (Tabela 5).

TABELA 5 - Resultado bacteriológico de mecônio de peruzinhos inoculados experimentalmente na casca e câmara de ar

Via de inoculação	Número	%
Casca	01/06/57	16,2
Câmara de ar	01/01/11	100

## DISCUSSÃO

No processo de incubação de ovos de perus, altos índices de fertilidade são os objetivos principais da produção. A determinação da fertilidade é uma tarefa importante para monitorar a performance da equipe de inseminação artificial e determinar a mortalidade precoce (BUT, 2005a). A fertilidade é ainda o parâmetro que reflete o desempenho de todas as etapas do processo, desde a recria de matrizes, ao manejo de produção de ovos, a nutrição, o padrão tecnológico dos incubatórios e diversos procedimentos de biossegurança (PERDIGÃO, 2008).

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

minação artificial.

As eclodibilidades total e de ovos férteis inoculados na casca foram semelhantes entre os tratamentos ( $P > 0,05$ ), embora o agente infeccioso estivesse presente durante todo o processo. Experimento anterior também não indicou alterações nos índices de incubação em matrizes de frangos de corte de linhagens de crescimento rápido e lento inoculados com *Salmonella* Enteritidis pela casca (ANDRADE et al., 2008), ou seja, a casca é uma barreira importante para a interiorização da bactéria.

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

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

A eclodibilidade foi afetada pela inoculação via câmara de ar, tanto com placebo quanto com o patógeno. Esta técnica pode ser considerada muito invasiva, uma vez que interferiu no desenvolvimento embrionário e determinou alta mortalidade embrionária. Em experimento realizado por ANDRADE et al., (2008) com ovos de galinha inoculados na cavidade alantóide com o mesmo patógeno, os embriões foram capazes de se desenvolver e eclodir.

Com relação à determinação da mortalidade embrionária, utilizou-se a análise de ovos não eclodidos (embriodiagnóstico) (ERNST et al., 2004). Em bons lotes de incubação, há dois períodos mais importantes de mortalidade embrionária: três a dez dias e 25 a 27 dias. Alta mortalidade em outros estágios de desenvolvimento pode indicar um problema agudo durante a incubação (BUT, 2005b).

Na inoculação via casca, não foram observadas diferenças de mortalidade embrionária entre os ovos desafiados ou não com *Salmonella* Enteritidis. Entretanto, na inoculação pela câmara de ar, o patógeno determinou 66,67% de mortalidade precoce

( $P < 0,05$ ), o que resultou em menores taxas de ecodibilidade de ovos férteis (0,92%) e de ovos totais (0,88%).

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

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

A bactéria inoculada tanto na casca quanto na câmara de ar permaneceu viável durante todo o período de incubação, migrando para os componentes internos do ovo. Entretanto, os mecanismos de defesa dos ovos foram suplantados em número menor de amostras quando a via de inoculação foi a casca, reforçando que a mesma funciona como barreira física e que suas membranas podem atuar como barreira química, impedindo a interiorização de agentes infecciosos (GANTOIS et al., 2009). Acrescenta-se ainda que a bactéria permaneceu na superfície e invadiu as membranas da casca na maioria das amostras; contudo, poucas amostras colonizaram o saco vitelino, o líquido alantóide e, ainda, poucos embriões foram positivos para *Salmonella* Enteritidis.

Vários fatores podem ter influenciado a penetração do patógeno para os componentes do ovo. SONCINI & BITTENCOURT (2003) afirmaram que a porosidade, a qualidade da cutícula, a espessura da casca e a presença de rachadura e trincas são fatores que influenciam a penetração bacteriana no ovo. MESSENS et al. (2005), em artigo de revisão, relataram que existem fatores extrínsecos e intrínsecos que podem afetar a penetração da *Salmonella* na cas-

ca. Dentre os extrínsecos, os autores destacaram a cepa e a concentração de bactérias, a temperatura, a umidade e a presença de matéria orgânica; em relação aos intrínsecos, a cutícula, as características da casca (integridade, espessura, porosidade, defeitos) e propriedades das membranas.

Em relação à migração de *Salmonella* Enteritidis inoculadas via câmara de ar, o patógeno migrou para os componentes do ovo na maioria das amostras desde o início da incubação. Há controvérsias a respeito da presença da bactéria no interior do ovo. MULIARI & ZAVANELLA (1994) relataram que o albume não é um substrato apropriado para o desenvolvimento da *Salmonella* Enteritidis, o que foi confirmado por OLIVEIRA & SILVA (2000). Quando a bactéria penetra o ovo atingindo o albume, ela pode se multiplicar por curto período de tempo e, de forma rápida, ser reduzida numericamente, pois os componentes do albume e o pH são desfavoráveis ao seu desenvolvimento (BOARD & TRANTER, 1986).

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

Outro importante indicador do processo de incubação é a avaliação da relação peso do peruzinho pelo peso do ovo, determinando a qualidade das aves entregues nas granjas. Tipicamente, o percentual de peso do peruzinho/peso do ovo está entre 66 a 68%, mas pode ser inferior quando o incubatório utiliza tempo de descanso antes da expedição (BUT, 2005c; BUT, 2005 d). No presente estudo, a relação ovo/peruzinho esteve entre 69,31% e 73,43%, indicando que as aves foram retiradas precocemente das incubadoras.

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

rência de peruzinhos *flip over*.

Verificou-se positividade de 16,22% e 100% dos mecônios quando *Salmonella* Enteritidis foi inoculada via casca e via câmara de ar, respectivamente. A colonização intestinal positiva para *Salmonella* Enteritidis ao nascimento confirma a suscetibilidade de perus ao patógeno, o que está de acordo com as observações de BERCHIERI JÚNIOR & FREITAS NETO (2009).

Pelo percentual de positividade encontrado nos componentes do ovo e nos mecônio analisados, pode-se afirmar que o patógeno se disseminou pelo organismo e determinou alta colonização intestinal de peruzinhos que eclodiram. Tais resultados estão de acordo com os estudos de DONOGHUE et al. (2004), que isolaram o sorovar em lotes de perus comerciais.

### CONCLUSÕES

A eclodibilidade e a mortalidade embrionária foram afetadas pelo método de inoculação e pela *Salmonella* Enteritidis.

*Salmonella* Enteritidis esteve presente na casca durante o período de incubação e à eclosão migrou para o trato gastrointestinal dos peruzinhos.

### AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pelos recursos disponibilizados e ao Laboratório FIOCRUZ (RJ) pela sorotipagem da *Salmonella*.

### REFERÊNCIAS

ANDRADE, M.A.; MESQUITA, A.J.; STRINGHINI, J.H.; PEDROSO, A.A.; LEANDRO, N.S.M.; CAFÉ, M.B.; MATTOS M.S. Infecção experimental de embriões de frango de corte com *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis fagotipo 4. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60, n.5, p.1110-1117, 2008.

BARROS, M. R.; ANDREATTI FILHO, R. L.; LIMA, E. T.; SAMPAIO, H. M.; CROCCI, A. J. Sobrevivência de *Salmonella* Enteritidis em ovos contaminados artificialmente, após desinfecção e armazenados em diferentes temperaturas. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 3, n. 3., p.219-223, 2001.

BAYLE, J. S.; CASON, J. A.; COX, N. A. Effect of *Salmonella* in young chicks on competitive treatment. **Poultry Science**, v. 77, n.3, p.394-399, 1998.

BERCHIERI JUNIOR, A.; FREITAS NETO, O.C. Salmoneloses aviárias. In: BERCHIERI JUNIOR, A.; SILVA, E.N.; Di FABIO, J.,SESTI,L, ZUANAZE, M.A.F. **Doenças das aves**. 2 ed. Campinas: FACTA, 2009. p. 435-454

BOARD, R. G, TRANTER, H.S. The microbiology of eggs. In: STADELMAN, W. J. COTTERILL, O.J. (ed.). 3. ed. **Egg Science and Technology**. Edinburg: Oliver and Boyd. 1986. p.75-96.

BOLELI, I.C. Estresse, mortalidade e malformações embrionárias. In: MACARI, M.; GONZALES, E. **Manejo da Incubação**, Campinas:FACTA, 2003. p.394-434.

BRADSHAW, J. G., SHAH, D. B., FORNEY, E., MADDEN, J. H. Growth of *Salmonella* Enteritidis in shell eggs from normal and seropositive hens. **Journal of Food Protection**, v.53, n.12.,p 651-69, 1990.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria Nacional da Defesa Agropecuária. Departamento Nacional de Defesa Animal. Coordenação Geral de Laboratório Animal. **Métodos de Análises Microbiológicas para Alimentos**, Brasília: MAPA, 2003. 226p.

BRAUN, P.; FEHLHABER, K. Migration of *Salmonella* Enteritidis from the albumen into the yolk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 25, n.1, p.95-99, 1995.

BRITISH UNITED TURKEYS. **Artificial Insemination for female**. Technical Advice Sheet, Inglaterra, 2006, p.1-6. [http://pt.aviagen.com/assets/Tech\\_Center/Turkeys\\_technical\\_advice/breeder\\_mgt/ATL\\_Artificial\\_Insemination\\_0037.pdf](http://pt.aviagen.com/assets/Tech_Center/Turkeys_technical_advice/breeder_mgt/ATL_Artificial_Insemination_0037.pdf). Acesso em agosto de 2008.

BRITISH UNITED TURKEYS. **Breeder Performance Goals for Big9 Parent Female**. Aviagen Turkeys, Inglaterra, 2008, p.1-5. [http://pt.aviagen.com/assets/Tech\\_Center/Turkeys\\_breeders/ATL/Perf\\_goals/ATL\\_Big9\\_Breeder\\_Goals.pdf](http://pt.aviagen.com/assets/Tech_Center/Turkeys_breeders/ATL/Perf_goals/ATL_Big9_Breeder_Goals.pdf). Acesso em agosto de 2008.

BRITISH UNITED TURKEYS. **Fertility Testing**. Technical Advice Sheet, 2005a, p1-5 [http://pt.aviagen.com/assets/Tech\\_Center/Turkeys\\_technical\\_advice/hatchery/ATL\\_Fertility\\_Testing.pdf](http://pt.aviagen.com/assets/Tech_Center/Turkeys_technical_advice/hatchery/ATL_Fertility_Testing.pdf). Acesso em agosto de 2008.

BRITISH UNITED TURKEYS. **Hatch Breakout Analysis**. Technical Advice Sheet, Inglaterra, 2005b, p.1-5. [http://pt.aviagen.com/assets/Tech\\_Center/Turkeys\\_technical\\_advice/hatchery/ATL\\_Hatch\\_Breakout.pdf](http://pt.aviagen.com/assets/Tech_Center/Turkeys_technical_advice/hatchery/ATL_Hatch_Breakout.pdf) Acesso em agosto de 2008.

BRITISH UNITED TURKEYS. **Measuring Egg Water Loss**. Technical Advice Sheet, Inglaterra, 2005c, p.1-3. [http://pt.aviagen.com/assets/Tech\\_Center/Turkeys\\_technical\\_advice/hatchery/ATL\\_Egg\\_Water\\_Loss.pdf](http://pt.aviagen.com/assets/Tech_Center/Turkeys_technical_advice/hatchery/ATL_Egg_Water_Loss.pdf) Acesso em agosto de 2008.

BRITISH UNITED TURKEYS. **Measuring Poult Yield**. Technical Advice Sheet, Inglaterra, 2005d, p.1-3. [http://pt.aviagen.com/assets/Tech\\_Center/Turkeys\\_technical\\_advice/hatchery/ATL\\_Poult\\_Yield.pdf](http://pt.aviagen.com/assets/Tech_Center/Turkeys_technical_advice/hatchery/ATL_Poult_Yield.pdf). Acesso em



agosto de 2008.

CASON, J. A.; BAILEY, J.S.; COX, N. A. Location of *Salmonella typhimurium* during incubation and hatching of inoculated eggs. **Poultry Science**, v. 72, n. 11, p.2064-2068, 1993.

COX, N. A.; BERRANGE, M. E.; CASON, J. A. *Salmonella* penetration of eggs shells and proliferation in broiler hatching eggs. **Poultry Science**, v. 79, n.11, p. 1571-1574, 2000.

DONOGHUE, A. M.; BLORE, P. J.; COLE, K.; LOSKUTOFF, N. M.; DONOGHUE, D.J. Detection of *Campylobacter* or *Salmonella* in turkey semen and the ability of poultry semen extenders to reduce their concentrations. **Poultry Science**, v. 83, n.10, p. 1728-1733, 2004.

ERNST, R.A.; BRADLEY, F. A.; ABBOTT, U. K. CRAG, R. M. **Egg candling and breakout analysis**. ANR University of California, Estados Unidos, Publication 8134, p. 1-9, 2004.

FERNÁNDEZ, A.; LARA, C.; LOSTE, A.; CALVO, S.; MARCA, M.C. Control of *Salmonella* enteritidis phage type 4 experimental infection by fosfomicin in newly hatched chicks. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Disease**, v.24, n.4, p.207-216, 2001.

FRENCH, N. **The egg takes control- the future of the turkey incubation?** Technical Article - British United Turkey, Inglaterra, 2005, p.1-5.

GANTOIS, I.; DUCATELLE R.; PASMANS, F.; HAESEBROUCK, F.; GAST, R.; HUMPHREY, T. J.; VAN IMMERSEEL, F. Mechanisms of egg contamination by *Salmonella* Enteritidis. **Federation of European Microbiological Societies (FEMS) Microbiology Reviews**, v. 33, n.4, p.718- 738, 2009. disponível em <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1574-6976.2008.00161.x/full>

GAST, R. K. Paratyphoid infection. In: CALNEK, B. W. **Diseases of Poultry**, 11.ed. Ames: Iowa University Press, 2003. p. 97-121.

GAST, R. K.; GUARD-BOULDIN, J.; HOLT, P. S. Colonization of reproductive organs and internal contamination of eggs after experimental infection of laying hens with *Salmonella heidelberg* and *Salmonella* enteritidis. **Avian Diseases**, v. 48, n.4, p.863-869, 2004.

GEORGIA POULTRY LABORATORY. **Monitoring and detection of *Salmonella* in poultry and poultry environments**. Oakwood: Georgia Poultry Laboratory, 1997.293p. [Workshop]. GEORGIA POULTRY LABORATORY, 1997

HUMPREY, T. J. Contamination of eggshell and contents

with *Salmonella* enteritidis: a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 21, n.1, p. 31-40,1994.

LIONG, J. W. W.; FRANK, J. F.; BAILEY, S. Visualization of eggshell membranes and their interaction with *Salmonella* Enteritidis using confocal scanning laser microscopy. **Journal of Food Protection**, v. 60, n. 9, p. 1022-1028, 1997.

MESSENS, W.; GRIJSPEERDT, K.; HERMAN, L. Eggshell penetration by *Salmonella*: a review. **World's Poultry Science Journal**, v.61,n.1, p.71-85, 2005

MIYAMOTO, T.; BABA, E.; TAKANA, T.; SASAI, K.; FUKATA, T.; ARAKAWA, A. *Salmonella* enteritidis contamination of eggs from hens inoculated by vaginal, cloacal, and intravenous routes. **Avian Diseases**, v.41, n. 1, p.296-303, 1997.

MULIARI, R.; ZAVANELLA, M. Influence of temperature on *Salmonella* enteritidis growth in hens' eggs components. **Veterinary Record**, v.134, n.28, p. 583, 1994.

NASCIMENTO, V. P., SALLE, C. P. O ovo. In: MACARI, M., GONZALES, E. (Ed). **Manejo da incubação**. , Campinas: FACTA, 2003. p. 34-50.

OLIVEIRA, D.; SILVA, E. N. *Salmonella* em ovos comerciais: ocorrência, condições de armazenamento e desinfecção da casca. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.52, n.6, p.655-661, 2000.

PADRON, M. N. *Salmonella typhimurium* penetration through the eggshell of hatching eggs. **Avian Diseases**, v. 34, n. 2, p. 463-465, 1990.

PERDIGÃO. **Importância da qualidade dos ovos na eclosão**. Serviço Rural Perdígão, Brasil, ano XXII, n.106, p. 10, 2008.

RUIZ, R. L.; FOLEGATTI, I. S. Microbiologia do ovo. In: RUIZ, R. L. **Microbiologia zootécnica**, 1.ed. São Paulo: Roca, 1995. p. 251-272.

SAMPAIO, I. B. M. **Estatística Aplicada à Experimentação Animal**. Belo Horizonte: Fundação de ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2002. 221p.

SONCINI, R. A., BITTENCOURT, F. L. Contaminação dos ovos após a postura. In: MACARI, M., GONZALES, E. (Ed). **Manejo da incubação**, Campinas: FACTA 2003. p.433-453.

SPARKS, N. H.; BOARD, R. G. Bacterial penetration of the recently oviposited shell of hen's eggs. **Australian Veterinary Journal**, v. 62, p. 169-170, 1985.

---

Protocolado em: 29 out. 2008. Aceito em: 13 abr. 2011.