

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

***Salmonella* spp. EM GRANJAS DE POSTURA EM PROCESSO DE
CERTIFICAÇÃO PARA PRODUÇÃO ORGÂNICA NO RIO GRANDE DO SUL**

Dissertação de Mestrado

Gustavo Perdoncini

PORTO ALEGRE

2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

***Salmonella* spp. EM GRANJAS DE POSTURA EM PROCESSO DE
CERTIFICAÇÃO PARA PRODUÇÃO ORGÂNICA NO RIO GRANDE DO SUL**

Autor: Gustavo Perdoncini

Dissertação apresentada como requisito parcial
para obtenção do grau de Mestre em Ciências
Veterinárias na área de Medicina Veterinária
Preventiva, na especialidade de Sanidade Avícola.

Orientador: Prof. Dr. Vladimir Pinheiro do
Nascimento

Co-orientadora: Profa. Dra. Andrea Troller Pinto

PORTO ALEGRE

2011

CIP - Catalogação na Publicação

Perdoncini, Gustavo

Salmonella spp. em granjas de postura em processo de certificação para produção orgânica no Rio Grande do Sul / Gustavo Perdoncini. -- 2011.

75 f.

Orientador: Vladimir Pinheiro do Nascimento.

Coorientadora: Andrea Troller Pinto.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2011.

1. Salmonelose na Avicultura. 2. Tifo Aviário. 3. Salmonella spp transmitida através de ovos. I. Pinheiro do Nascimento, Vladimir , orient. II. Troller Pinto, Andrea, coorient. III. Título.

Gustavo Perdoncini

***Salmonella* spp. EM GRANJAS DE POSTURA EM PROCESSO DE
CERTIFICAÇÃO PARA PRODUÇÃO ORGÂNICA NO RIO GRANDE DO SUL**

Aprovado em: 31 de outubro de 2011.

APROVADO POR:

Prof. Dr. Vladimir Pinheiro do Nascimento
Orientador e Presidente da Comissão

Prof. Hamilton Luiz de Souza Moraes
Membro da Comissão

Prof. Aldemir Reginato Ribeiro
Membro da Comissão

Profa. Maristela Lovato
Membro da Comissão

AGRADECIMENTOS

Cada passa dado por mim nessa jornada, não foi dado sozinho. Aqui, só tenho a agradecer a todas as pessoas que compartilharam idéias e me auxiliaram durante a realização desse projeto.

Agradeço a Deus por ter colocado em meu caminho pessoas que puderam contribuir para a minha aprendizagem e crescimento, sem essa divindade, sei que nada seria possível.

Ao meu orientador professor Dr. Vladimir Pinheiro do Nascimento e co-orientadora Professora Dra. Andrea Troller Pinto, pela oportunidade de convívio, auxílio e ensinamentos durante esse período. Serei sempre grato a vocês.

Aos meus pais, Lauri e Elda, meus irmãos João e Rafael e minha avó Zeni, agradeço e dedico esse trabalho. A todos meus tios, tias, primos e primas que de um jeito ou de outro me apoiaram e incentivaram, meu muito obrigado.

Amigos de todas as horas, que tiveram comigo em tantos caminhos e que me dão a certeza que nunca estive sozinho, só tenho a agradecer.

Agradeço a oportunidade de trocar idéias com os professores Dr. Carlos Tadeu Pippi Salle e Dr. Hamilton Luiz de Souza Moraes, respeitadíssimos e ótimos profissionais do segmento avícola.

Colegas, estagiários e funcionários do CDPA, muito obrigado pela contribuição que foi fornecida a mim, especialmente a Martha e a Daniela. Aos colegas do setor LEITECIA e Medicina Veterinária Preventiva, que de alguma forma me ajudaram durante a execução do meu trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pelo apoio ao desenvolvimento deste trabalho.

Por último, mas não menos importante agradeço a Laura Beatriz Rodrigues e Anderlise Borsoi, professoras as quais tive a oportunidade de conhecer e trocar idéias que me foram muito úteis.

“Obrigado a todas as pessoas que contribuíram para meu sucesso e para meu crescimento como pessoa. Sou o resultado da confiança e da força de cada um de vocês.”

Augusto Branco

RESUMO

Nos últimos anos observaram-se mudanças nos métodos empregados para a produção agropecuária. Dentre eles, o sistema orgânico de produção vem ganhando espaço no mercado, devido ao desenvolvimento de novos hábitos gerados a partir da preocupação com a segurança alimentar. Entretanto, os processos produtivos em sistemas de produção não convencional também estão sujeitos a contaminações, dentre elas, contaminação por *Salmonella* spp. Devido a estas preocupações, observou-se a necessidade de estudar novos segmentos produtivos, os quais podem ser possíveis fontes de contaminação. Nesse estudo foram acompanhadas 5 granjas que estão em processo de certificação para a produção de ovos em sistema orgânico. Avaliou-se a ocorrência de *Salmonella* spp. no alojamento de pintos de um dia através de *swab* de cloaca e fundo de caixa. No decorrer do ciclo produtivo, também foi avaliado a presença de *Salmonella* spp. na cama dos aviários, acesso a área externa, ninhos e ovos (casca e conteúdo interno), quantificando este agente através da técnica do número mais provável – NMP. Dos 7 lotes avaliados, 3 foram positivos para *Salmonella* spp. em algum momento da produção. Na granja A, houve isolamento de *Salmonella* Agona a partir de um ninho do lote A1 (3,0 NMP/mL). Na mesma propriedade, houve isolamento de *Salmonella* Gallinarum em um segundo lote (A2), proveniente de um surto de salmonelose que ocorreu logo após o alojamento das aves, ocasionando aumento da mortalidade (33,7% acumulado até o 9º dia de alojamento). *Salmonella* Agona também foi isolada partir de dois *pools* de *swabs* de cloaca de aves de um dia e *swab* de cama de aviário, sendo que este último apresentou 60,03 NMP/mL, ambas oriundas da granja B. As granjas C, D e E avaliadas e seus respectivos lotes, apresentaram resultados negativos em todas as avaliações realizadas. Os isolados de *S. Agona* oriundas do *swabs* de cloaca apresentaram o mesmo perfil genético. No mesmo sentido, as amostras isoladas do ambiente também apresentaram o mesmo perfil entre elas, diferenciando-as dos isolados de *swab* de cloaca. A presença de *S. Agona* no ambiente avícola representa um possível meio de contaminação para os ovos produzidos. Tratando-se de um sorotipo que pode infectar seres humanos, medidas sanitárias devem ser empregadas para evitar infecções alimentares causada por esse agente.

Palavras chave: *Salmonella* spp., aves, sistema orgânico.

ABSTRACT

Changes have been observed in the methods used in agricultural production over the last few years. Among them, organic production system has been gaining presence on the market due to development of new habits from the concern with food safety. Nonetheless, the productive processes of unconventional production systems are also subject to contamination, including by *Salmonella* spp. Due to such concerns, it is necessary to study other productive sectors which could be subject to potential sources of contamination. This study monitored 5 poultry farms undergoing the certification process in order to produce organic eggs. The following items were assessed: occurrence of *Salmonella* spp. in chicks-through cloaca swab and transport boxes and presence and quantity of *Salmonella* spp. through the assay Most Probably Number - MPN/g in soiled poultry litter, access of the birds to external areas, their nests and eggs (eggshell and internal contents). Of the 7 flock evaluated, 3 were *Salmonella* spp. positive at some point of the production. In farm A, *Salmonella* Agona was isolated from the nest of A1 flock (3.0 MPN). In the same property, *Salmonella* Gallinarum was isolated from a second flock (A2), with signs and lesions consistent with *Salmonella* observed just after the birds were housed, causing an increase in the mortality rate (33.7% until the 9th housing day). *Salmonella* Agona was also isolated from two pools of cloaca swabs from one-day-old birds and swab from the poultry litter, which showed 60.03 NMP, originated from farm B. Farms C, D and E and their respective flocks showed negative results in all tests. The isolation of *S. Agona* isolated from two pool of cloaca, show the same genetic profile. Similarly, the isolated from birds' environment also showed the same genetic profile between them, differencing the isolated cloaca swabs. The isolation of *S. Agona* in the birds' environment can be a source of infection for eggs. Since this is a serotype that may infect humans, control measures must be employed to avoid food-borne diseases caused by this agent.

Key words: *Salmonella* spp., hens, organic system.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- Frequência de avaliação e ocorrência de <i>Salmonella</i> spp. nos lotes acompanhados	34
TABELA 2 - Sorotipos de <i>Salmonella</i> spp isolados de aves de postura orgânica.....	35
TABELA 3 - Prevalência de <i>Salmonella</i> spp. nas amostras de <i>swab</i> de cloaca e fundo de caixa	36

LISTA DE FIGURA

- FIGURA 1- Macrorestrição de DNA total de *Salmonella* Agona com perfil gerado por PFGE, utilizando a enzima *XbaI*. Amostra 1 e 2 (swab de cloaca); amostra 3 (swab de ninho); amostra 4 (swab de cama); M (*S. Braenderup* H9812) utilizada como marcador..... 38

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Grau Celcius
°GL	Grau Gay Lussac
µL	Microlitro
µm	Micrometro
APT	Água Peptonada Tamponada
BGN	Ágar Verde Brilhante com Novobiocina
BPF	Boas Práticas de Fabricação
CE	<i>Council Regulation</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DTA	Toxinfecção alimentar
EC	<i>European Community</i>
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
IFOAM	<i>International Federation of Organic Agriculture Movements</i>
LIA	<i>Lysine Iron Agar</i>
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
mL	Mililitro
NMP	Número Mais Provável
OAC	Avaliação de Conformidade Orgânica
PFGE	<i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
PNSA	Plano Nacional de Sanidade Avícola
RV	Rappaport Vassiliadis
SVS	Sistema de Vigilância Sanitária
SIM	<i>Sulphur Indol Motility</i>
TSI	<i>Triple Sugar Iron</i>
U	Unidade
<i>Xba</i> I	Enzima de restrição <i>Xba</i> I
XLT-4	Xilose Lisina Tergitol-4

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	O NOVO MERCADO CONSUMIDOR E SUAS EXIGÊNCIAS	15
2.1	SISTEMA ORGÂNICO DE PRODUÇÃO	16
2.1.1	PRODUÇÃO ORGÂNICA DE AVES	17
3	TAXONOMIA DO GÊNERO <i>Salmonella</i>	19
4	EPIDEMIOLOGIA	20
4.1	<i>Salmonella</i> spp. em granjas produtoras de ovos comerciais convencionais	21
4.2	<i>Salmonella</i> spp. em sistemas alternativos de produção de aves	23
5.	MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO	25
5.1	Método de microbiologia convencional	25
5.2	Utilização da técnica do Número Mais Provável	27
6	MATERIAIS E MÉTODOS	28
6.1	Amostragem e processamento	28
6.1.1	Lote de aves	28
6.2	Amostragem	28
6.2.1	<i>Swab</i> de cloaca	29
6.2.2	Amostra de fundo de caixa de transporte	29
6.2.3	<i>Swab</i> de propé	29
6.2.4	<i>Swab</i> do piso do acesso a área externa dos aviários	30
6.2.5	<i>Swab</i> dos ninhos	30
6.2.6	Análise da casca e conteúdo interno dos ovos	30
6.3	Procedimento microbiológico para detecção e quantificação de <i>Salmonella</i> spp.	31
6.3.1	Procedimento de detecção	31
6.3.3	Caracterização antigênica	32
6.3.4	Macro Restrição do DNA total e eletroforese em campo pulsado (PFGE) para <i>Salmonella</i> spp.	32
7.	RESULTADOS	34
7.1	Ocorrência de <i>Salmonella</i> spp. nas granjas avaliadas	34
7.1.1	Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp em pintos de um dia e fundo de caixa	35
7.1.2	Pesquisa e quantificação de <i>Salmonella</i> spp. de <i>swab de propé</i> de cama dos galpões	36
7.1.3	Pesquisa e quantificação de <i>Salmonella</i> spp. de <i>swabs de propé</i> no acesso a área	

	externa dos galpões	36
7.1.4	Pesquisa e quantificação de <i>Salmonella</i> spp. em ninhos	37
7.1.5	Pesquisa e quantificação de <i>Salmonella</i> spp. em casca e conteúdo interno dos ovos	37
7.2	Resultado do PFGE	37
8	DISCUSSÃO	39
9	CONCLUSÃO	46
10	ARTIGO – TIFO AVIÁRIO EM UMA EXPLORAÇÃO DE AVICULTURA DE POSTURA ALTERNATIVA NO SUL DO BRASIL: RELATO DE CASO	47
11	CONCLUSÕES FINAIS	56
	REFERÊNCIAS	57

1 INTRODUÇÃO

O setor avícola nos últimos anos vem apresentando grande expansão na produção e exportação de carne de frango e na produção e consumo de ovos. Esse incremento demonstra a grande representatividade que este produto está tendo nos mais diferentes mercados do mundo (UBABEF, 2011).

O consumo de ovos sofreu declínio no Brasil por alguns anos, acusado de trazer malefícios a saúde. Entretanto, Novello *et al.* (2006) ressaltam que o ovo é um alimento nutricionalmente completo e ideal para o consumo, pois fornece aminoácidos essenciais e outros nutrientes importantes.

A preocupação com a saúde e a qualidade dos alimentos é constante entre os consumidores. Novos hábitos alimentares desenvolvidos após a década de 80 na Europa reforçaram a necessidade de produzir alimentos, neste caso, ovos, com qualidade e características que atendam o mercado consumidor. Na busca por alimentos saudáveis, livres de agrotóxicos e fertilizantes químicos, os consumidores começaram a pressionar os produtores de alimentos a produzi-los a partir de modelos alternativos.

A produção orgânica de ovos se fundamentou como uma das vertentes da produção alternativa, a qual foi regulamentada na Europa no ano de 1991 e no Brasil no ano de 2003 (PORTAL BRASIL, 2011). No entanto, assim como o processo produtivo convencional industrial, a produção de ovos nesse sistema também está sujeito a contaminações de origem bacteriana, física e química, o que torna necessárias avaliações sobre a forma de produção neste sistema. Em particular as contaminações bacterianas, diversas vezes causadas por *Salmonella* spp., que são reportadas e responsáveis por infecções alimentares transmitidas através do consumo de ovos ou carne de frango contaminados.

Tendo em vista que estes produtos são referidos como os principais meios de transmissão deste agente, diversos consumidores assumem que aves produzidas em sistemas convencionais possuem uma maior incidência de *Salmonella* spp. do que aquelas produzidas em sistemas orgânicos ou *free-range* (BAILEY, *et al.* 2005). Apesar desta preocupação, pesquisas de microrganismos patogênicos em sistemas alternativos de produção são escassos e os mesmos necessitam ser avaliados quanto à presença de patógenos no decorrer do ciclo de produção.

Apesar do sistema de produção orgânica diferir em métodos de manejo e instalações, quando comparado com o sistema convencional, o manejo sanitário e a

ausência de patógenos de importância em saúde pública deve receber atenção equivalente a produção convencional.

Com essa preocupação e a ausência de dados sobre a realidade sanitária deste sistema que está emergindo, este trabalho teve o intuito de detectar a presença com posterior quantificação de *Salmonella* spp. em lotes alojados em propriedades que se encontravam em processo para certificação para produção orgânica no estado do Rio Grande do Sul. Os lotes não foram avaliados durante seu ciclo completo, devido a restrições de acesso e ao pequeno número de produtores de ovos que adotam esse manejo.

2 O NOVO MERCADO CONSUMIDOR E SUAS EXIGÊNCIAS

As mudanças constantes observadas nos últimos anos conduzem a um contexto chamado de globalização. A produção e consumo que são observadas nos dias atuais permitem verificar um mercado consumidor mais exigente, que busca produtos saudáveis, de qualidade, que não causem danos ao meio ambiente e que respeitem o bem estar animal.

Nos anos 60, produtores e agricultores começaram a perceber que a utilização de fertilizantes e outros produtos químicos poderiam prejudicar a saúde humana e o meio ambiente (FAO, 2003). Já nos anos 80, o uso de sistemas de gaiolas para a produção de aves de postura começou a sofrer pressões oriundas de consumidores que se mostraram preocupados com o bem estar dos animais, o qual motivou um maior consumo de ovos produzidos em sistemas *free-range*. (LAMPKIN, 1997). O mesmo autor ainda relata que na década de 90, os setores produtivos de carne de aves e de ovos enfrentaram pressões crescentes sobre higiene e qualidade dos produtos, o que levou ao início da implantação do sistema de produção orgânico de alimentos.

A preferência por alimentos alternativos, também surgiu devido à insegurança alimentar enfrentados pelos consumidores nos anos 80, oriunda da preocupação como a encefalomielite espongiforme bovina - BSE, resíduos de aditivos químicos em produtos de origem animal e resistência antimicrobiana (ANDRADE, 2005; PUZZI, 2008; SPISSO, 2009).

O emprego de técnicas alternativas de produção, como *free-range*, ecológico e orgânico começaram a se expandir na Europa. Entre eles, os orgânicos ganharam notoriedade quando os governos da Alemanha, Dinamarca e Suécia introduziram medidas para incentivar a conversão dos sistemas convencionais para os sistemas orgânicos após o início da Revolução Verde, que iniciou no começo do século XX (TATE, 1994; AQUINO, 2005).

A Revolução Verde do Pós-Guerra contribuiu de forma muito expressiva a produtividade agrícola e produção animal em escala industrial. Entretanto, o uso indiscriminado de antimicrobianos (EFSA, 2008) que conduziu a resistência antimicrobiana de diversas bactérias, juntamente com a utilização constante de fertilizantes e inseticidas (ALBERGONI, 2007; BEFFPOINT, 2002), levou os consumidores a preferir produtos produzidos de forma não convencional, entre eles, produtos oriundos de sistemas orgânicos.

Na Europa, o mercado do consumo desses produtos é crescente e apresenta uma heterogeneidade muito ampla. Neste bloco de países, hoje os maiores produtores são: Alemanha, Reino Unido e Itália. Entretanto, é na Dinamarca que estes produtos possuem uma maior participação no consumo total de alimentos (BEEF POINT, 2002).

A obtenção de produtos orgânicos apresentou um crescimento médio de 25% entre os anos de 1997 e 2007, principalmente nos Estados Unidos, União Européia e o Japão (BRASIL, 2007). Embora alimentos produzidos no sistema orgânico tenham ganhado destaque da mídia nos últimos anos, o consumo de alimentos produzidos neste sistema representa uma fatia muito pequena do mercado de alimentos, principalmente devido a baixa disponibilidade de oferta de produtos e ao custo de aquisição (ORMOND, *et al.* 2002).

2.1 SISTEMA ORGÂNICO DE PRODUÇÃO

O hábito alimentar saudável aliado a produção sustentável, vem ganhando espaço para o desenvolvimento de produtos diferenciados (CASTELLINI, *et al.* 2008; XAVIER, *et al.* 2001). Estes produtos são oriundos, segundo *International Federation of Organic Agricultural Movement – IFOAM*, de uma agropecuária que aborda um sistema baseado em um conjunto de processos que resultará em um ecossistema sustentável, segurança alimentar, bem estar animal e ampliação da justiça social (IFOAM, 2006). Essas práticas menos agressivas que otimizam os recursos naturais e preservam a biodiversidade local, objetivam produzir alimentos saudáveis, suprimindo a necessidade do mercado (JAENICH, 2008).

À medida que os produtos orgânicos começaram ter uma maior aceitação no mercado nacional e internacional, surgiu a necessidade de garantir a origem e a qualidade através de instituições de reconhecimento internacional (ORMOND, 2002). O reconhecimento destas unidades de produção se deu a partir de unidades certificadoras, que fiscalizam e inspecionam as propriedades agrícolas e os processos de produção, verificando se atendem as regulamentações do segmento (BRASIL, 2011).

Segundo o Censo Agropecuário de 2006 (BRASIL, 2009a), os estabelecimentos agropecuários produtores de orgânicos, representam aproximadamente 1,8% do total avaliado e a pecuária, representava 41.7% dos estabelecimentos. Essas informações vão ao encontro do desenvolvimento favorável do setor, o qual vem crescendo entre 15 e 20% ao ano no Brasil, do qual, 60% da produção são exportadas (SCIALABBA, 2005).

Com o crescimento deste mercado, o mesmo tem acarretado preocupações na regulamentação e comercialização destes produtos em diversos países do mundo. Países da União Européia foram os primeiros a publicarem diretrizes sobre este assunto através da regulamentação da Comunidade Européia número 2092 de 24 de junho 1991(EC, 1991), e desde então, vem sofrendo alterações (EC, 2007). Já no Brasil, a lei 10.831 de 2003 deu início à regulamentação da agricultura orgânica, considerando “produto da agricultura orgânica ou produto orgânico, *in natura* ou processado, aquele obtido de sistema orgânico de produção ou oriundo de processo extrativista sustentável”. Já em dezembro de 2008, foi aprovado a primeira Instrução Normativa que regulamentou o sistema orgânico de produção animal e vegetal, a qual foi revogada pela IN 46 de 06 de outubro de 2011, e atualmente regula este segmento (BRASIL, 2003, 2008, 2011).

2.1.1 PRODUÇÃO ORGÂNICA DE AVES

O novo nicho de mercado que envolve o consumo de produtos alternativos ganhou força nas últimas décadas. Pressões dos mercados consumidores, principalmente da Europa, Estados Unidos e Japão, e mais recentemente de consumidores de países em desenvolvimento, fez com que o modelo atual de produção intensivo de ovos fosse reformulado e adaptado a produção no sistema semi-extensivo.

No Brasil, o consumo de ovos dá-se principalmente na forma *in natura*, produzido praticamente em sua totalidade em sistemas de gaiolas (UBA, 2008), manejo não aceito na produção orgânica, o qual segue um manejo diferenciado, já referenciado pelo MAPA (BRASIL, 2011).

Práticas de manejo que hoje são permitidos no sistema industrial, como debicagem e muda forçada, não são permitidas no sistema orgânico. O uso de programas de luz para produção de ovos é permitido desde que seja fornecido um período mínimo de oito horas no escuro, por dia. A produção em sistema intensivo, tradicional, em gaiolas, bem como qualquer estímulos que venham a prejudicar as aves também são proibidos. Além disto, a alimentação que é fornecida às aves, deve ser da própria unidade ou de outra que também produza no sistema orgânico (BRASIL, 2011).

A introdução de aves nas propriedades deve ser realizada com cautela, prezando princípios da biosseguridade das granjas (ANDREATTI FILHO, 2006), e priorizando animais oriundos de sistemas orgânicos (BRASIL, 2011). Em alguns casos, onde há indisponibilidade de introduzir aves oriundas de sistema orgânico, opta-se por adquirir

aves de outros sistemas de produção, desde que previamente aprovadas por um Organismo de Avaliação de Conformidade Orgânica - OAC (BRASIL, 2008).

Uma das características desse sistema, é que, diferentemente da produção convencional, as aves possuem acesso à área externa, com no mínimo - 3 m²/ave (BRASIL, 2011), o que aumenta a probabilidade de contaminação por diversos agentes patogênicos, entre eles, *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Escherichia coli*, *Toxoplasma gondii*, entre outros que possam estar presentes em aves silvestres, insetos e no meio ambiente (HEUER, *et al.* 2001; BAILEY e COSBY, 2005; LOPES, 2008; MEERBURG, *et al.* 2011).

Quanto às instalações necessárias, seus tamanhos e modelos irão variar conforme o tamanho dos lotes. Para lotes de pequena escala, em geral menos de mil aves, utiliza-se galinheiros móveis, podendo estes ser transportados para uma nova área verde em intervalos regulares. Em maior escala opta-se pela utilização de piquetes divididos em faixas menores, alternando as áreas (BERG, 2001).

3 TAXONOMIA DO GÊNERO *Salmonella*

A Salmonelose é causada por microrganismos do gênero *Salmonella*, pertencentes a família *Enterobacteriaceae* (QUINN, *et al.*, 2005; GAST, 2008), que possuem a capacidade de infectar diversas espécies, inclusive o homem. Este gênero, composto por mais de 2500 sorotipos, pertencem duas espécies: *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*, que podem ser diferenciados com base em séries bioquímicas e sorológicas (POPPOFF *et al.*, 2001; BACK, 2004; BERCHIERI JUNIOR, 2009; GUIBOURDENCHE, *et al.* 2010).

A *S. enterica* é dividida em seis subespécies: *S. enterica* subsp *enterica*, *S. enterica* subsp *salamae*, *S. enterica* subsp *arizonae*, *S. enterica* subsp *diarizonae*, *S. enterica* subsp *houtenae*, *S. enterica* subsp *indica*. Cada subespécie possui um número variável de sorovares. Dentro da espécie *S. enterica* subespécie *enterica* se destacam os sorotipos Gallinarum, Pullorum, Enteritidis e Typhimurium (EUZÉBY, 1999; POPPOFF *et al.*, 2001; GUIBOURDENCHE, *et al.* 2010). Estes sorotipos são monitorados pelo Plano Nacional de Sanidade Avícola - PNSA (BRASIL, 2003b) sendo que, a presença dos dois primeiros em granjas de matrizes resulta em impacto econômico maior do que os sorotipos Enteritidis e Typhimurium, que são os isolados com maior frequência em produtos avícolas e em casos de infecções alimentares. As *Salmonella* spp. são microrganismos não formadores de esporos, com tamanho de 0.3-1.5 x 2-5 µm. São bactérias Gram-negativas, apresentando-se móveis, exceto *S. Gallinarum* e *S. Pullorum* que são imóveis (GAST, 2008; SHIVAPRASAD *et al.* 2008). São aeróbicos ou anaeróbios facultativos, apresentado bom crescimento na temperatura de 37°C, contudo algumas conseguem crescer em temperaturas que variam de 5 – 45°C. Podem crescer em meios que o pH varie entre 4 e 9, sendo o pH ótimo em torno de 7, entretanto, alguns componentes celulares como as fimbrias e flagelos podem não ser expressos em temperaturas extremas (GAST, 2008; SHIVAPRASAD *et al.* 2008). Esses microrganismos são susceptíveis a destruição pelo calor. Durante cozimento da carne de aves, ao atingir uma temperatura de 74°C ou superiores, as células bacterianas tornam-se inviáveis (SCHNEPF *et al.* 1989). O tratamento térmico por 70 minutos a 57°C também inativa as células bacterianas (BRACKETT, *et al.* 2001).

4 EPIDEMIOLOGIA

As salmonelas são isoladas mundialmente, podendo infectar uma grande variedade de hospedeiros, incluindo animais selvagens vertebrados e invertebrados, animais domésticos e humanos (GAST, 2008; WHO, 2010), promovendo perdas de produção nos diversos segmentos da pecuária, inclusive na avicultura.

Nas aves, a salmonelose, é responsável por três enfermidades distintas. A pulorose, cujo agente é a *Salmonella Pullorum*; o tifo aviário, causado pela *S. Gallinarum* e o paratifo aviário, causado por qualquer outro sorotipo que não seja *S. Gallinarum* ou *S. Pullorum* (BERCHIERI JUNIOR, *et al.* 2009).

A Pulorose e o Tifo aviário são enfermidades septicêmicas, que afetam principalmente galinhas e perus, contudo outras aves como codornas, faisões, patos e pavões também são susceptíveis (SHIVAPRASAD, 2008).

A pulorose é conhecida também como diarreia branca bacilar (SHIVAPRASAD, 2008) acometendo aves de qualquer idade, sendo mais comuns nos primeiros dias de vida. A mortalidade é alta, podendo atingir 100% no primeiro mês de vida, o que resulta em um significativo impacto econômico na produção. Já o tifo aviário, é altamente patogênico para aves em qualquer idade, entretanto sua ocorrência é maior em aves adultas, ocasionando alta mortalidade, chegando a índices de 26% no primeiro mês de vida (SHIVAPRASAD, 2008; BERCHIERI JUNIOR *et al.*, 2009). Ambas as doenças podem ser transmitidas por diversas vias, incluindo a vertical (BERCHIERI JÚNIOR *et al.*, 2009), onde o número de ovos contaminados pode chegar a 33% (GAST, 2008).

Diferentemente dos sorotipos *S. Gallinarum* e *S. Pullorum* que se encontram sobre estrito controle, os demais sorovares que não são espécie específica, são responsáveis pelo paratifo aviário (GAST, 2008). Dentre os diversos sorotipos isolados de aves, *Salmonella Enteritidis* é o encontrado com maior frequência em carcaças de frangos no Brasil, seguido de *S. Typhimurium*, *S. Heidelberg*, *S. Mbandaka*, *S. Give* entre outros (BRASIL, 2008; MEDEIROS, 2011). Esses sorotipos geralmente colonizam o trato gastrintestinal, sem causar qualquer sintomatologia, e uma vez que não são específicos de aves, possibilitam a contaminação das carcaças e ovos causando as infecções alimentares (GAST, 2008).

4.1 *Salmonella* spp. em granjas produtoras de ovos comerciais convencionais

A produção de ovos livres de microrganismos que possam acarretar prejuízos a saúde pública, é um dos objetivos para que se mantenha uma boa integridade sanitária das granjas avícolas. Além dos ovos serem passíveis de contaminação por *Salmonella* spp., este agente pode acarretar danos a saúde das aves e diversas vezes não caracterizando sinais clínicos da doença (POPPE, 2000; GUARD-PETTER, 2001; GAST, 2008).

O controle da infecção por *Salmonella* spp. nos galpões continua sendo imprescindível para o sucesso da avicultura, entretanto, o trabalho sanitário empregado deve ser principalmente preventivo. A adoção de boas práticas agropecuárias é fundamental para evitar possíveis infecções que venham comprometer o desenvolvimento e a produtividade. Salle e Moraes (2009) ressaltam que alguns princípios devem ser seguidos para prevenir a presença de doenças. A seleção cuidadosa do fornecedor de pintinhos, programa de vazão sanitário, fornecimento de água e alimentos de boa qualidade, entre outros manejos que venham ao encontro do favorecimento do ambiente de criação das aves.

A presença de *Salmonella* spp. é relatada em estudos que envolvam ambiente e aves com um dia de vida. Zancan *et al.* (2000) ao pesquisar *Salmonella* spp. em caixas de transporte de pintos de um dia para a produção de ovos, encontraram 77% de lotes positivos para *S. Mbandaka*, demonstrando a possibilidade de transmissão através dos ovos e caracterizando como um fator importante de introdução de *Salmonella* spp. nas granjas de produção. Lotes positivos no início da vida podem tornar-se portadores desse agente até a fase adulta, resultando na contaminação de carcaças e ovos. Além de aves positivas para esse agente, a contaminação dos ovos através do ambiente contaminado permite a sobrevivência de *Salmonella* spp. por longos períodos (DAVIES *et al.* 2003; HARBAUGH, *et al.* 2006; CARRIQUE-MAS, 2008).

Gama *et al.* (2001), ao investigar a presença de *Salmonella* spp. em 12 lotes de aves destinadas a postura comercial, isolou esta bactéria de amostras de mecônio de quatro destes, sendo que em três lotes foi verificado a presença de *S. Enteritidis* e, em um lote, foi isolado *S. Enteritidis* e *S. enterica* cepa rugosa. Dos 4 lotes positivos no primeiro dia de vida, ao serem avaliados na semana seguinte, todos foram novamente positivos, porém, a partir desta data, houve grande variação quanto a presença de *Salmonella* no decorrer do ciclo produtivo das aves.

A presença de *Salmonella* em aves com um dia de idade é um forte indício de transmissão vertical (GAST, *et al.* 2005; GANTOIS, *et al.* 2009). Apesar da colonização de órgãos do sistema reprodutivo por *Salmonella* sp. ser considerado um fator importante em relação a contaminação de ovos (GANTOIS, *et al.* 2009), o ambiente contaminado também predispõem a esta contaminação.

A disseminação horizontal de *Salmonella* spp. através do contato direto entre aves, ingestão de água ou alimento contaminado, pessoas e equipamentos (COX *et al.*, 2000; GAST, 2008), bem como a ingestão de insetos, como *Alphitobius diaperinus*, que podem albergar esta bactéria (CHERNAKI-LEFFE *et al.*, 2002; ALVES *et al.*, 2006), permite a disseminação da salmonelose nos plantéis.

O ambiente avícola, como cama e ninhos, também são fontes de contaminações para aves e ovos (MORRIS, 1990; DAVIES, 1996). A contaminação direta entre eles favorecem a disseminação de microrganismos que são responsáveis por diversas toxinfecções alimentares. Nos EUA, no ano de 2010, autoridades sanitárias americanas fizeram um *recall* de milhões de ovos dispostos no mercado, após a confirmação de surto de causado por *Salmonella* Enteritidis ligada ao consumo dos ovos (CDC, 2010b). Nos últimos 20 anos, *S. Enteritidis* foi o sorotipo mais isolado a partir de ovos (GANTOIS *et al.*, 2009), contaminando-os através da penetração da casca ou através da transmissão vertical (GAST, 2005; GUARD, 2011). No mesmo sentido, dados da União Européia (ESFA, 2007) relatam que *Salmonella* Enteritidis foi o sorotipo que apresentou a maior frequência de isolamento a partir de ovos entre os anos de 2004 e 2005.

Embora alguns autores cite a contaminação horizontal como importante meio de transmissão (BARROW e LOVELL, 1991; BICHLER, *et al.* 1996), outros mencionam que a transmissão vertical é mais importante (GAST e BEARD, 1990; GUARD-PETTER, 2001), possibilitando a produção de ovos positivos para *Salmonella* sp. A presença de *Salmonella* Enteritidis no interior dos ovos pode ser uma consequência do tecido reprodutivo infectado, entretanto sua presença no mesmo não necessariamente resultará em ovos contaminados (BERCHIERI JUNIOR, *et al.* 2001).

Visto a importância da transmissão de *Salmonella* spp. através dos ovos, Gast *et al.* (2001) infectaram através da via oral aves de postura com *S. Enteritidis* para estabelecer a proporção de ovos contaminados, observando que 4,3% dos ovos foram positivos entre 4 e 22 semana após a inoculação. Apesar das fezes serem importantes meios de contaminação de ovos, a excreção de *Salmonella* spp. é intermitente, sendo

possível detectar baixos níveis de *Salmonella* na casca (GAST, *et al.* 2001; GAST, *et al.* 2005; HUMPHREY, *et al.* 1989).

Da mesma maneira, Bichler *et al.* (1996), infectou oralmente aves de postura com 25 semanas de idade, com 10 UFC de *Salmonella* Enteritidis. Uma semana após a inoculação, 63,9% dos ovos estavam positivos para esse agente. Embora as aves tenham contaminado os ovos, as mesmas não apresentaram sinais clínicos da doença, como também não apresentaram declínio na produção.

Berchieri *et al.* (2001) ao infectar aves de postura comercial com 25 e 30 semanas de idade com 10^6 e 10^9 unidades formadoras de colônia (UFC) de *Salmonella* Enteritidis respectivamente, não detectaram *Salmonella* sp. do conteúdo interno dos ovos produzido por essas aves. Entretanto, foi possível detectar a presença de *Salmonella* Enteritidis nos órgãos internos das aves, incluindo no tecido do ovário.

O controle deste agente é primordial no que tange a qualidade microbiológica de ovos. De acordo com EBEL *et al.* (2000), nos EUA estima-se que 0,005% dos mesmos são infectados naturalmente por *Salmonella* spp. e o cálculo de análise risco foi estimado em 3,2 milhões de ovos contaminados por *S.* Enteritidis por ano.

4.2 *Salmonella* spp. em sistemas alternativos de produção de aves

A avaliação sanitária de granjas constitui um dos parâmetros de relevância para determinar a qualidade e a inocuidade dos alimentos, entretanto, normas delimitam o uso de desinfetantes e sanitizantes em alguns sistemas de produção, dificultando tomada de medidas de biossegurança. Jaenich (2007), relata que na produção orgânica de aves, a busca por produtos menos deletérios ao meio ambiente contrasta com a eficácia dos princípios ativos dos desinfetantes existentes que auxiliam na higienização das granjas.

Medidas gerais de biossegurança, limpeza e desinfecção são extremamente importantes e necessárias para a segurança sanitária das propriedades. Em granjas de produção de frangos nos EUA, Bailey *et al.* (2005) relatam que foram analisadas 4 produtores e 135 carcaças de frango de corte produzidos a partir de 3 produtores no sistema *free-range* e em 1 produtor no sistema orgânico. Dos lotes avaliados, 9 (64%) da produção *free-range*, e 3 (100%) da produção orgânica, foram positivos para *Salmonella* spp. A partir das carcaças analisadas do sistema *free-range* e orgânico, 31% e 60% das mesmas foram positivas para o mesmo microrganismo respectivamente.

Em contraste com o grande número de isolados citado por Bailey *et al.* (2005), em trabalho realizado em uma companhia avícola de frango de corte do estado de Carolina do Norte nos Estados Unidos, Alali *et al.* (2010), avaliaram a prevalência de *Salmonella* spp. em 3 granjas de produção em sistema orgânico e em granjas com sistema convencional. Nesse trabalho, foi observado que 38,8% dos lotes produzidos em sistemas convencionais foram positivos para *Salmonella* spp., contra 5,6% dos frangos produzidos no sistema orgânico.

A comparação de sistemas de produção também foi relatada no Brasil por Teixeira *et al.* (2008), ao avaliarem a presença de *Salmonella* spp. em granjas produtoras de frangos de corte, porém não foi possível isolar esse agente no sistema de produção intensivo, tão pouco no sistema alternativo avaliado.

Na Holanda, Rodenburg *et al.* (2004), além de avaliarem a presença de *Salmonella* spp. em granjas de produção orgânicas de aves de corte, verificou-se a presença de *Campylobacter* spp. Das explorações avaliadas, 13% foram positivas para *Salmonella* spp. e 35% para *Campylobacter* spp. Ambos microrganismos estão relacionados a infecções alimentares e são os principais agentes bacterianos envolvidos em gastroenterites e infecções alimentares em humanos (EFSA, 2009; CDC, 2010a).

5. METODOS DE DIAGNÓSTICO

O diagnóstico de infecção por *Salmonella* spp. é realizado pelo isolamento e identificação desse agente. Esse procedimento é referenciado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), através da Portaria 126 de 03 de Novembro de 1995.

Neste contexto, os materiais a serem testados para o diagnóstico bacteriológico podem ser oriundos de diversos meios. A utilização de *swab* de cloaca, cama, ninho ou arrasto, bem como o processamento de *swabs* de carcaças ou órgãos como um todo, são utilizados para este fim (BRASIL, 1995).

5.1 Método de microbiologia convencional

O método de diagnóstico mais utilizado é o microbiológico convencional, o qual requer mais de cinco dias para confirmar uma amostra como pertencente ao gênero *Salmonella* (DICKEL, *et al.* 2005). Em razão desse grande espaço de tempo para o diagnóstico final, outros testes como Reação da Cadeia em Polimerase-PCR (FLORES, *et al.* 2001) ou ensaio imunoenzimático – ELISA (RODRIGUES, 2003) tem sido utilizados como testes de triagem. Entretanto, o método microbiológico convencional, ainda é utilizado como padrão ouro para a identificação de *Salmonella* spp.

A metodologia analítica utilizada para verificar a presença de *Salmonella* spp. baseia-se no pré-enriquecimento das amostras em água peptonada (AP)1% ou caldo de infusão cérebro coração(BHI), que são incubados a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 16 a 20 horas. A utilização de água peptonada tamponada favorece a manutenção do potencial hidrogeniônico (pH), evitando que o meio fique acidificado devido a presença de outras bactérias, prejudicando a recuperação das salmonelas.

Para o enriquecimento seletivo, o caldo Rappaport Vassiliadis (RV), que apresenta verde malaquita e cloreto de magnésio, os quais atuam como agentes seletivos da microbiota acompanhante e a presença de peptona de farinha de soja, a uma temperatura de $42 \pm 0,5^\circ\text{C}$ por 24 a 30 horas favorecem o crescimento de *Salmonella* spp. Outros caldos utilizados para o enriquecimento seletivo é o caldo selenito-cistina (SS) e o caldo tetracionato (TT), no qual, este último, recomenda-se o acréscimo de

solução de iodo e solução verde de malaquita. Em ambos os caldos também se incuba a uma temperatura de $42 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ por 24 a 30 horas.

O isolamento e seleção das colônias baseiam-se na seleção de colônias em pelo menos dois meios sólidos. Meios como Ágar Mc Conkey, Ágar Verde Brilhante com Novabiocina (BGN), Ágar Rambach, Ágar Xilose Lisina Desoxicolate (XLD) ou Xilose Lisina Tergitol 4 são recomendados pelo MAPA. Ambos Ágares são incubados a $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ por 24 horas e apresentam colônias de bactérias com diferentes características em cada meio.

A confirmação de colônias compatíveis nos Ágares se dá a partir de testes bioquímicos preliminares, seguido dos complementares. Nos testes bioquímicos preliminar, a presença de *Salmonella* spp. no meio *Triple Sugar Iron* (TSI), confere um pH alcalino e deixa-o com uma coloração amarela. O meio *Lysine Iron Agar* (LIA), mostra-se alcalino na base e escurecido no bisel, devido a produção de H_2S . Já no meio *Sulphur Indol Motility* (SIM), ela vai apresentar a presença de H_2S , que é traduzida pelo enegrecimento do meio no ponto ou ao redor do local de inoculação, permitindo verificar a motilidade da cepa. No mesmo meio ainda, faz-se a prova de indol. A utilização do caldo uréia, quando utilizada em amostras de *Salmonella* spp. vai apresentar reação de uréase negativa (BRASIL, 2003a).

Colônias compatíveis com o bioquímico preliminar são analisadas posteriormente com o bioquímico complementar, que são os testes para reação de Voges-Proskauer, prova de vermelho de metila, fenilalanina desaminase, lisina descarboxilase, arginina desidrolase, ornitina descarboxilase, utilização do malonato, sacarose, lactose, D-manitol, dulcitol e maltose.

Cepas que apresentarem perfil compatível com *Salmonella* spp. devem ser caracterizadas antigenicamente através do teste de aglutinação rápida com soro-antissômático “O” polivalente de *Salmonella*. A caracterização final pode ser realizada pela sorologia clássica ou ensaios como Premi[®]Test *Salmonella* (WATTIAU, *et al.*, 2008), ou pela análise de ribotipificação intergênica do DNA de *Salmonella* spp. (GUARD, 2011).

5.2 Utilização da técnica do Número Mais Provável

A técnica do número mais provável (NMP), é um método de análise quantitativo para microrganismos. Esse ensaio tem sido empregado para avaliar a qualidade microbiológica da água, como potável ou não (MARQUESI, 2010), bem como também para estimar a contaminação de carcaças de frango para *Salmonella* spp., desta forma mensurando o risco em adquirir uma infecção alimentar (BORSOI, *et al.* 2010).

O NMP é um ensaio que permite determinar o número mais provável de bactérias presentes em uma amostra, através da inoculação de alíquotas em uma série de tubos. A determinação do número de microrganismos é baseada no princípio de que, subdividindo a amostra em diluições, que poderão conter ou não microrganismos, será possível estimar o número de células bacterianas viáveis através de cálculos de probabilidade. Para isto é necessário que os microrganismos estejam distribuídos ao acaso e homogeneamente por toda a amostra (BLODGETT, 2006; SILVA *et al.* 2010).

A técnica é bastante versátil, permitindo a numeração de diferentes espécies de bactérias, alternando somente o meio de cultura e as condições de numeração para cada microrganismo. A aplicação deste ensaio foi proposto a partir da adaptação de métodos qualitativos para quantitativos, como a contagem de *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* e outros agentes que antes eram analisados somente pela presença ou ausência (SILVA, *et al.*, 2010).

6 MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 Amostragem e processamento

O material utilizado para o respectivo projeto foi proveniente de granjas de aves de postura localizadas no Estado do Rio Grande do Sul, que se encontravam em processo de certificação para produção em sistema orgânico.

A amostragem foi realizada por conveniência (THRUSFIELD, 2004), a qual envolveu uma epidemiologia descritiva horizontal através da observação da presença de *Salmonella* spp. e as possíveis fontes de contaminação. As amostras foram coletadas a partir de *swab* de cloaca de pintos de um dia, fundo de caixa de transporte, cama dos galpões, acesso a área externa dos aviários, ninhos de postura e ovos (casca e conteúdo interno), os quais serão descritos a baixo.

O processamento bacteriológico das amostras analisadas, foram realizados no Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária (CDPA), no Laboratório de Inspeção e Tecnologia de Leite e Derivados, Ovos e Mel (LEITECIA) e no Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva, todos, laboratórios da Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS.

6.1.1 Lote de aves

Foram monitorados 7 lotes de aves de postura da linhagem Isa Brown, adquiridas para a produção de ovos em sistema orgânico. As granjas avaliadas foram identificadas de A até E, e cada lote numerado através de números arábicos de forma crescente.

6.2 Amostragem

A coleta das amostras foram padronizadas e realizadas durante o alojamento das aves, seguindo das semanas 02, 11, 21, 31, 41, 51, 61 e 71, períodos semelhante ao realizado por Gama (2001) ao avaliar a frequência do isolamento de *Salmonella* spp em aves destinadas a postura, conforme anexo 1.

6.2.1 *Swab* de cloaca

A coleta de *swabs* de cloaca foi realizada de acordo com MAPA (BRASIL, 1995). No alojamento, procedeu-se coleta de material de cloaca utilizando *swabs* estéreis embalados individualmente para análise de presença ou ausência de *Salmonella* spp. Cada amostra analítica foi composta por um *pool* de *swab* individuais de três aves, armazenado em tubos contendo 10 mL de Água Peptonada Tamponada (APT) 1% Difco[®]. O número de pintos de um dia avaliados, correspondeu a 30% do número de aves alojadas. Após a coleta das amostras, as mesmas foram transportadas refrigeradas em caixas isotérmicas até a chegada das amostras ao laboratório.

6.2.2 Amostra de fundo de caixa de transporte

O procedimento para avaliar a presença ou ausência de *Salmonella* spp. do fundo das caixas de transporte seguiu os procedimentos indicados por Brasil (1995). A partir das mesmas, coletaram-se fragmentos do fundo, armazenados em ambiente refrigerado, transportado ao laboratório para posterior incubação em 150 mL de APT.

6.2.3 *Swab* de propé

Os *swabs* utilizados para a cama dos aviários foram de propés de pano. Cada par foi embalado individualmente, colocado em um frasco de vidro com 150 mL de APT, autoclavado por 15 minutos a 121°C, e refrigerado a 4°C.

Na granja, foram utilizados como padrão dois pares de propés de pano na área de cada aviário, os quais, após entrar em contato em toda extensão da cama, foram armazenados no frasco de vidro com APT. Cada frasco correspondeu a uma amostra do galpão de aves, ou seja, duas amostras da área interna por aviário. As amostras foram armazenadas refrigeradas em caixa isotérmicas para serem encaminhadas ao laboratório, para verificar a presença ou ausência de *Salmonella* spp. e paralelamente, executando-se a técnica de quantificação desse agente.

6.2.4 *Swab* do piso do acesso a área externa dos aviários

No acesso a área externa de cada aviário, foi utilizado um par de *swab* de propé de pano, embalado individualmente, colocado em frasco de vidro com 150 mL de APT, autoclavada por 15 minutos a 121°C, e refrigerado a 4°C. Após entrar em contato com o ambiente de acesso a área externa, os propés foram armazenados em frascos contendo APT. Cada frasco contendo o *swab*, correspondeu a uma amostra do acesso a área externa do galpão em cada coleta. Após as amostras serem encaminhadas ao laboratório, verificou-se a presença ou ausência de *Salmonella* spp. e paralelamente, executando-se a técnica de quantificação desse agente.

6.2.5 *Swab* dos ninhos

Os ninhos foram amostrados através de esfregação de superfície, avaliando a presença ou ausência de *Salmonella* spp. com posterior quantificação (SILVA, *et. al.* 2010). Em cada coleta, foram avaliados 09 ninhos.

A amostra analítica foi composta por 3 *pool* de três ninhos, aplicando o *swab* sobre a área amostrada, de 25x35 cm (875 cm²), com uma leve pressão, realizando movimentos da esquerda para a direita e depois de baixo para cima, girando para que toda a superfície de algodão entrasse em contato com a amostra. Os *swabs* foram armazenados em tubos de ensaio com 10 mL de APT. Considerando esse procedimento, cada mL da amostra correspondeu a 87,5cm².

6.2.6 Análise da casca e conteúdo interno dos ovos

A avaliação dos ovos para presença ou ausência de *Salmonella* spp. e sua quantificação por NMP procedeu-se em duas etapas, inicialmente analisando a casca e posteriormente o conteúdo interno. Cada amostra analítica foi composta por 6 ovos, e cada coleta, foi constituída de duas amostras, conforme recomenda Brasil (2003).

Cada ovo teve sua superfície lavada em saco estéril com a utilização de 10 mL de APT. Após a realização desse procedimento, o líquido da lavagem dos 6 ovos da unidade amostral foi reunido e compôs a amostra inicial que correspondeu a 60 mL. Esta foi armazenada em recipiente estéril. Após o procedimento de lavagem das cascas, os ovos foram imersos em uma solução contendo álcool etílico a 70°GL por 10 minutos,

e secos em placas estéreis em fluxo laminar. Os ovos foram abertos assepticamente, seu conteúdo depositado em saco estéril e homogenizado por 60 segundos para compor a amostra analítica a ser analisada. (BRASIL, 1995; PINTO *et al.*, 2009).

6.3 Procedimento microbiológico para detecção e quantificação de *Salmonella* spp.

6.3.1 Procedimento de detecção

A detecção de *Salmonella* spp. para determinar presença ou ausência foi realizada de todas as amostras provenientes das granjas de produção, seguindo a recomendação de Brasil (2003). As amostras foram processadas e incubadas a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 18 ± 2 horas em APT. Em seguida, o enriquecimento seletivo ocorreu a partir da transferência de 0,1mL de APT para 9,9mL de Rappaport Vassiliadis Difco[®] (RV), incubando 24 ± 2 horas por $42\pm 0,5^{\circ}\text{C}$. O RV foi semeado em meio Agar Verde Brilhante Difco[®] suplementado com novabiocina (BGN) e Xilose Lisina Tergitol-4 Difco[®] (XLT-4) e incubados a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$.

Placas com colônias enegrecidas no meio XLT-4 e róseas no meio BGN foram consideradas suspeitas para *Salmonella* spp. Colônias de cada amostra isolada, foram testadas com bioquímico preliminar (ágar TSI, SIM, LIA e caldo uréia). Colônias compatíveis nos bioquímicos preliminar foram também avaliadas no bioquímico complementar e quando compatíveis com *Salmonella* spp., submetidas a sorologia anti-soro polivalente (O) para *Salmonella* - Difco[®].

6.3.2 Procedimento para quantificação por NMP

Para a realização da análise quantitativa por número mais provável, procedeu-se 3 diluições decimais sucessivas em triplicata em APT 1% a partir da amostra inicial, conforme descrito por Silva *et al.* (2010) e Borowsky (2007), correspondendo a 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} das amostras provenientes da cama e do piso do acesso a área externa dos aviários, dos ninhos, da casca e conteúdo interno dos ovos.

A APT utilizada na armazenagem ou transporte dos *swabs* foi considerada a primeira diluição das amostras. Na diluição 10^{-1} da amostra de *swabs* de ninho, foi acrescentado APT (7 mL), aumentando o volume a ser incubado, como descrito por Dufrenne (2001).

No laboratório, as diluições foram incubadas a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 18 ± 2 horas. O enriquecimento seletivo ocorreu com a transferência de 0,1mL de APT de cada diluição para 9,9mL de RV, incubando por 24 ± 2 horas a uma temperatura de $42\pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Em seguida, os caldos foram semeados em BGN e XLT-4 para realizar o isolamento e quantificação, resultando em 18 placas.

A leitura das placas positivas foi realizada em série de três placas e o resultado composto por três números, correspondendo ao total de placas positivas por diluição, conforme descrito por Blodgett (2006).

6.3.3 Caracterização antigênica

Colônias morfológicamente compatíveis nos meios de cultura e que apresentaram comportamento bioquímico correspondente ao gênero *Salmonella* spp., foram submetidas a prova de detecção de antígenos somáticos polivalente (O) e caracterizadas antigenicamente com os soros anti-somáticos “B” (O4) e “D”(O9) de *Salmonella*.

Amostras positivas foram encaminhadas em ágar estoque para Fundação Osvaldo Cruz - FIOCRUZ para caracterização antigênica final.

6.3.4 Macro Restrição do DNA total e eletroforese em campo pulsado (PFGE) para *Salmonella* spp.

A metodologia proposta para o ensaio de PFGE foi realizada conforme CDC Pulse Net (2009), e foi realizada nas amostras de *Salmonella* Agona isoladas. O DNA cromossomal foi lisado com uma solução de Proteinase K. A restrição foi realizada com 20 U da enzima *Xba*I. Os fragmentos de DNA foram separados usando o equipamento CHEF-DR II (BioRad[®]-USA), nas condições de Tempo Inicial: 2.2s; Tempo Final 63.8s; voltagem de 6.0V e com um tempo de corrida de 20 horas. Após a eletroforese o gel foi colocado em uma solução de brometo de etídio (40 μ L EtBr 10mg/mL em 400 mL de água destilada) por 20 minutos e descorado em 3 lavagem com 500mL de água destilada a cada 10 minutos. Após esse período as amostras foram avaliadas em fotodocumentador (Gel Logic 2200 Pro[®]) para observar os resultados.

6.4 Análise dos dados

Foi realizada análise horizontal descritiva dos achados microbiológicos. A análise estatística utilizada para comparar as amostras pareadas nos meios sólidos foi o teste não paramétrico McNemar (CALLEGARI-JACQUES, 2003).

7. RESULTADOS

7.1 Ocorrência de *Salmonella* spp. nas granjas avaliadas

A investigação de *Salmonella* spp. foi realizada em 7 lotes de aves de postura. Das granjas avaliadas, 40% foram positivas para *Salmonella* spp. em algum momento do ciclo de produção (Tabela 1).

Tabela 1- Frequência de avaliação e ocorrência de *Salmonella* spp. nos lotes acompanhados

<i>Lotes</i>	<i>Aloj.*</i>	<i>Sem.</i> <i>02</i>	<i>Sem.</i> <i>11</i>	<i>Sem.</i> <i>21</i>	<i>Sem.</i> <i>31</i>	<i>Sem.</i> <i>41</i>	<i>Sem.</i> <i>51</i>	<i>Sem.</i> <i>61</i>	<i>Sem.</i> <i>71</i>
A1	NA	NA	NA	NA	NA	-	+	-	-
A2	NA	+	AS	AS	AS	AS	AS	AS	AS
A3	NA	-	-	-	-	-	NA	NA	NA
B1	+	+	-	-	-	-	-	NA	NA
C1	NA	NA	NA	NA	-	-	-	-	NA
D1	-	-	-	-	-	NA	NA	NA	NA
E1	-	-	-	-	-	-	NA	NA	NA

NA: Não acompanhado; AS: Abate sanitário; *Alojamento das aves; - Não houve isolamento; + Houve isolamento.

Dos lotes monitorados, foi isolado *Salmonella* spp. de três lotes (dois lotes da granja A e uma da granja B). Na propriedade A, o lote A1 foi acompanhado da 41^o semana até a 71^o semana de idade das aves, isolando *Salmonella* Agona de uma amostra analítica oriunda de ninho de postura.

Na mesma propriedade, houve isolamento de *Salmonella* Gallinarum em um segundo lote (A2), seguido de abate sanitário. Entretanto, como este isolamento foi realizado paralelamente ao experimento, o mesmo será descrito no capítulo 2. No terceiro lote (A3) produzido na mesma granja não foi possível isolar *Salmonella* spp. em nenhum momento do ciclo do lote avaliado.

Na granja B, o monitoramento ocorreu do alojamento das aves até a 51^o semana de idade. Duas amostras analíticas de *pool* de *swabs* de cloaca dos pintos de um dia no

alojamento e uma amostra analítica de *swab* de cama do aviário realizada na segunda semana foram positivas para *S. Agona*.

As granjas C, D e E avaliadas e seus respectivos lotes, apresentaram resultados negativos em todas as avaliações realizadas.

Através da avaliação horizontal dos lotes estudados, quanto à presença e ao número mais provável de células de *Salmonella* spp., verificou-se que o lote B1, positivo para *Salmonella* spp. no alojamento e na segunda semana, não manteve-se positivo durante ao longo do ciclo de produção. Já os lotes C1, D1 e E1, mantiveram-se negativos em todas as avaliações.

Diferentes sorotipos foram identificados nas granjas avaliadas. Os sorotipos isolados e sua procedência estão descritos na tabela 2.

Tabela 2 - Sorotipos de *Salmonella* spp. isolados de aves de postura orgânica

Lote	Idade	Origem do material	Sorotipo
A1	51 ^o semana	<i>Swab</i> de ninho	<i>S. Agona</i>
A2	5 ^o dia	<i>Pool</i> de órgãos	<i>S. Gallinarum</i>
B1	1 ^o dia	<i>Pool</i> de <i>swab</i> de cloaca	<i>S. Agona</i>
B1	1 ^o dia	<i>Pool</i> de <i>swab</i> de cloaca	<i>S. Agona</i>
B1	2 ^o semana	<i>Swab</i> de cama	<i>S. Agona</i>

7.1.1 Pesquisa de *Salmonella* spp em pintos de um dia e fundo de caixa

No presente estudo foram coletadas *swabs* de cloaca de três lotes da linhagem Isa Brown alojadas em três diferentes propriedades, sendo detectada a presença de *Salmonella* spp. em um lote, conforme exposto na tabela 3. Do total de 201 pintainhos avaliados, em 67 *pools*, *S. Agona* foi isolada de dois *pools* (2,98%), que correspondeu a seis aves provenientes do lote B1. Não foi detectada *Salmonella* spp. do fundo de caixa da transporte dos 3 lotes, inclusive do lote B1, o qual foi positivo nos *swabs* de cloaca.

Tabela 3 - Prevalência de *Salmonella* spp. nas amostras de swab de cloaca e fundo de caixa

	<i>Pool de Swab de cloaca</i>	<i>Swab de fundo de caixa</i>
Propriedades	Positivas	Positivas
B	9,09% (2/22)	0% (0/2)
D	0% (0/33)	0% (0/4)
E	0% (0/12)	0% (0/3)
TOTAL	2,98% (2/67)	0% (0/9)

7.1.2 Pesquisa e quantificação de *Salmonella* spp. de swab de propé de cama dos galpões

Durante o monitoramento dos lotes, foram avaliadas 46 amostras de swab de propé da cama. Do total, foi isolada somente uma amostra (2,17%), oriunda de um amostra de swab de propé da cama do lote B1, caracterizada como *S. Agona*. Em nenhum outro momento até a 51^o semana de idade do mesmo lote, foi isolado novamente esse agente. A partir da amostra isolada, verificou-se que a mesma apresentava 60,03 NMP/mL em uma área de 15,5 m², apresentando a mesma média de contagem nos meios XLT-4 e BGN, não demonstrado diferença significativa no teste McNemar. O número mais provável foi calculado conforme arquivo disponibilizado no formato *online* no site do BAM (BLODGETT, 2006), fornecendo dados que não estão disponíveis nas tabelas de calculo de NMP.

7.1.3 Pesquisa e quantificação de *Salmonella* spp. de swabs de propé no acesso a área externa dos galpões

Foram analisadas 20 amostras de swab do acesso a área externa dos aviários. Não foi detectada a presença de *Salmonella* spp. nas amostras avaliadas.

7.1.4 Pesquisa e quantificação de *Salmonella* spp. em ninhos

Foram avaliados os lotes A1, B1, C1, D1 e E1. A partir de uma amostra de *swab* de ninho do lote A1, foi possível isolar *Salmonella* Agona, a qual correspondeu a 2,22% (1/45) do total de ninhos avaliados, ou 11,11% (1/9) *pools* de ninhos avaliados no lote A1. A média de contagem de células no meio XLT-4 foi 3,0 NMP/mL em uma área de 0,125m², não havendo isolamento no meio BGN. Os resultados da contagem nos dois ágaros utilizados não apresentaram diferença significativa.

7.1.5 Pesquisa e quantificação de *Salmonella* spp. em casca e conteúdo interno dos ovos

Das 30 amostras de ovos, não foi detectada *Salmonella* spp. da casca e do conteúdo interno.

7.2 Resultado do PFGE

O PFGE mostrou tipabilidade de 100% das amostras de *Salmonella* Agona, gerando dois perfis no total. Como é possível observar na figura 1, as amostras 1 e 2 isoladas de *swab* de cloaca do lote B1, mostraram perfil genético idêntico. Uma segunda amostra (amostra 4), a qual foi isolada na semana seguinte dos isolados de *swab* de cloaca, do mesmo lote, apresentou perfil genético diferente das amostras 1 e 2, constatando a presença de dois perfil genético circulando na mesma granja. Já o perfil genético gerado a partir da amostra 4, referente ao lote B1, foi compatível com o isolado do *swab* de ninho do lote A1.

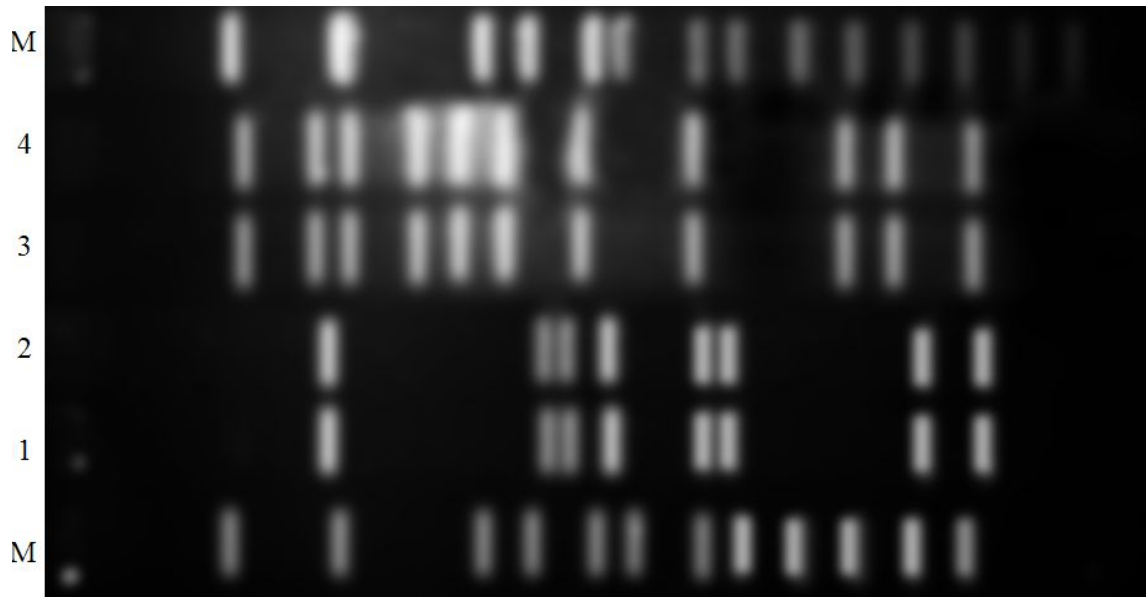


Figura 1- Macrorestrição de DNA total de *Salmonella Agona* com perfil gerado por PFGE, utilizando a enzima *XbaI*. Amostra 1 e 2 (swab de cloaca); amostra 3 (swab de ninho); amostra 4 (swab de cama); M (*S. Braenderup H9812*) utilizada como marcador.

8 DISCUSSÃO

O controle de salmonelose em aves continua sendo imprescindível em qualquer sistema de produção. Além de impedir a presença de *Salmonella* spp. em plantéis avícolas, têm-se preocupado com o potencial de transmissão desse agente através de carne e ovos. *Salmonella* spp. é uma importante bactéria envolvida em doenças transmitidas por alimentos no estado do Rio Grande do Sul (COSTALUNGA, *et al.* 2002; NADVORNY, *et al.* 2004), a qual é centrada de trabalhos com o intuito de evitar a transmissão para seres humanos.

Baümer *et al.* (2000) acreditam na hipótese de que o aumento das infecções alimentares causadas por *Salmonella* spp. teve origem na década de 1960, devido particularmente a emergência do sorotipo *S. Enteritidis*, que hoje é o patógeno mais associado a doenças de origem alimentar oriundas de produtos avícolas. Ainda no mesmo ano, o aumento desse sorotipo na Inglaterra e EUA sugerem que o declínio de *S. Pullorum* pode ter favorecido o aumento da *S. Enteritidis*.

No Brasil, observou-se no Estado de São Paulo um aumento acentuado do isolamento de *Salmonella* spp. principalmente *S. Enteritidis* a partir do ano de 1994, oriundo de fontes humanas e não humanas (FERNANDES, 2003). O Ministério da Saúde relata que 42,5% dos surtos relacionado à DTA (doenças transmitida por alimento), estão associados a este agente, que é o relatado com maior frequência em surtos (BRASIL, 2009; SÚAREZ, 2011).

Outros sorotipos são reconhecidos por seu potencial patogênico, como *S. Tiphymurium*, a qual pode provocar quadro de septicemia em animais e seres humanos. Sorotipos como *S. Infantis* e *S. Agona* estão envolvidos em infecções graves em crianças, além da existência de relatos de multirresistência a antimicrobianos para *S. Agona* (FONSECA, 2003, 2006; MULVEY, 2004). Durante o monitoramento dos lotes, neste experimento, o isolamento de *S. Agona* foi relatado em 3 dos 7 lotes acompanhados e em 4 dos 5 isolamentos de *Salmonella* spp. realizados.

Diversos sorotipos estão envolvidas em surtos de DTA (BERCHIERI, *et al.* 2009), dentre eles, o sorotipo *S. Agona* o qual também foi isolado nesse trabalho. A *S. Agona* foi responsável por surtos na Europa e Estados Unidos associados a produtos alimentícios e cereais (BERCHIERI, 2000; CDC, 2008; O'FLANAGAN, *et al.* 2008). Em trabalho relatado por Hofer *et al.* (1997), foram analisados, durante os anos de 1962-1991, sorotipos oriundos de aves de diversas regiões do Brasil. *Salmonella* *Agona*

foi classificada como sorovar comum mas não frequente entre os anos de 1972-1981 e frequente entre os anos 1982-1991. No mesmo sentido, Hofer *et al.* (1998) avaliaram a presença de *Salmonella* spp. provenientes de matérias primas e rações para aves durante doze anos consecutivos (1979 a 1991). Isolaram 2.293 amostras, dos quais se isolou 151 sorotipos diferente deste agente. Entre os sorotipos mais isolados estavam *S. Agona*, *S. Montevideo*, *S. Senftenberg*, *S. Havana*, *S. Mbadanka*, *S. Tennessee*, *S. Infantis*, *S. Anatum*, *S. Cerro*, e *S. Bredeney*.

Ainda no Brasil, segundo Pignatari (2011), foram isoladas 1781 amostras de *Salmonella* spp. de carcaças de frangos e perus provenientes de diversos abatedouros, durante os anos de 2005 a 2009 (dados preliminares do Programa de Redução de Patógenos), sendo que 7% das amostras foram caracterizadas como *S. Agona*. Dados apresentados por Freitas (2011), oriundos deste mesmo programa, mostram que, através da ribotipagem, *S. Agona* foi o sorotipo mais isolado de perus entre os anos de 2004 a 2010 (31,71%). Em frangos, este sorotipo foi encontrado em 5,32% das amostras isoladas, sendo o terceiro mais isolado, ficando somente atrás de *S. Enteritidis* com 47,75% e *S. Typhimurium* com 9,03%.

Deve ser levado em consideração que aves portadoras de salmonelas paratíficas não apresentam sinais clínicos, dificultado a identificação da infecção (GAST, 2008), contribuindo para o aumento da incidência dessa bactéria em alimentos.

A detecção dos lotes positivos é essencial, pois permite traçar estratégias que culminem com a eliminação desse microrganismo, o qual pode prejudicar o desenvolvimento do lote, causando sérios danos à produção, além de ser um dos principais protagonistas em quadros de DTA. Gast (2008), ressalta que o cultivo bacteriológico tem sido empregado em programas de monitoramento para *Salmonella* spp., o qual permite detectar e identificar os sorotipos envolvidos.

Relatos de pesquisa de *Salmonella* spp. em produção orgânica ou alternativa para a produção de ovos são escassos. Entretanto, dados obtidos de aves de postura e corte produzidos em sistemas industriais convencionais foram analisados e utilizados para fins de comparação.

A presença de aves positivas no primeiro dia de vida pode ser decorrente da incubação de ovos positivos, o que possibilita uma posterior transmissão horizontal entre as aves. Existem duas possibilidades de contaminação vertical dos ovos a qual originará aves contaminadas. Contaminação através da penetração de *Salmonella* spp., no momento da ovoposição através da casca (GAST, 2008; De REU, *et al.* 2006), ou

através da contaminação da gema ou albúmen antes da formação da casca do ovo (MIYAMOTO *et al.* 1997, OKAMURA, *et al.* 2001;).

A excreção de *Salmonella* spp. pelas aves nos nascedouros contribui para a difusão da bactéria no ambiente interno dos incubatórios (SONCINI, 2000) contaminando-as através da ingestão ou inalação de material contaminado (CHAO, *et al.* 2007; BERCHIERI Jr, *et al.* 2009). Gast *et al.* (1998) ressaltam que aves expostas a *Salmonella* spp. no período final de incubação ou nas primeiras horas de vida podem albergar por longos períodos esta bactéria no organismo e a qualquer momento podem disseminar para outras aves susceptíveis ou produzir ovos contaminados durante a ovoposição, resultando em uma nova fonte de contaminação.

A incidência de 2,98% das aves de um dia positivas para *Salmonella* spp. encontradas no presente trabalho, está próximo ao percentual encontrados por Rocha *et al.* (2003), que ao avaliarem 18 lotes de pintinhos de um dia de três integradoras de frango de corte, obtiveram 3% de positividade para *S. Enteritidis*. Diferentemente de Gambiragi *et al.* (2003), o qual não obtiveram resultados positivos ao avaliarem em *swabs* de cloaca de pintinhos de um dia de idade proveniente de 3 empresas avícolas produtoras de frango de corte de Fortaleza-CE.

Ainda, Rocha *et al.* (2003), ao avaliarem o fundo de caixas de transporte de aves de um dia destinada a postura, identificaram 11,1% das amostras positivas para *S. Enteritidis* e *S. Heidelberg*, diferindo do resultado desse trabalho, onde não foi possível isolar o agente neste local. Salles *et al.* (2008), também ao avaliarem em *swab* de caixas de transporte de pintinhos de um dia destinado para postura de 8 empresas em Fortaleza-CE, também não detectaram *Salmonella* spp. nas amostras.

Aves de um dia positivas para *Salmonella* spp. são fontes de infecção para granjas avícolas. Avaliações constantes com intuito de verificar o *status* dos lotes frente a este agente são fundamentais para garantir a qualidade do produto final. A utilização de *swab* de arrasto ou propé é eficaz no isolamento desse microrganismo na cama dos aviários e foi proposto em substituição ao cultivo de cama (KINGSTON, 1981; BYRD, *et al.*, 1997). Esta técnica é recomendada por poder determinar se está havendo a excreção intestinal de *Salmonella* spp. pelas aves no ambiente, a qual, além de indicar que o lote é positivo, indica a possibilidade de transmissão horizontal (RODRIGUES, 2002).

Através da técnica de isolamento utilizada, observou-se que 2,17% (1/46) das amostras de *swabs* de propé da cama dos aviários foram positivas para *Salmonella* spp.,

sendo caracterizada como *S. Agona*. Já no acesso a área externa dos aviários, não foi detectada este microrganismo.

Os sistemas intensivos de produção, os quais proporcionam uma alta densidade de animais, favorecem um ambiente propício para multiplicação e disseminação de diversos patógenos (ANDREATTI FILHO *et al.*, 2009). O emprego de cama para a produção de aves se dá principalmente para avicultura de corte, e Andreatti Filho *et al.* (2009) ao verificarem a presença de *Salmonella* spp. neste tipo de produção, mediante a utilização de *swab* de arrasto durante os anos de 2005 a 2007 (total de 806 amostras), identificaram 22 amostras positivas para *Salmonella* spp. Dos sorotipos isolados, 11 foram identificados como *S. Give*, 4 como *Salmonella enterica* subespécie *enterica* – cepa rugosa, 2 *S. Enteritidis*, 2 *S. Infantis*, 1 *S. Kentucky*, 1 *S. Rissen* e 1 *S. Senftenberg*. Embora Chernaki-Leffer *et al.* (2002) não tenham isolado esse agente de *swab* de arrasto em aviários no oeste do Paraná, torna-se indispensável a implantação e manutenção de programas rigorosos de biossegurança em granjas avícolas para reduzir a contaminação de produtos por *Salmonella* spp.

Também ao avaliar horizontalmente a produção convencional de frangos de corte, Borsoi. (2005) isolaram através de *swab* de arrasto em cama de aviários 15,8% de amostras positivas, identificando os sorotipos *S. Enteritidis*, *S. Agona*, *S. Tennessee*, *S. Ohio*, *S. Rissen*, *S. enterica* O: 3, 10, e S. O: 6, 71. Já Boni (2007) ao avaliar *swabs* de cama de aviários de frango de corte na região de Campo Grande-MT, verificou que 3,73% das amostras foram positivas para *Salmonella* spp., identificando *S. Senftenberg*, *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis*.

Em granjas produtoras de ovos, o sistema empregado para a produção geralmente são gaiolas, embora ainda há produção sobre cama (UBA, 2008). Rodrigues (2003) ao realizar pesquisa de *Salmonella* spp. em 6 granjas de postura comercial verificou a presença deste agente. Em uma granja houve o isolamento de *S. Ohio* a partir de *swab* de cloaca, entretanto não evidenciou a presença de *Salmonella* spp. através do *swab* de arrasto. Em outras duas granjas, o mesmo autor relata que foi possível identificar, em uma granja, *S. Senftenberg* a partir do *swab* de cloaca e de arrasto, e em uma segunda granja, identificou *S. Schawarzengrund* em *swab* de cloaca, além de *S. Schawarzengrund* e *S. Ohio* com o uso do *swab* de arrasto. Em outras 3 granjas analisadas, não foi possível isolar o agente.

O fator chave que permite que o ovo seja um potencial veículo de infecção para seres humanos, é a forma como as pessoas manipulam o produto durante a produção,

comercialização e consumo (BRADEN, 2006; VAN-IMMERSEEL, 2011). Estratégias que são empregadas desde o momento da postura até a comercialização dos ovos para consumo são importantes para evitar a perpetuação e disseminação de zoonoses (SESTI, 2005; VAN-IMMERSEEL, 2011).

Grande parte dos surtos de doenças de origem alimentar em seres humanos está associada a produtos de origem avícola (DICKINS, 2002), entre eles, ovos contaminados. A fim de reduzir a contaminação dos mesmos, um correto manejo e limpeza dos ninhos são práticas essenciais que contribuem para a manutenção da qualidade dos produtos (SESTI, 2005; GANTOIS, *et al.*, 2009).

Não foi possível isolar *Salmonella* spp. da casca e do conteúdo interno dos ovos avaliados. Esse resultado está de acordo com BAÚ *et al.* (2001), que relatam não ter encontrado esse agente em amostras de casca e conteúdo analisadas de ovos comercializados no município de Pelotas - RS, mas difere das taxas de 0,2 e 2% encontradas em dois lotes respectivamente avaliados por Gama *et al.* (2003), no estado de São Paulo, ao homogeneizar individualmente ovos com casca e conteúdo interno. Oliveira e Silva, (2000) ao analisarem ovos comercializados em Campinas, SP, identificaram a ocorrência de *Salmonella* Enteritidis em 9,6% e 3,2% de na casca e gema de respectivamente. Os mesmos autores ainda relatam que ao contaminar casca de ovos com o mesmo sorotipo e mantê-los armazenados em temperatura ambiente e refrigerados por 21 dias, foi possível observar que a contaminação de *S. Enteritidis* da casca para a gema a partir de 24 horas de incubação, ocorrendo com maior intensidade em ovos mantidos em temperatura ambiente.

Na Europa, produção de ovos em sistemas convencionais (gaiolas), segundo a Autoridade Europeia de Segurança Alimentar – EFSA (de sua sigla em inglês) está associada a um maior risco de *Salmonella* spp. quando comparado a outros sistemas de produção, como por exemplo a produção de ovos em sistema orgânico (EFSA, 2007). A avaliação de risco da *S. Enteritidis* conduzida pelo Serviço de Inspeção e Segurança Alimentar – FSIS (de sua sigla em inglês), relata que esse sorotipo é responsável por grande parte dos surtos envolvendo *Salmonella* sp., evidenciando que, quando a temperatura dos ovos permanece acima de 20°C após a postura há favorecimento da multiplicação bacteriana (FSIS, 2005).

Durante os anos de 2004 e 2005, a frequência de distribuição de sorotipos isolados de sistemas de produção de ovos na União Europeia, identificou *S. Enteritidis* como responsável em 52,3% dos isolamentos, seguido por *S. Infantis* – 8,4% e *S.*

Tiphymurium – 4,8%. *S. Agona* foi o 10º sorotipo mais isolado, com 1,1% das amostras (EFSA, 2007).

Através da compilação de dados do Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária - CDPA, durante os anos de 2002 a 2008, foram analisadas 1905 ovos. Destes ovos, somente dois ovos individuais foram positivos, sendo caracterizado como *Salmonella Gallinarum*. A partir desse isolado, observou-se que há a capacidade de isolamento desse agente através de ovos, ainda que em baixa prevalência e envolvendo sorotipo de pouca importância para a saúde pública. Apesar da *S. Gallinarum*, não ser considerada patogênica para o homem, mas responsável por danos para a avicultura, faz necessário tomar as medidas exigidas pela legislação em vigor, com vistas a evitar perdas econômicas causadas por essa doença, em especial em aves de reprodução (PERDONCINI, *et al.* 2010). Gast (2000) complementa que embora seja possível o isolamento de *Salmonella* de ovos, a maior dificuldade está relacionada a liberação intermitente desse agente, o que torna o isolamento desafiante. Devido à eliminação pelas fezes não ser contínua, o isolamento de *Salmonella* spp. em ovos torna-se muito baixo (HUMPREY, *et al.* 1989).

Considerando que a infecção de seres humanos por *Salmonella* spp. segundo Varnam (1991), *apud* Mürmann *et al* (2008), se dá através da ingestão de doses entre 10^5 e 10^7 unidades formadoras de colônias, a quantificação desse agente pode auxiliar na análise do comportamento quantitativo desde o ambiente de produção de ovos até o produto final. Nesse trabalho ao quantificar as amostras positivas, foi possível verificar em duas amostras provenientes de aviários distintos, a quantidade de 60,03 NMP/mL e 3,0 NMP/mL para ninho e cama respectivamente. Como não houve outros isolados de ambiente e ovos dos lotes positivos, não foi possível de correlacionar o comportamento quantitativo de *Salmonella* spp.

A identificação de *Salmonella* pelas suas características fenotípicas é o método mais comum de verificar a identidade de uma amostra (OLSEN, 1993). Nos últimos anos a avaliação genotípica esta sendo associada à caracterização fenotípicas, obtendo melhor discriminação dos isolados, o que possibilita verificar o perfil e os clones circulantes (OLSEN, *et al.* 1993; OLIVE *et al.* 1999), auxiliando na associação de surtos com a sua respectiva fonte (CHRISTENSEN, *et. al.* 1994).

A utilização da técnica de PFGE, considerada como “padrão ouro” de tipificação molecular, devido ao elevado poder de discriminação que possui (OLIVE, 1999),

permitiu verificar dois padrões das 4 *S. Agona* isoladas nesse trabalho. Um perfil isolado do ambiente (cama e ninho) e um segundo perfil dos *swab* de cloaca.

O perfil encontrado do isolado do *swab* de cloaca, oriundo do lote B1, foi compatível com perfil clonal da amostra isolada de *swab* de propé da cama do aviário na semana seguinte do mesmo lote, demonstrando a presença de dois perfis genéticos circulando na granja B1. Entretanto, o perfil genético isolado do *swab* oriundo da cama do lote B1, foi o mesmo identificado a partir do isolado do *swab* de ninho do lote B1, sugerindo uma possível contaminação cruzada entre as granjas.

A partir dos perfis genéticos gerados nesse trabalho através do PFGE é possível realizar futuras associações com a presença ou ausência de genes, que são responsáveis pela adesão, invasão e virulência da *S. Agona* e que poderão determinar a capacidade de causar infecções sistêmicas tanto em aves como em seres humanos. Esses estudos, além de permitir o conhecimento das características dos diferentes clones, podem contribuir como ferramenta de futuros estudos epidemiológicos.

Em trabalho realizado por Mürmann *et al* (2008), a utilização da ferramenta de macrorestrição permitiu verificar o perfil de *Salmonella* spp. isoladas de amostras de alimentos envolvidos em surtos alimentares no ano de 2005 no Rio Grande do Sul. Todos os isolados foram caracterizados como *S. Enteritidis* e apresentaram um único perfil de macrorestrição, demonstrando somente haver um perfil clonal envolvidas nos surtos.

9 CONCLUSÃO

Tendo em vista os resultados encontrados, verificou-se que sistemas alternativos de produção de ovos, também estão propensos à contaminação por *Salmonella* spp. Este microrganismo pode ser introduzido em granjas avícolas, através de aves de um dia contaminadas, acarretando severos danos a produção. A presença *Salmonella* Agona em aves de um dia, isolado através de *swab* de cloaca nese trabalho, indica que este meio pode contribuir para a entrada e disseminação deste agente em galpões de produção. Quando isolado no ambiente (cama e ninho), pode predispor que ovos contaminem-se, e sejam possíveis meios de transmissão de *Salmonella* spp.

10 ARTIGO – TIFO AVIÁRIO EM UMA EXPLORAÇÃO DE AVICULTURA DE POSTURA ALTERNATIVA NO SUL DO BRASIL: RELATO DE CASO¹

Resumo:

O tifo aviário é uma doença septicêmica que afeta diversas espécies de aves, dentre elas, galinhas e perus. É uma enfermidade de distribuição mundial, com casos esporádicos em Países da Europa e America do Norte e presente com uma maior frequência em países da América do Sul e Central, África e Índia. Sua presença tem sido relatada em sistemas de produção como granjas de postura comercial e frangos de corte. Nesse presente trabalho, relata-se um caso de Tifo Aviário em uma exploração de aves de postura que se encontrava em processo de certificação para a produção em sistema orgânico. A partir do quadro clínico do lote, a qual as aves apresentaram mortalidade de 33,7% no 9º dia de vida e o isolamento de *Salmonella Gallinarum* de órgãos coletados na necropsia das aves, confirmou-se o quadro de tifo aviário.

Palavras Chaves: *Salmonella Gallinarum*, pintos de um dia, ovos.

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos a produção alternativa de alimentos, dentre eles, ovos orgânicos, vem se expandindo no Brasil e atraindo cada vez mais produtores para atender este nicho de mercado. Este sistema que otimiza o uso dos recursos naturais, teve origem na Europa nos anos 80, período em que os consumidores exigiam cada vez mais qualidade nos produtos que eram consumidos (LAMPKIN, 1997; JAENICH, 2008). A produção de ovos passou por mudanças, alterando então, o atual sistema de gaiolas empregado nas granjas para sistemas de criação em ambientes aberto (*free-range*).

No entanto, como no sistema industrial, este método de produção de aves também está propenso a doenças, dentre elas, o tifo aviário, o qual impacta diretamente na sanidade do plantel. O Tifo aviário, o qual é causado pela *Salmonella Gallinarum*, é caracterizado como uma doença septicêmica que afeta principalmente galinhas e perus.

¹ Artigo formatado para a revista Brazilian Journal of Microbiology, aguardando tradução para língua inglesa.

Esta doença geralmente é observada em aves adultas, porém este agente é patogênico para aves em todas as idades (SHIVAPRASAD e BARROW, 2008; BERCHIERI JÚNIOR e FREITAS NETO, 2009), sendo relatado com uma maior frequência em aves de postura (CHRISTENSEN, *et. al.* 1994; PULIDO e MANTILLA, 2009).

Esta enfermidade está distribuída mundialmente, presente principalmente em países da América Central e do Sul, Índia e África (SHIVAPRASAD e BARROW, 2008). Na Europa, há relatos esporádicos de tifo aviário, com o relato de surtos ocorridos na Alemanha e na Dinamarca na década de 90 (CHRISTENSEN, *et. al.* 1994). Na América do Sul, em granjas avícolas da Colômbia, a partir do ano de 2003 houve um aumento da incidência de *Salmonella*, se agravando no ano de 2006 quando houve vários problemas sanitários, principalmente em granjas produtoras de ovos (PULIDO e MANTILLA, 2008). No Brasil tem sido diagnosticada a presença desta doença em aves de postura comercial, apesar de ocorrer também em aves reprodutoras (BERCHIERI JÚNIOR e FREITAS NETO, 2009).

O controle do tifo aviário e da pulorose na produção industrial de aves iniciou após a implantação de programas direcionados para a eliminação desses agentes dessas enfermidades do ciclo produtivo avícola. Nos Estados Unidos da América, foi implantado na metade do século XX o Plano Nacional de Melhoramento Avícola, o qual visou o controle da disseminação destas doenças (SHIVAPRASAD e BARROW, 2008). Trabalho semelhante foi realizado no Brasil após a instituição do Plano Nacional de Sanidade Avícola na década de 90 (BRASIL, 1994), o qual objetivou a eliminação de lotes positivos para *S. Gallinarum* e *S. Pullorum*.

A *Salmonella Gallinarum*, responsável pelo tifo aviário é altamente patogênico para aves em qualquer idade, no entanto sua ocorrência é maior em aves adultas, ocasionando mortalidade que podem chegar de 40-80% do plantel. A transmissão pode ocorrer por diversas vias, incluindo a vertical (BERCHIERI JÚNIOR e FREITAS NETO, 2009), onde o número de ovos contaminados pode chegar a 33% (SHIVAPRASAD, *et al.* 2008). O mesmo autor ressalta a importância da transmissão horizontal, que se dá principalmente através da ingestão de fezes entre as aves, consumo de ovos contaminados ou pelo canibalismo, permitindo dessa forma uma rápida propagação da enfermidade.

RELATO DE CASO

Em dezembro de 2010, o Centro de Diagnóstico em Pesquisa e Patologia Aviária (CDPA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul recebeu 3 aves de 5 dias de idade da linhagem Isa Brow, provenientes de um lote com 267 aves, de uma granja em processo de certificação para produção em sistema orgânico. As aves do lote começaram a apresentar na primeira semana de idade sinais de prostração, asas caídas, cicatrização deficiente do umbigo e acúmulo de fezes com coloração escura na região cloacal. No início da segunda semana exibiam fraco desenvolvimento corporal, com 60 gramas a menos do que o esperado para a linhagem.

As pintinhas apresentaram aumento da mortalidade a partir do terceiro dia de vida (Gráfico 1), com incremento nos dias subsequentes. No dia 09, a mortalidade acumulava mais de 33% (90/267) e o lote apresentava-se desuniforme. No dia 10 foi realizado o abate sanitário do restante das aves do lote (Gráfico 2) através de eletrocussão individual (OIE, 2011).

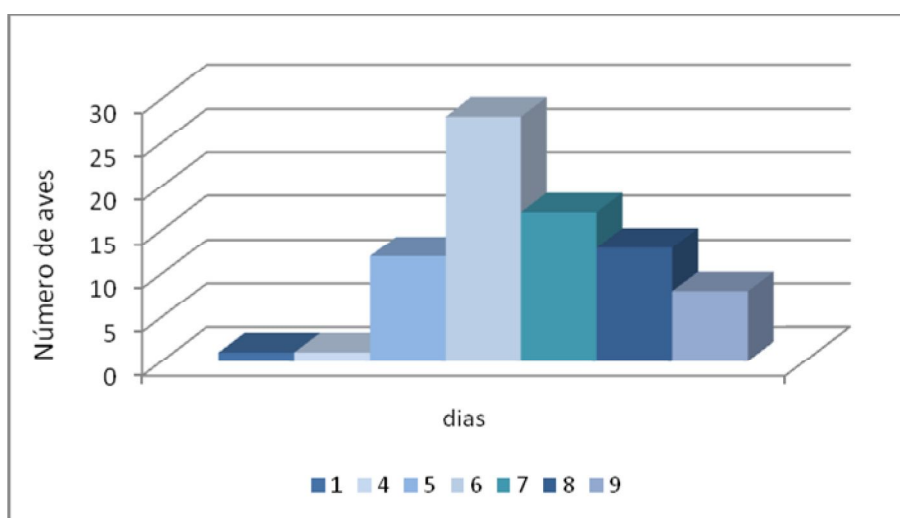


Gráfico 1. Evolução da mortalidade das aves.

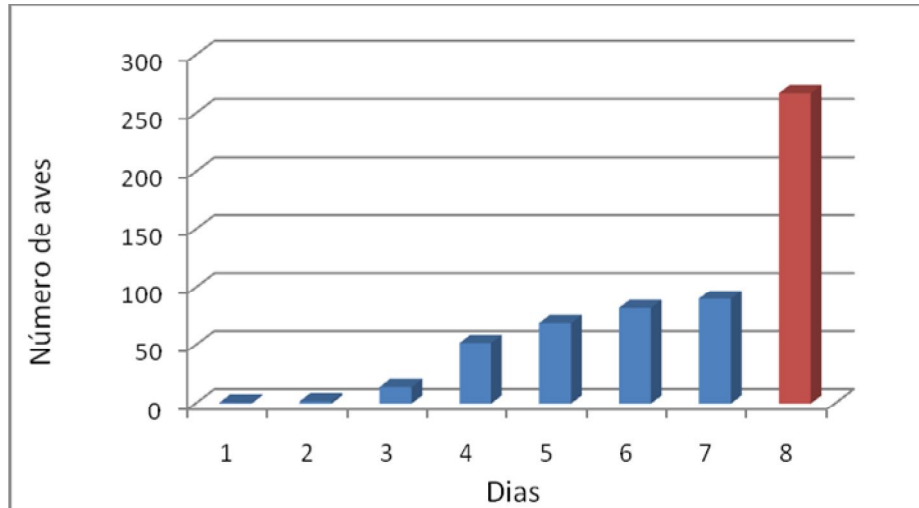


Gráfico 2. Mortalidade acumulada das aves. O dia 10 representa o dia do abate sanitário do lote.

Achados de necropsia

As aves necropsiadas apresentavam uma condição corporal inadequada para idade e linhagem, além de fraqueza e anormalidade de empenamento.

No sistema respiratório foi observada presença de espuma nos sacos aéreos abdominais em pequena quantidade e sem alterações macroscópicas aparentes na traquéia e pulmões. No sistema digestivo, foram detectados alguns grãos de arroz inteiros localizados no papo. Foi encontrado esplenomegalia e hepatomegalia com áreas amareladas. Observa-se na Figura 01, a presença do saco vitelino não absorvido, com coloração esverdeada e presença de vasos sanguíneos.

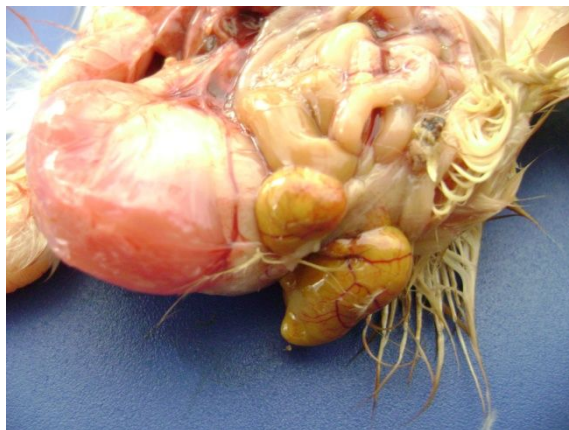


Figura 01: Saco vitelino não absorvido e com presença de vasos sanguíneos.

RESULTADOS

A partir dos achados do histórico do lote e da necropsia, suspeitou-se de salmonelose. Durante a realização da necropsia foram coletadas amostras do fígado, baço, coração e saco vitelino para o processamento no laboratório de bacteriologia do Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária (CDPA) para a pesquisa de *Salmonella* spp.

O isolamento de *Salmonella* spp. foi realizado de acordo com Brasil (1995). Foram isoladas duas colônias suspeitas de *Salmonella* spp. do pool de órgãos citados anteriormente. A partir dos testes bioquímicos e sorológicos, as colônias foram compatíveis com *Salmonella* Gallinarum. A confirmação do sorotipo foi realizada através do Premi[®] Test *Salmonella* .

DISCUSSÃO

O Tifo Aviário, doença causada pela *S. Gallinarum*, quando presente em granjas avícolas afetam diretamente o desenvolvimento e a produção das aves, gerando altas perdas econômicas. No presente relato de caso, foi identificada a presença de *Salmonella* Gallinarum em um lote de aves jovens que apresentou alta mortalidade. Aves positivas para esse agente, podem se infectar ao nascer, observando a presença de aves mortas ou moribundas, com quadro clínico de sonolência, debilidade, diminuição do apetite e pobre crescimento.

A mortalidade ocasionada por *S. Gallinarum* pode apresentar-se rapidamente depois da observação dos primeiros sinais. No presente relato o lote apresentou mortalidade dos pintinhos logo após o alojamento, com uma maior mortalidade diária no sexto dia. Tal quadro está de acordo com as observações feitas por vários autores para aves contaminadas através da transmissão vertical por *Salmonella* Gallinarum (SHIVAPRASAD *et al.* 2008; BERCHIERI JÚNIOR, 2006). Lotes positivos para este mesmo agente, foi relatado por Pulido e Mantilla (2008) na Colômbia em lotes de aves de postura comercial, apresentando uma diminuição na produção na ordem de 30 a 50% e uma mortalidade que variou de 10 até 80% nos lotes afetados.

Gama *et al* (2003) relatam que aves positivas para *Salmonella* spp. no primeiro dia de vida permanecem positivas até a fase adulta, contaminando a produção de ovos ou carne. Rocha *et al.* (2003) e Perdoncini *et al.* (2011), ao avaliarem pintinhos de um

dia quanto a presença ou ausência de *Salmonella* sp. em aves destinadas para a produção de corte, descrevem o isolamento de 3% de positividade para *S. Enteritidis* e 2,33% para *S. Typhimurium* no isolamento a partir de órgãos, respectivamente, sugerindo a possibilidade de transmissão vertical.

Já Zancan *et al.* (2000) ao pesquisarem *Salmonella* spp. em caixas de pintos de um dia destinado a postura comercial, encontraram 50% de lotes positivos, demonstrando a possibilidade de transmissão de *Salmonella* Mbandaka, caracterizando isso como um fator importante de introdução de *Salmonella* spp. nas granjas. Da mesma forma, Gama (2003) também ao avaliar caixas de transporte de aves de um dia destinada à postura comercial, encontrou 33,3% das mesmas positivas para *S. Enteritidis*.

Na legislação brasileira, através da Instrução Normativa 78 de 2003c, é mandatória a condição de avós e matrizes livres *S. Gallinarum* e *S. Pullorum*, e controlado ou livre de *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium, buscando com isso, garantir que as explorações permaneçam com a ausência desses agentes, os quais podem ser transmitidos para a progênie, e conseqüentemente, contaminando os produtos avícolas (BERCHIERI JÚNIOR, A. *et al.*,2000; BRASIL, 2003a).

Toda doença causa de alguma forma prejuízo para o produtor e/ou para o consumidor. Visto isto, programas de prevenção devem ser baseados frente ao comportamento das enfermidades, constituindo programas fundamentados em limpeza, higiene e desinfecção, que devem ser avaliados e empregados no dia a dia das granjas. No sistema orgânico de produção, a redução da contaminação das granjas baseia-se principalmente em medidas preventivas e utilização de produtos biodegradáveis (JAENISCH, 2008), diferentemente da produção industrial, que possui uma gama maior de produtos que podem ser utilizados. O hipoclorito de sódio, peróxido de hidrogênio, ácidos orgânicos ou outras substâncias previstas na legislação brasileira podem ser utilizadas nas instalações e equipamentos relacionados à produção em sistema orgânico (BRASIL, 2011), auxiliando na prevenção de enfermidades e disseminações de doenças.

Do mesmo modo que o sistema de produção convencional é susceptível a injúrias e prejuízos, a produção de aves em sistema orgânico, o qual foi relatado o caso de tifo aviário, também é susceptível. Ao avaliar o quadro clínico resultante da presença da *Salmonella* Gallinarum no lote, observa-se a importância de manter sob controle este patógeno, o qual implica negativamente na produção de aves.

REFERÊNCIAS

BERCHIERI JÚNIOR, A. *et al.* (2000). Experimental Salmonella Gallinarum infection in light laying hen lines. *Braz. J. Microbiol.* 31 (1), 50-52.

BERCHIERI JÚNIOR, A; OLIVEIRA, G. H. (2006). Tifo Aviário. In: *Saúde Aviária e Doenças*. São Paulo:Roca, p. 90-96.

BERCHIERI, JÚNIOR, A.; FREITAS NETO, O. C. 2009. Salmoneloses. In: BERCHIERI JÚNIOR, A., et al.(2009). *Doença das Aves*. Campinas: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (1994). Portaria Nº 193, DE 19 DE SETEMBRO DE 1994. Institui o Programa Nacional de Sanidade Avícola no âmbito da SDA e cria o Comitê Consultivo do Programa de Sanidade Avícola.. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 22 set, Seção 1, p. 14309.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (1995). Portaria Nº 126, DE 03 DE NOVEMBRO DE 1995. Aprovar as “Normas de Credenciamento e Monitoramento de Laboratórios de Diagnóstico das Salmoneloses Aviárias (*S. Enteritidis*, *S. Gallinarum*, *S. Pullorum* e *S. Typhimurium*)”. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 06 nov, Seção 1, p. 17694.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2003a). Instrução Normativa n. 78, de 3 de novembro de 2003. Aprova as Normas Técnicas para Controle e Certificação de Núcleos e Estabelecimentos Avícolas como livres de Salmonella Gallinarum e de Salmonella Pullorum e Livres ou Controlados para Salmonella Enteritidis e para Salmonella Typhimurium. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 05, nov, Seção 1, p.3.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 78, de 3 de novembro de 2003c. Aprova as Normas Técnicas para Controle e Certificação de Núcleos e Estabelecimentos Avícolas como livres de *Salmonella*

Gallinarum e de *Salmonella Pullorum* e Livres ou Controlados para *Salmonella* Enteritidis e para *Salmonella Typhimurium*. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 05, Nov. 2003, **Seção 1 , Página 3**.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa N° 46, de 06 de Outubro de 2011. Aprova o Regulamento Técnico para os Sistemas Orgânicos de Produção Animal e Vegetal. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 07, out. 2011.

CHRISTENSEN, J.P.; SKOV, M.N.; HINZ, K.H.; BISGAARD, M. (1994). *Salmonella enterica* serovar Gallinarum biovar gallinarum in layers: epidemiological investigations of a recent outbreak in Denmark. **Avian Pathology**, 23, 489-501.

GAMA, N. M. S. Q.; BERCHIERI, JR., A. FERNANDES, S.A.(2003). Occurrence of *Salmonella* in Laying Hens. *Braz. J.Poultry Sci.*,5 (1), 15-21.

JAENISCH, F.R.F. (2008). Perfil higiênico sanitário do frango orgânico. *Avicultura Industrial*, 99, 12-14.

LAMPKING, N. (1997). Organic Poultry Production. Welsh Institute of Rural Studies: University of Wales, p.84.

OIE – Organización Mundial de Sanidad Animal. Matanza de animales con fines profiláticos, In: Código Sanitário para los Animales terrestres, 20 ed, cap. 7.6, 2011.

Disponível em:

http://www.oie.int/index.php?id=169&L=2&htmfile=chapitre_1.7.6.htm Acessado em: Outubro de 2011.

PERDONCINI, G.; DA ROCHA, D.T.; MORAES, C.R.; BORSOI, A. SCHMIDT, V. (2011). Presença de *Salmonella* spp. em pintos de um dia, comercializados para produção não industrial em Santa Catarina. *Acta Sci. Vet.* 39 (1), 1-3.

PULIDO, M.; MANTILLA, J. Tifoidea aviar en ponedoras comerciales: diagnóstico y propuesta de control de una enfermedad emergente. In: Memorias

57th Western Poultry Disease Conference, XXXIII. Convención Anual ANECA. Puerto Vallarta, Jalisco, México. 2008.

PULIDO, M.; MANTILLA, J. .Valoración de la situación actual de explotaciones de ponedoras comerciales con cuadros compatibles con Tifoidea Aviar en Colombia.. In: 14th International Symposium for the World Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians – WAVLD Madrid, Spain, 2009.

ROCHA, P. T.; MESQUITA, A. J., ANDRADE. M. A., LOULY, P. R., NASCIMENTO M. N. (2003). Salmonella em foros de caixas de transporte e órgãos em pintos de um dia. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 55 (6), 672 – 676.

SHIVAPRASAD, H.L.; BARROW, P.A. (2008). Pulorum Disease and Fowl Typhoid, In: SAIF, Y.M. GLISSON, J.R.; McDOUGALD, M.R.; NOLAN, L.K.; SWAYNE, D.E. *Disease of Poultry*, 12 ed..

ZANCAN, F. T.; BERCHIERI JÚNIOR, A.; FERNANDES, S. A.; GAMA, N. M. S. Q.(2000). Salmonella sp investigation in transport boxes of day-old birds. *Braz. J. Microbiol.*, 31 (3), 230-232.

11 CONCLUSÕES FINAIS

- Os dados obtidos no acompanhamento de lotes de aves de postura que estão em processo de certificação para produção em sistema orgânico, demonstraram que a introdução de *Salmonella* spp. através de pintos de um dia ocorreu e poderá ser responsável pela contaminação dos lotes.
- A transmissão vertical continua sendo uma importante via de introdução de *Salmonella* paratífica nas granjas de postura.
- O isolamento de *Salmonella* Agona após o alojamento (semana 2, lote B1), não foi isolado novamente no decorrer do ciclo de produção.
- Apesar do isolamento e a quantificação de *Salmonella* Agona em *pool* de ninho (lote A1), não foi possível correlacionar com a presença de *Salmonella* spp. em ovos, devido o não isolamento nesta matriz.
- A macrorestrição do DNA total permitiu verificar o perfil genético das amostras de *Salmonella* Agona isoladas, detectando dois padrões diferentes.
- A associação de tipificação e PFGE proporcionaram uma melhor discriminação de isolados de *S. Agona*, sendo, portanto indicada.
- A presença de *S. Gallinarum* em granjas avícolas é considerado um agravante para a produção e sanidade do lote, provocando notável prejuízo econômico.

REFERÊNCIAS

- ALBERGONI, L.; PELAEZ, V. Da Revolução Verde a agrobiotecnologia: ruptura ou continuidade de paradigmas? **Revista de Economia**, v.33, n.1, p.31-53, 2006.
- ALALI, W.Q.; THAKUR, S.; BERGHAUS, R.D.; MARTIN, M.P.; GEBREYES, W.A. Prevalence and distribution of *Salmonella* in organic and conventional broiler poultry Farms. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.7, n.11, p.1363-1371, 2010.
- ALVES, L.F.A.; BUZARELLO, G.D.; OLIVEIRA, D.G.P; ALVEZ, S.B. Ação da terra de diatomácea contra adultos do cascudinho *Alphitobius Diaperinus* (Panzer, 1797) (Coleoptera: Tenebrionidae). **Arquivo do Instituto Biológico**, v.73, n.1, p.115-118, 2006.
- ANDRADE, M.A. **Inoculação de *Salmonella* Enterica Subspécie Enterica sorovar Enteritidis Fagotipo 4 em Ovos Embrionados de duas Linhagens de Frango de Corte**. 2005. 113f. Tese de Doutorado (Doutorado em Ciência Animal) – Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal de Goiás, Goiás, 2005.
- ANDREATTI FILHO, R.L. Prevenção de doenças: Biossegurança na avicultura. In: ____ **Saúde Aviária e Doenças**, Ed. 1, cap. 1, 2006, p.2-8.
- ANDREATTI FILHO, R.L.; LIMA, E.T.; MENCONI, A.; ROCHA, T.S.; GONÇALVES, G.A.M. Pesquisa de *Salmonella* sp. em suabes de arrasto provenientes de granjas avícolas. **Veterinária e Zootecnia**, v.16, n.1, p. 190-194, 2009.
- AQUINO, A. M. de; ASSIS, R. L. Agroecologia: princípios e técnicas para uma agricultura orgânica sustentável. Brasília: **Embrapa Informação Tecnológica**, 2005. 517 p.
- BACK A. **Manual de doenças das aves**. Cascavel: Coluna do Saber, 2004, 219 p.
- BAILEY, J.S.; COSBY, D.E. *Salmonella* Prevalence in *free-range* and certified organic chickens. **Journal of Food Protection**, v. 68, n. 11, p. 2451–2453, 2005.

BARROW, P.A.; LOVELL, M.A. Experimental infection of egg-laying hens with *Salmonella* Enteritidis phage type 4. **Avian Pathology**, v.20, p. 335–348, 1991.

BAÚ, A.C.; CARVALHAL, J.B.; ALEIXO, J.A.G. Prevalência de *Salmonella* em produtos de frangos e ovos de galinha comercializados em Pelotas, RS, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.31, n. 2, p.303-307, 2001.

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

BEEFPOINT. **Mercado de carne orgânica na Europa**, 2002. Disponível em: <http://www.beefpoint.com.br/cadeia-produtiva/conjuntura-de-mercado/o-mercado-de-carne-organica-na-europa-12-3927n.aspx> agosto de 2011. Acesso em: Agosto de 2011.

BERG, C. Health and welfare in organic poultry production. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.95, p.37-45, 2001.

BERCHIERI JÚNIOR, A. Experimental *Salmonella* Gallinarum infection in light laying hen lines. **Brazilian Journal of Microbiology**, n. 31, p. 50-52, 2000.

BERCHIERI JUNIOR, A.; WIGLEY, P.; PAGE, K.; MURPHY, C.K.; BARROW, P.A. Further studies on vertical transmission and persistence of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis phage type 4 in chickens. **Avian Pathology**, v.30, p. 297– 310, 2001.

BERCHIERI JÚNIOR A.; FREITAS NETO, O.C. Salmoneloses. In: Berchieri Júnior A.; NEPOMUCENO, S.E.; DI FÁBIO, J.; SESTI, L.; ZUANAZE, M.A.F. **Doença das Aves**. Campinas: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas. Cap. 4,1, 2009, p.435-454.

BICHLER, L.A.; NAGARAJA, K.V.; HALVORSON, D.A. *Salmonella* Enteritidis in eggs, cloacal swab specimens, and internal organs of experimentally infected White Leghorn chickens. **American Journal of Veterinary Research**, v. 57, p. 489-495, 1996.

BLODGETT, R. Appendix 2 – Most Probable Number from serial dilutions. In: US Food and Drug Administration (FDA), **Bacteriological Analytical Online**. 2006.

Disponível em:

<http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm109656.htm#authors> acessado em março de 2011.

BONI, H.F.K. **Ocorrência de *Salmonella* spp. na cadeia avícola da região central de Mato Grosso do Sul**. 2007, 42f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Programa de Pós Graduação em Ciência Animal, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, 2007.

BORSOI A. **Ocorrência, contagem e resistência antimicrobiana de *Salmonella* isoladas de carcaças de frangos resfriadas e pesquisa de *Salmonella* em galpões de frangos de corte**. 2005, 81f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2005.

BORSOI, A.; MORAES, H.L.S.; SALLE, C.T.P.; NASCIMENTO, V.P. Número mais provável de *Salmonella* isoladas de carcaças de frango resfriadas. **Ciência Rural**, v.40, n.11, p.2338-2342, 2010.

BOROWSKY, L.M.; SCHMIDT, V.; CARDOSO, M. Estimation of most probable number of salmonella in minced pork samples. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, p.544-546, 2007.

BRACKETT, R.E.; SCHUMAN, J.D. BALL, H.R.; SCOUTEN, A.J. Thermal inactivation kinetics of *Salmonella* spp. Within intact eggs heated using humidity-controlled air. **Journal of Food Protection**, v. 64, p. 934-938, 2001.

BRADEN, C. *Salmonella enterica* Serotype Enteritidis and eggs: A national epidemic in the United States. **Clinical Infectious Diseases**, v.43, p.512-517, 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 126 de 03 de Novembro de 1995. Normas para o Credenciamento e Monitoramento de Laboratórios

de Diagnóstico de Salmonelose Aviárias (*S. Enteritidis*, *S. Gallinarum*, *S. Pullorum* e *S. Typhimurium*). **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 06 nov, 1995, seção 1 , **Página 17694**.

BRASIL. Casa civil. Lei nº. 10.831 de 23 de dezembro de 2003. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 24, dez. 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa 62 de 26 de agosto de 2003. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 19 set. 2003a, Seção 1 , Página 14

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 78, de 3 de novembro de 2003b. Aprova as Normas Técnicas para Controle e Certificação de Núcleos e Estabelecimentos Avícolas como livres de *Salmonella Gallinarum* e de *Salmonella Pullorum* e Livres ou Controlados para *Salmonella Enteritidis* e para *Salmonella Typhimurium*. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 05, Nov. 2003, **Seção 1 , Página 3**.

BRASIL. **Cadeia produtiva de produtos orgânicos**. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, v.5, 2007, 108p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 64, de 18 de Dezembro de 2008. Aprova o Regulamento Técnico para os Sistemas Orgânicos de Produção Animal e Vegetal. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 19, fev. 2008, **Seção 1 , Página 21**.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Programa Nacional De Monitoramento Da Prevalência e da Resistência Bacteriana Em Frango. Relatório do Monitoramento da prevalência e do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos em enterococos e salmonelas isolados de carcaças de frango congeladas comercializadas no Brasil. 1ed, 2008, 186p.

BRASIL. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. **Censo Agropecuário 2006**. Rio de Janeiro, 2009a. Disponível em:

http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/agropecuaria/censoagro/brasil_2006/Brasil_censoagro2006.pdf Acessado em: Ago. 2011

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa N° 46, de 06 de Outubro de 2011. Aprova o Regulamento Técnico para os Sistemas Orgânicos de Produção Animal e Vegetal. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 07, out. 2011.

BYRD, J.A., CORRIER, D.E., DeLOACH, J.R., NISBET, D.J. Comparison of drag-swab environmental protocols for the isolation of *Salmonella* in poultry houses. **Avian Diseases**, v. 41, n. 3, p. 709-713, 1997.

CALLEGARI-JACQUES, S.M. **Bioestatística, princípios e aplicações**. Porto Alegre: Artmed, cap. 18, p. 176-177, 2003.

CARRIQUE-MAS, J.J.; DAVIES, R.H. Salmonella Enteritidis in commercial layer flocks in Europe: legislative background, on-farm sampling and main challenges. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v.10, n.1, p.1-9, 2008.

CASTELLINI, C.; BERRI, C.; BIHAN-DUVAL, E. *et al.* Qualitative attributes and consumer perception of organic and free-range poultry meat. **World's Poultry Science Journal**, v. 64, p. 500-512, 2008.

CDC-Center for Disease Control and Prevention. Investigation of outbreak of infections caused by *Salmonella* Agona. **CDC**, 2008. Disponível em:

<http://www.cdc.gov/salmonella/agona/> Acessado em: julho de 2011.

CDC-Center for Disease Control and Prevention. One-Day (24-28 h) Standardized Laboratory Protocol for Molecular Subtyping of Escherichia coli O157:H7, Salmonella serotypes, Shigella sonnei, and Shigella flexneri by Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE). **CDC**, 2009. Disponível em:

http://www.pulsenetinternational.org/SiteCollectionDocuments/pfge/5%201_5%202_5%204_PNetStand_Ecoli_with_Sflexneri.pdf Acesso em: Agosto de 2011.

CDC-Center for Disease Control and Prevention. Preliminary FoodNet Data on the Incidence of Infection with Pathogens Transmitted Commonly Through Food — 10 States, 2009. **MMWR - Morbidity and Mortality Weekly Report** , v.59, n.14, 2010a. Disponível em: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5914a2.htm> Acessado em: Julho de 2011.

CDC-Center for Disease Control and Prevention. Investigation Update: Multistate Outbreak of Human *Salmonella* Enteritidis Infections Associated with Shell Eggs. **CDC**, 2010b. Disponível em: <http://www.cdc.gov/salmonella/enteritidis/> . Acessado em Agosto de 2011.

CHAO, M.R.; HSIEN. C.H.; YEH, C.M. *et al.* Assessing the prevalence of *Salmonella enterica* in poultry hatcheries. **Poultry Science**, v.86, p.1651–1655, 2007.

CHERNAKI-LEFFER, AM *et al.* . Isolamento de enterobactérias em *Alphitobius diaperinus* e na cama de aviários no oeste do estado do Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 4, n. 3, p.243-248, 2002.

COSTALUNGA, S.; TONDO, E. Salmonellosis in Rio Grande do Sul, 1997 to 1999. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, p.342-346, 2002.

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

CHRISTENSEN, J.P.; SKOV, M.N.; HINZ, K.H.; BISGAARD, M. (1994). *Salmonella enterica* serovar Gallinarum biovar gallinarum in layers: epidemiological investigations of a recent outbreak in Denmark. **Avian Pathology**, 23, 489-501.

DAVIES, R.H.; WRAY, C. Persistence of *Salmonella* Enteritidis in poultry units and poultry food. **British Poultry Science**, v.37, p.589-96, 1996.

DAVIES, R. H.; BRESLIN, M. Persistence of *Salmonella* Enteritidis phage type 4 in the environment and arthropod vectors on an empty free-range chicken farm.

Environmental Microbiology, Washington, v. 5, p. 79-84, 2003.

DICKINS, M.A.; FRANKLIN, S.; STEFANOVA, R. *et al.* Diversity of *Campylobacter* isolates from retail poultry carcasses and from humans demonstrated by pulse-field gel electrophoresis. **Journal of food Protection**, v.65, n.6, p.957-962, 2002.

DICKEL, E.L.; RODRIGUES, L.B.; SANTOS, L.R.; VALLE, S.F.; PILOTTO, F.; RODEMBUSH, C.; WALD, V.B.; CANAL, C.W.; NASCIMENTO, V.P. Análise comparativa entre microbiologia convencional, ELISA e PCR para detecção de *Salmonella* Enteritidis, *S. Typhimurium*, *S. Gallinarum* e *S. Pullorum* em carne de frango contaminada artificialmente. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 12, n. 1/3, p. 5-10, 2005.

DE REU, K.; GRIJSPEERDT, K.; MESSENS, W.; HEYNDRICKW, M.; UYTTENDAELE, M.; DEBEVERE, J.; HERMAN, L. Eggshell factors influencing eggshell penetration and whole egg contamination by different bacteria, including *Salmonella* Enteritidis. **International Journal of Food Microbiology**, v. 112, p.253–260, 2006.

DUFRENNE, J.. RITMEESTER, W.; VAN ASCH, E.D.; VAN-LEUSDEN, F.;JONG, R..Quantification of the contamination of chicken and chicken products in The Netherlands with *Salmonella* and *Campylobacter*. **Journal of Food Protection**, v.64, n.4, p.538-541, 2001.

EBEL, E.; SCHLOSSER, W. D. Estimating the annual fraction of eggs contaminated with *Salmonella* Enteritidis in the United States. **International Journal of Food Microbiology**, v. 61, n. 1, p. 51-62, 2000.

EFSA-European Food Safety Authority. Report of the task force on zoonoses data collection on the analysis of the baseline study on the prevalence of *Salmonella* in holdings of laying hen flocks of *Gallus gallus*. **The EFSA Journal**, p. 84, 2007.

EFSA-European Food Safety Authority. Update of the criteria used in the assessment of bacterial resistance to antibiotics of human or veterinary importance. **The EFSA Journal**, v.732, p.1-15, 2008.

EFSA - European Food Safety Authority. Trends and sources of zoonoses and zoonotic agents in the European Union in 2007. **The EFSA Journal**, 2009, 310p.

EUROPEAN COMMUNITY (EC) 1991. REGULAMENTO (CEE) n° 2092/91 DO CONSELHO de 24 de Junho de 1991 relativo ao modo de produção biológico de produtos agrícolas e à sua indicação nos produtos agrícolas e nos gêneros alimentícios. Disponível em: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:1991:198:0001:0015:PT:PDF>
Acessado em: agosto de 2011.

EUROPEAN COMMUNITY (EC) 2007. Council Regulation (EC) n° 834/2007 of 28 June 2007 on organic production and labelling of organic products and repealing Regulation (EEC) N° 2092/91. Disponível em: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2007:189:0001:0023:PT:PDF>
Acessado em: Agosto de 2011.

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

FERNANDES, S.A.; GHILARDI, A.C.; TAVECHIO, A.T.; MACHADO, A.M.O.; PIGNATARI, C.C. Phenotypic and molecular characterization of *Salmonella* Enteritidis strains isolated in São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 45, p.59-63, 2003.

FSIS-Food Safety and Inspection Service. Risk Assessments of *Salmonella* Enteritidis in shell eggs and *Salmonella* spp. in egg products, 2005. Disponível em: http://www.fsis.usda.gov/PDF/SE_Risk_Assess_Oct2005.pdf Acessado: Agosto de 2011.

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nation. Organic agriculture: what is this? 2003. Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/010/y4587e/y4587e01.pdf> Acessado em Junho de 2011.

FLORES, M.L.; NASCIMENTO, V.P.; KADER, I.I.T.A.; SANTOS, L.R.; PONTES, A.P.; SALLE, C.T.P.; LOPES, R.F.F. Métodos de extração de DNA para a detecção e *Salmonella* em ovos de galinhas, com e sem casca, através da reação em cadeia pela polimerase. **Ciência Rural**, v.31, n.2, p.315-318, 2001.

FONSECA, E. L. **Caracterização dos perfis de resistência a antimicrobianos e diversidade genômica em cepas de *Salmonella* Infantis isoladas no Brasil de 1994 a 2001**. 2003. 82f. Dissertação (Mestrado em Bacteriologia) Instituto Oswaldo Cruz Rio de Janeiro, 2003.

FONSECA, E.L., MYKYTCZUK, O.L., ASENSI, M.D., REIS, E.M.F., FERRAZ, L.R., PAULA, F.L., NG, L.K.; RODRIGUES, D.P. Clonality and antimicrobial resistance gene profiles of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar Infantis from four public hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Clinical Microbiology** . v. 44, p. 2767-2772, 2006.

FREITAS, J. Evolução epidemiológica de sorovares prevalentes na cadeia produtiva de aves e modelo de banco de cepas brasileiro. In: INTERNATIONAL SEMINAR OF AVIAN SALMONELLOSIS, 2011, Rio de Janeiro. **ANAIS**. Rio de Janeiro: União Brasileira de Avicultura, Associação Latino-americana de Avicultura, 2011, 18p.

GAMA, N.M.S.Q. ***Salmonella* spp em postura comercial**. 2001. 68f. Dissertação (Mestrado Patologia Animal) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias Campus de Jaboticabal – UNESP, 2001.

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

GAMBIRAGI, A.P.O.M.; SALLES, R.P.R.; AGUIAR FILHO, J.R.; OLIVEIRA, W.F.; MACIEL, W.C.; ROMÃO, J.M.; TEIXEIRA, R.S.C. *Salmonella* sp. em frangos de corte de um dia de idade na região metropolitana de Fortaleza-CE. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 31, p. 149 -153, 2003.

GANTOIS, I.; DUCATELLE, R.; PASMANS, F. *et al.* Mechanisms of egg contamination by *Salmonella* Enteritidis. **FEMS Microbiology Review**, v.33, p.718-738, 2009.

GAST, R.K.; BEARD, C.W. Production of *Salmonella* Enteritidis-contaminated eggs by experimentally infected hens. **Avian Disease**, v. 34, p. 438–446, 1990.

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

GAST, R.K.; HOLT, P.S. Deposition of phage type 4 and 13a *Salmonella* Enteritidis strains in the yolk and albumen of eggs laid by experimentally infected hens. **Avian Diseases**, v.44, p.706-710, 2000.

GAST, R.K; HOLT, P.S. Assessing the frequency and consequences of *Salmonella* Enteritidis deposition on the egg yolk membrane. **Poultry Science**, v.80, p.997-1002, 2001.

GAST, R.K.; GUARD-BOULDIN, J.; HOLT, P.S. The relationship between the duration of fecal shedding and the production of contaminated eggs by laying hens infected with strains of *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Heidelberg. **Avian Diseases**, v.49, p.382-386, 2005.

GAST, R.K. Paratyphoid Infection, In: SAIF, Y.M. *et al.* **Diseases of Poultry**, ed 12, 2008, p.636-665.

GUARD, J. Mejorando la seguridad alimentaria mediante el entendimiento de la evolución de la contaminación del huevo con *Salmonella* Enteritidis. In: Seminario Avícola Internacional, XXX. 2011, Bogotá-Colômbia. **Anais**. Bogotá: Asociación Colombiana de Médicos Veterinarios y Zootecnistas Especialistas en Avicultura. 2011, 10p.

GUARD-PETTER, J. The chicken, the egg and *Salmonella* Enteritidis. **Environmental Microbiology**, v.3, p.421–430, 2001.

GUIBOURDENCHE, M.; MIKOLEIT, P.R.M.; FIELDS, P.; BOCKEMU, J.; GRIMONT, P.A.D.; WEILL, F.X. Supplement 2003e2007 (No. 47) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. **Research in Microbiology**, n. 161, p. 26-29, 2010.

HARBAUGH, E.; TRAMPEL, D.; WESLEY, I.; HOFF, S.; GRIFFITH, R.; HURD, H. S. Rapid aerosol transmission of *Salmonella* among turkeys in a simulated holding-shed environment. **Poultry Science**, v. 85, n. 10, p. 1693-1699, 2006.

HEUER, O.E.; PEDERSEN, K. ANDERSEN, J.S.; MADSEN, M. Prevalence and antimicrobial susceptibility of thermophilic *Campylobacter* in organic and conventional broiler flocks. **Letters in Applied Microbiology**, v.33, p. 269–274, 2001.

HOFER, E.; SILVA FILHO, S.J.; REIS, E.M.F. Prevalência de sorovares de *Salmonella* isolados de aves no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 17, n. 2, 1997.

HOFER, E.; SILVA FILHO, S.J.; REIS, E.M.F. Sorovares de *Salmonella* isolados de matérias-primas e de ração para aves no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 18, n. 1, p. 21-27, 1998.

HUMPHREY, T.J.; BASKERVILLE, A.; MAWER, S.; ROWE, B.; HOPPER, S. *Salmonella* enteritidis phage type 4 from the contents of intact eggs: A study involving naturally infected hens. **Epidemiology of Infection**, v. 103, p.415–423, 1989.

IFOAM- International Federation of Organic Agriculture Movements. The world of organic agriculture-Statistics and emerging trends 2006. **International Federation of Organic Agriculture Movements**, 2006, 21 p.

JAENISCH, F.R.F. KUCHIISHI, S.S. Atividade antibacteriana de desinfetantes para uso na produção orgânica de aves. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v.2, n.2, p.945-448, 2007.

JAENISCH, F.R.F. Perfil higiênico sanitário do frango orgânico. **Avicultura Industrial**, v.99, n.1163, p.12-14, 2008.

KINGSTON, D.J. A comparison of culturing drag *swab* and litter for identification of infections with *Salmonella* spp. in commercial chicken flocks. **Avian Disease**, v. 25, n. 2, p.513-516, 1981.

LAMPKING, N. **Organic Poultry Production**. Welsh Institute of Rural Studies: University of Wales, p.84, 1997.

LOPES, L.F.L. **Salmonella sp em répteis e aves silvestres no Estado de São Paulo: frequência de isolamento, caracterização dos isolados e as consequências para o manejo em cativeiro e reintrodução**. 2008, 124f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental e comparada) Programa de Pós Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

MARQUEZI, M.C. **Comparação de metodologias para a estimativa do número mais provável (NMP) de coliformes em amostras de água**. 2010. 113f. Dissertação (Mestrado Ciência e Tecnologia de Alimentos) Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2010.

MASLOW, J.; MULLIGAN, M.E. Epidemiologic typing system. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v.17, n.9, p.595-604, 1996.

MEDEIROS, M.A.N. Prevalência de *Salmonella* spp. e resistência antimicrobiana dos isolados em carcaças de frango congelado no varejo. In: INTERNATIONAL

SEMINAR OF AVIAN SALMONELLOSIS, 2011, Rio de Janeiro. **ANAIS**. Rio de Janeiro: União Brasileira de Avicultura, Associação Latino-americana de Avicultura, p.5.

MEERBURG, B.G.; BORGSTEEDE, F.H.M. Organic agriculture and its contribution to zoonotic pathogens. IN: KRAUSE, D.; HENDRICK, S. **Zoonotic Pathogens in the Food Chain**, cap. 8, 2011, p.166-181.

MIYAMOTO, T.; BABA, E.; TANAKA, T.; SASAI, K.; FUKATA, T.; ARAKATA, T. *Salmonella* Enteritidis contamination of eggs from hens inoculated by vaginal, cloacal and intravenous routes. **Avian Disease**, v. 41, p. 296–303, 1997.

MORRIS, G.K. *Salmonella* Enteritidis and eggs: assessment of risk. **Dairy, Food and Environmental Sanitation**, v.10, p.279-281, 1990.

MULVEY, M.R.; BOYD, D.A.; BAKER, L.; MYKYTCZUK, O.; REIS, E.M.; AENSI, M.D.; RODRIGUES, D.P.; NG, L.K. Characterization of a *Salmonella enterica* serovar Agona strain harbouring a class 1 integron containing novel OXA-type β -lactamase (blaOXA-53) and 6'-N-aminoglycoside acetyltransferase genes [aac(6')-I30]. **Journal of Antimicrobial Chemother**, v.54, p.354–359, 2004.

MÜRMAN, L.; SANTOS, M.C.; LONGARAY, S.M.; BOTH, J.M.C.; CARDOSO, M. Quantification and molecular characterization of salmonella isolated from food samples involved in salmonellosis outbreaks in Rio Grande do Sul, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.39, p.529-534, 2008.

NADVORNY, A.; FIGUEIREDO, D.M.S.; SCHIMIDT, V. Ocorrência de *Salmonella* sp. em surtos de alimentos no Rio Grande do Sul. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.32, n. 1, p.47-51, 2004.

NOVELLO, D.; FRANCESCHINI, P.; APARECIDA, Q.D.; OST, P.R. Ovo: conceitos, análises e controvérsias na saúde humana. **Archivos latinoamericanos de nutrición**, V. 56, n.4, p.315-320, 2006.

O'FLANAGAN, D.; CORMICAN, M.; McKEOWN, P.; NICOLAY, N.; COWDEN, J.; MASON, B.; MORGAN, D.; LANE, C.; IRVINE, N.; BROWNING, L. A multi-country outbreak of *Salmonella* Agona, february-August 2008. **Eurosurveillance**, v. 13, p.7-9, 2008.

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 serovars. **Avian Diseases**, v.45, p.962-971, 2001.

OLSEN, J.E.; BROWN, D.J.; SKOV, M.N. CHRISTENSEN, J.P. Bacterial typing methods suitable for epidemiological analysis. Applications in investigations of salmonellosis among livestock. **The veterinary Quarterly**, v. 15, p.125-135, 1993.

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

OLIVE D.M.; BEAN, P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n.6, p. 1661–1669, 1999.

ORMOND, J.G.P.; PAULA, S.R.L.; FAVERET, F.P.; ROCHA, L.T.M. Agricultura Orgânica: quando o passado é futuro. **BNDES Setorial**, Rio de Janeiro, 2002.

PERDONCINI, G.; TEJKOWSKI, T.M.; LANDINIZ, M.P.; GUAYBA BISNETO, J.P.; NASCIMENTO, V.P. Análise microbiológica para *Salmonella* sp em ovos durante os anos 2002 a 2008. In: AVISULAT – II congresso Sul Brasileiro de Avicultura, Suinocultura e Laticínios, 2010, Bento Gonçalves, RS. **ANAIS** . Disponível em: Associação Gaucha de Avicultura, SINDILAT, SIPS, 2010, 1p.

PIGNATARI, A.C.C. Epidemiology of *Salmonella* human infections and the relevance of integrated data in the food products chain. In: INTERNATIONAL SEMINAR OF

AVIAN SALMONELLOSIS, 2011, Rio de Janeiro. **ANAIS**. Rio de Janeiro: União Brasileira de Avicultura, Associação Latino-americana de Avicultura, 2011, 5p.

PINTO, A.T. ; SILVA, E.N. Ensaio de penetração de *Salmonella* Enteritidis em ovos de galinha com diferentes qualidades de casca, submetidos ou não a lavagem industrial e a duas temperaturas de armazenagem. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, p. 1196-1202, 2009.

POPOFF, M.Y. Supplement 2000 (no. 44) to the Kauffmann-White scheme. **Rev. Microbiol.**, v.152, p. 907-909, 2001.

POPPE, C. *Salmonella* Infections in the Domestic Fowl. In: WRAY, C.; WRAY, A. **Salmonella in domestic animals**. New York: CABI Publishing, 2000. cap. 7, p. 107-132.

PORTAL BRASIL. Consumo de orgânicos leva mercado interno a crescer 40% em 2010. 2011. Disponível em:
<http://www.brasil.gov.br/noticias/arquivos/2011/02/03/consumo-de-organicos-leva-mercado-interno-a-crescer-40-em-2010> Acessado em: Agosto de 2011.

PUZZI, M.B.; XAVIER, A.; LIFTFALLA, F.; POLIZER, K.A.; ZAPPA, V. Encefalopatia espongiforme bovina. **Revista científica eletrônica de medicina veterinária**, ano 7, n. 10, p. 1-7. 2008.

QUINN. P.J., MAREY B. K.; CARTER M. E.; DONNELLY W. J.; LEONARD F. C. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. Porto Alegre: Artmed, 2005, 512 p.

ROCHA, P.T.; MESQUITA, A.J.; ANDRADE, M.A.; LOULY, P.R. NASCIMENTO. M.N. *Salmonella* spp. em forros de caixa de transporte e órgãos de pintos de um dia. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.55, n.6, p.672-676, 2003.

RODENBURG, T.B.; ARKEL, V.D.H.V.; KWAKKEL, R.P. *Campylobacter* and *Salmonella* infections on organic broiler farms. **NJAS**, v. 52, n.2, p.101-108, 2004.

RODRIGUES, L.B. NASCIMENTO, V.P.N. Levantamento sorológico e detecção de *Salmonella* sp. em granjas de postura comercial de pequeno porte em um município do estado do Rio Grande do Sul. **Acta Scientiae Veterinarie**, v. 31, p.71-72, 2003.

SALLE, C.T.P.; MORAES, H.L.S. Prevenção de doenças/Manejo profilático/Monitoria. In: BERCHIERI JÚNIO, A.; SILVA, E.N.; DI FÁBIO, J.; SESTI, L.; ZUANAZE, M.A.F. **Doença das Aves**. Campinas: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas. Cap. 4,1, 2009, p.435-454

SALLES, R.P.R.; TEIXEIRA, R.S.C.; SIQUEIRA, A.A.S.; DA SILVA, E.E.; CASTRO, S.B.; CARSOSE, W.N. Monitoramento Bacteriológico para *Salmonella* spp. em poedeiras comerciais na recria e produção de empresas avícolas da região de Fortaleza, CE, Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, v.9, n.2, p.427-432, 2008.

SCHNEPF, M.; BARBEAU, W.E. Survival of *Salmonella* Typhimurium in roasting chickens cooked in a microwave, convection microwave and convection electric oven. **Journal of Food Protection**, v. 9, p. 245-252, 1989.

SCIALABBA, N. E. Global trends in organic agriculture markets and countries demand for FAO assistance. Rome: **Food and Agriculture Organization**, 2005. Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/paia/organicag/2005_12_doc04.pdf>. Acesso em: Agosto de 2011.

SCHNEPF, M.; BAREAU W.E. survival *Salmonella* Typhimurium in roasting chickens in a microwave, conventional microwave and a conventional electric ove. **Journal of Food Safety**, v.9, p.245-252, 1989.

SESTI, L.A.C. Biosseguridade em granjas de reprodutoras. In: MACARI, M.; MENDES, A.A. **Manejo de matrizes de corte**, ed. 2005, cap. 11, 421p.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A; SILVEIRA, N.F.A.; TANIWAKI, M.H.; SANTOS, R.F.S.; GOMES, R.A.R. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água**. Ed.4, 2010, 625p.

SHIVAPRASAD, H.L.; BARROW, P.A. Pulorum Disease and Fowl Typhoid, In: SAIF, Y.M. GLISSON, J.R.; McDOUGALD, M.R.; NOLAN, L.K.; SWAYNE, D.E. **Diseases of Poultry**, 12 ed, p. 620-636, 2008.

SONCINI, R.A.; MORAES, M.A.Z.; COSTA, J.L.A. Transmissão de *Salmonella* Enteritidis em pintos de um dia. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 2, 2000.

SPISSO, B.F.; NOBREGA, A.W.; MARQUES, M.A.S. Resíduos e contaminantes químicos em alimentos de origem animal no Brasil: histórico, legislação, e atuação da vigilância sanitária e demais sistemas regulatórios. **Ciencia & Saúde Coletiva**, v.14, n. 6, p.2091-2106, 2009.

SUÁREZ, E.J.D. Application of HACCP & traceability in the eggs production chain. . In: INTERNATIONAL SEMINAR OF AVIAN SALMONELLOSIS, 2011, Rio de Janeiro. **ANAIS**. Rio de Janeiro: União Brasileira de Avicultura, Associação Latino-americana de Avicultura, 2011, 24p.

TATE, W.B. The development of the organic industry and market. In: LAMPKIN, N.H.; PADEL, S. **The economics of organic farming: an international perspective**. Wallingford, CAB International, p.11-25, 1994.

TEIXEIRA, L.C.; LIMA, A.M.C. Occurrence of *Salmonella* and *Listeria* in chicken carcasses from two breeding systems in Campinas, SP. **Archives of Veterinary Science**, v.13, n.3, p.191-196, 2008.

THRUSFIELD, M.. **Epidemiologia Veterinária**. São Paulo: ROCA, 556p.

UBA - União Brasileira de Avicultura, 2008. **Protocolo de Boas Práticas de Produção de ovos**. Disponível em:
http://www.avisite.com.br/legislacao/anexos/protocolo_de_boas_praticas_de_producao_de_frangos.pdf Acessado em maio de 2011.

UBABEF-União Brasileira de Avicultura. **Relatório Anual 2010/2011**. 2011.
Disponível em:

<http://www.abef.com.br/ubabef/down.php?arq=UmFudWFsMjAxMS5wZGY=>

Acessado em: Agosto de 2011.

VAN IMMERSEEL, F.; DEWULF, J.; RASPOET, R. Pathogenesis of egg contamination and risk factors for *Salmonella* transmission in laying hens. In: INTERNATIONAL SEMINAR OF AVIAN SALMONELLOSIS, 2011, Rio de Janeiro. **ANAIS**. Rio de Janeiro: União Brasileira de Avicultura, Associação Latino-americana de Avicultura, 2011, 17p.

WATTIAU, P.; HESSCHE, M.V.; SCHLICKER, C.; VEKEN, V.H.V.; IMBERECHTS, H. Comparison of classical serotyping and premitest assay for routine identification of common *Salmonella* enterica serovars. *Journal of Clinical Microbiology*, v.46, n.12, 4037–4040, 2008.

WHO – World Organization for Animal Health. **Salmonellosis**.2010. Disponível em: <http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.09.09_SALMONELLOSIS.pdf>. Acessado em: Julho de 2011.

XAVIER, S.F.; DOLORES, D.G. Desenvolvimento rural sustentável: uma perspectiva agroecológica. **Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável**, v.2, n.2, p. 17-26, 2001.

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

ANEXO

Anexo 1: Frequência de coletas de cada lote

Lote	Aloj.	Sem. 2	Sem. 11	Sem. 21	Sem. 31	Sem. 41	Sem. 51	Sem. 61
A1						C: 2 AE: 1 N: 3 O: 2	C: 2 AE: 1 N: 3 O: 2	C: 2 AE: 1 N: 3 O: 2
A2		Necropsia						
A3		C:2 AE:0	C:2 AE:0	C:2 AE:1	C: 2 AE: 1 N: 3 O: 2	C: 2 AE: 1 N: 3 O: 2		
B1	SC: 66 pintos de um dia	C:2 AE:0	C:2 AE:1	C:2 AE:0	C: 2 AE: 1 N: 3 O: 2	C: 2 AE: 1 N: 3 O: 2	C: 2 AE: 1 N: 3 O: 2	
C1					C: 2 AE: 0 N: 3 O: 2	C: 2 AE: 1 N: 3 O: 2	C: 2 AE: 1 N: 3 O: 2	C: 2 AE: 1 N: 3 O: 2
D1	SC: 99 pintos de um dia	C:2 AE:0	C:2 AE:1	C:2 AE:1	C: 2 AE: 1 N: 3 O: 2			
E1	SC: 36 pintos de um dia	C:2 AE:0	C:2 AE:1	C:2 AE:1	C: 2 AE: 1 N: 3 O: 2	C: 2 AE: 1 N: 3 O: 2		

SC: *Swab* de cloaca; C: Cama; AE: Área de Acesso Externo; N: Ninho; O: Casca e Conteúdo Interno dos Ovos.