

Universidade Estadual do Ceará
Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa
Faculdade de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias

**ISOLAMENTO E TIPIFICAÇÃO DE *SALMONELLA* DA CADEIA
PRODUTIVA DE FRANGO DE CORTE DA REGIÃO
METROPOLITANA DE FORTALEZA-CE**

Fortaleza, Ceará
2004

Universidade Estadual do Ceará
Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa
Faculdade de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias
Walber Feijó de Oliveira

**ISOLAMENTO E TIPIFICAÇÃO DE *SALMONELLA* DA CADEIA
PRODUTIVA DE FRANGO DE CORTE DA REGIÃO
METROPOLITANA DE FORTALEZA-CE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias.

Área de Concentração: Medicina Veterinária Preventiva

Orientador: Prof. Dr. William Cardoso Maciel

Fortaleza, Ceará

2004

048i

Oliveira, Walber Feijó de

Isolamento e tipificação de *Salmonella* da cadeia produtiva de frango de corte da Região Metropolitana de Fortaleza-CE / Walber Feijó de Oliveira - 2004.

101p.; il.;

Orientador : Prof. Dr. William Cardoso Maciel.

Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias)- Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária.

1. *Salmonella* 2. Isolamento 3. Frango de corte 4.
Avicultura.

I. Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária

CDD: 636.50918131

Universidade Estadual do Ceará
Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa
Faculdade de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias

Título do Trabalho : Isolamento e tipificação de *SALMONELLA* da cadeia produtiva de frango de corte da Região Metropolitana de Fortaleza-CE

Autor : Walber Feijó de Oliveira

Defesa em: 26/11/2004

Conceito obtido: **Satisfatório**

Banca Examinadora

Prof. Dr. William Cardoso Maciel
Orientador

Salette Lobão Torres Santiago, Profa. Dra.

José Sérgio de Resende, Prof. Dr.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Francisco Tavares de Oliveira Filho e Lucimar Feijó de Oliveira, pelo amor incondicional a mim dedicado;

À minha noiva Rosana Mendonça pelo carinho e incentivo nas horas difíceis e por acreditar sempre na conquista de nossos sonhos;

Aos meus irmãos Vera Lúcia Feijó, Verônica Feijó, Wagner Feijó pelo apoio e alegria de sua existência;

Aos meus sobrinhos Igor de Oliveira, Ingrid de Oliveira, Yuri de Oliveira, Wagner Feijó Filho e afilhado Guilherme Feijó por me proporcionarem felicidade sempre.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor e Orientador Dr. William Cardoso Maciel pelo exemplo de uma orientação dedicada e pelos ensinamentos ao longo do curso;

Ao Dr. Luis Carlos Lemos Marques e Dr^a Ana Paula Francisca A. R. M. Marques que me passaram, pacientemente, os ensinamentos necessários para a pesquisa microbiológica e para a vida, acolhendo-me carinhosamente como amigo;

À Dr^a Rosa Patrícia Ramos Salles, pelos ensinamentos e ajuda para a realização desta pesquisa e amizade demonstrada durante o decorrer do curso;

À Profa. Dra. Salette Lobão Torres Santiago pela sua orientação e sugestões;

Ao Instituto Adolfo Lutz e, particularmente, à Dra. Sueli A. Fernandes pela imensa contribuição para a realização do experimento;

À toda equipe do Laboratório de Estudos Ornitológicos, em especial José Luis Castro Aguiar Filho, Josué Moura Romão, Paulo Marques Costa, Régis Siqueira Teixeira, Márcia Helena Niza Sobral, que estiveram sempre postos a ajudar;

Aos Médicos Veterinários e funcionários da Unidade Laboratorial Animal, conveniada ao Ministério da Agricultura – CE, que muito me ajudaram no desenvolvimento desta pesquisa;

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Estadual do Ceará, pela competência na transmissão dos conhecimentos;

À Fundação Cearense de Apoio e Pesquisa – FUNCAP, por proporcionar – me apoio científico e financeiro, tornando possível minha condição de pesquisador.

RESUMO

Com o objetivo de verificar a ocorrência de *Salmonella*, identificar os sorotipos presentes nas amostras, investigar o comportamento das cepas isoladas frente à ação de antimicrobianos e pesquisar outras enterobactérias presentes em produtos avícolas, foram analisadas microbiologicamente 114 amostras. Entre essas, 63 amostras fecais colhidas em três fases de criação de frango de corte (01, 20 e 45 dias) de 21 lotes pertencentes a granjas localizadas na Região Metropolitana de Fortaleza – CE. Do restante, 14 amostras de carcaças de frango recém - abatidas foram colhidas de abatedouros isentos de fiscalização federal, 18 foram de carcaças resfriadas e 19 amostras de carcaças congeladas, totalizando 51 carcaças, prontas para o consumo, analisadas microbiologicamente. As amostras dos lotes nas três fases de produção não apresentaram contaminação por *Salmonella*, no entanto, amostras de carcaças recém - abatidas apresentaram percentual de contaminação de 14,3 %, carcaças resfriadas 16,7 % e congeladas 5,26 %. Identificaram-se três diferentes sorotipos, sendo estes: *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis (50 %), *Salmonella enterica* sorovar Panama (33 %) e *Salmonella enterica* sorovar Newport (17 %). Os resultados apresentados ao teste de sensibilidade aos antimicrobianos mostraram-se preocupantes para a ampicilina e tetraciclina, pois o percentual de resistência das cepas em ambos foi de 100 %. O contrário ocorreu com os antimicrobianos gentamicina, netilmicina, cloranfenicol e carbenicilina, pois, entre as cepas isoladas, nenhuma apresentou resistência a esses antimicrobianos. As enterobactérias que apresentaram maior frequência de isolamentos foram as do gênero *Proteus* sp., *Escherichia coli* e *Enterobacter* sp. Far-se-á necessária a continuidade do controle sanitário presente em lotes de frangos de corte da Região Metropolitana de Fortaleza e a adoção de rigorosas medidas higiênico-sanitárias em abatedouros e comércio, para reduzir o percentual de carcaças de frangos de corte contaminadas por *Salmonella* e, conseqüentemente, reduzir os riscos que essas apresentam para a saúde pública.

ABSTRACT

This research has the objective of verifying the occurrence of *Salmonella* spp., the identification and performance of antimicrobial sensibility test with the isolated strains and the investigation of the presence of other enterobacteriaceae bacteria from poultry products. There were 114 samples for *Salmonella* analysis divided in 51 feces samples collected from 21 broiler flocks with three different ages (01, 20 and 45 days) from poultry companies in the Metropolitan Region of Fortaleza-CE and 63 carcasses samples, with 14 fresh carcasses from two slaughter-houses without federal ficalization, 18 refrigerated carcasses and 19 frozen carcasses, all ready for human consume and analized microbiologically. The feces samples from three different productions ages presented no *Salmonella* contamination, however the fresh carcasses presented 14.3 % of contamination, the refrigerated carcasses 16.7 % and the frozen carcasses 5.26 %. There were three serotype identification: *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis 50 %; *Salmonella enterica* sorovar Panama 33 % and *Salmonella enterica* sorovar Newport, 17 %. The results of susceptibility tests to antimicrobial agents are worrying because the *Salmonella* strains presented 100 % of resistance against ampicillin and tetracycline but none against gentamicin, netilmicin, carbenicillin, chloramphenicol. Regarding the other enterobacteriaceae bacteria, the most prevalent were the genus *Proteus* sp., *Escherichia coli* and *Enterobacter* sp. This way it is necessary the continuity of the sanitary control to broiler flocks in the Metropolitan region of Fortaleza and the adoption of rigorous hygienic and sanitary procedures in slaughter-houses and market places to reduce the rates of *Salmonella* contamination and consequently to reduce the risks to public health.

SUMÁRIO

Lista de Abreviatura e/ou Símbolos.....	11
Lista de Fotos, Quadros e Tabelas.....	12
1. Introdução.....	13
2. Revisão de Literatura.....	16
2.1 Histórico.....	17
2.2 Etiologia.....	18
2.3 Epidemiologia.....	20
2.3.1 Registros de ocorrência de <i>Salmonella</i>	23
2.4 Patogenia.....	28
2.5 Patologia.....	29
2.6 Sintomatologia.....	31
2.7 Medidas de controle e profilaxia.....	33
2.7.1 Método diagnóstico.....	34
2.7.2 Higienização e controle do ambiente.....	35
2.7.3 Antimicrobianos.....	36
2.7.4 Imunidade e Vacinação.....	37
2.7.5 Exclusão competitiva.....	38
3. Justificativa.....	40
4. Hipótese científica.....	40
5. Objetivos.....	40
5.1 Objetivo geral.....	40
5.2 Objetivos específicos.....	41
6. Material e Métodos.....	41
6.1 Local de execução.....	41
6.2 Amostras da fase de produção de frango de corte.....	42

6.3 Amostras de produtos avícolas destinadas ao consumo.....	42
6.4 Análise microbiológica.....	42
6.5 Teste de sensibilidade aos antimicrobianos.....	44
7. Resultados.....	45
7.1 Isolamento de <i>Salmonella</i> spp.....	45
7.2 Isolamento de Enterobactérias de fezes e carcaças de frangos de corte	49
8. Discussão.....	50
9. Conclusão.....	56
Referências Bibliográficas.....	57
Anexos.....	70
Anexo I: Artigo 1.....	71
Anexo II: Artigo 2.....	82
Anexo III: Fotos.....	100

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BIOLAB – Laboratório de Biologia Animal S.A.
FT – Fagotipo
FSIS – Serviço de Inspeção e Segurança de Alimentos/EUA
g - Grama
°C – Graus Celsius
h – Horas
LPS - Lipolissacarídica
LIA – Agar Lisina-Ferro
MCA – Microbiota Cecal Anaeróbia
mg - Miligrama
mL - Mililitro
µg – Micrograma
NCCLS – *National Committee for Clinical Laboratory Standards*
OMS – Organização Mundial da Saúde
PNSA – Programa Nacional de Sanidade Avícola
S. – *Salmonella*
SE – *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis
SIM – Sulfeto, Indol e Motilidade
TSI – Tríplice Açúcar Ferro
UNILAN – Unidade Laboratorial de Apoio Animal
% - Porcentagem
+ - Positivo
p. - Propabilidade
 x^2 - Qui-quadrado

LISTA DE FOTOS, QUADROS E TABELAS

Foto 1 - Meios de enriquecimento seletivo (Selenito Cistina e Rappaport-vassiliadis).....	101
Foto 2 - Agar Verde-brilhante.....	101
Foto 3 – Prova do TSI.....	101
Gráfico 1 – Percentual de cepas isoladas de <i>Salmonella</i> em carcaças de frango destinadas ao consumo humano.....	47
Tabela 1 – Isolamento de <i>Salmonella</i> de fontes humanas e não humanas entre os anos de 91 – 95.....	26
Tabela 2 – Isolamento e tipificação de <i>Salmonella</i> em carcaças de frango destinadas ao consumo humano.....	46
Tabela 3 – Comportamento de cepas de <i>Salmonella</i> isoladas de carcaças obtidas na indústria e comércio frente à ação de antimicrobianos.....	48
Tabela 4 - Frequência de isolamento de enterobactérias em amostras fecais e amostras de carcaças de frangos de corte prontas para a comercialização.....	49

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o segundo maior produtor de frango de corte e o maior exportador mundial com produção de 3,71 bilhões de frangos no ano de 2003 (UBA, 2003). Para garantir essa produtividade anual, é necessário um crescimento racional que vise além de outros fatores, a qualidade do produto avícola. Para isso, o governo adota planos sanitários que objetivam controlar enfermidades que causam, além de prejuízos econômicos para os produtores, transtornos à saúde pública. As medidas gerais de profilaxia e as normas de biossegurança empregadas em avicultura industrial, como também em criações alternativas, dificultam mas não impedem a presença de microrganismos patogênicos. Dentre esses presentes em granjas, os do gênero *Salmonella* assumem grande importância.

Para a avicultura industrial, a pulorose (*Salmonella enterica* sorovar Pullorum) e o tifo aviário (*Salmonella enterica* sorovar Gallinarum) são os principais determinantes de perdas econômicas em muitos países. Além desses sorovares, podem ser citados outros que também contribuem com esses prejuízos. Em relação à saúde pública, vários autores citam as *Salmonella* causadoras das paratífoides aviária, como por exemplo, a *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis, *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium, *Salmonella enterica* sorovar Infantis e *Salmonella enterica* sorovar Agona, que, constantemente, vêm sendo apontadas como importantes causadoras de infecções de origens alimentares. Estas não estão relacionadas com enfermidades específicas e são potencialmente capazes de infectar indistintamente diversos animais, entre eles o próprio homem.

As décadas de 80 e 90 foram marcadas pelo aumento de surtos de salmonelose humana decorrentes da ingestão de produtos alimentícios de origem animal ou preparados com componentes desses alimentos.

Vários pesquisadores têm identificado os subprodutos avícolas como uma fonte de infecção de *Salmonella* que causam enterites em humanos. Em várias ocasiões, a *S. Enteritidis* em carcaças de frangos de corte prontas para o mercado consumidor tem sido reportada.

No Brasil, mesmo com os programas desenvolvidos pelo Ministério da Agricultura para o controle de patógenos e ações reguladoras da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), é possível encontrar relatos a respeito de surtos e detecção de *Salmonella* em carcaça de frango e alimentos preparados com ovos. Os fatores relacionados a esses isolamentos são inúmeros, sobressaindo o manejo deficiente de muitas empresas, a complexidade epidemiológica dessa bactéria e a falta de fiscalização sanitária das cadeias produtivas dos produtos de origem animal. Contudo, estudo relativo à contaminação na produção e comercialização de frango de corte no Estado do Ceará é praticamente inexistente.

A principal função do monitoramento microbiológico é formar um banco de dados para avaliação da contaminação dos produtos analisados, viabilizando a determinação do nível adequado de proteção contra o agente, o que poderá permitir a melhor eficiência das medidas de controle.

Diante do exposto, faz-se necessário o monitoramento constante da qualidade sanitária que se aplica em todas as etapas de criação das aves industriais da Região Metropolitana de Fortaleza. Essa dissertação teve como objetivo isolar e tipificar *Salmonella* spp. dentro da cadeia produtiva de frango de corte, bem como as demais enterobactérias presentes nos produtos avícolas e analisar a resistência bacteriana das cepas isoladas frente aos antimicrobianos mais utilizados na avicultura industrial.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 HISTÓRICO

O tifo, enfermidade humana, já era conhecido antes da medicina histórica, mas somente cerca do século XIX, com a descoberta do *Bacterium typhi* por Eberth e Gaffky foi que se fez luz sobre sua verdadeira etiologia, anteriormente controversa. Em 1880, Eberth descobriu a bactéria no baço e linfonodos de pessoas com tifo, e, em 1884, Gaffky a isolou em cultivo puro, descrevendo-a morfológica e biologicamente (CORRÊA e CORRÊA, 1992). Em 1885, o Médico Veterinário Dr. Daniel E. SALMON isolou a bactéria que caracterizou o agente do paratifo suíno, denominando de *Bacterium suispestifer*, hoje, conhecida como *Salmonella cholerae-suis*, que na época, erroneamente, a classificavam como o agente etiológico da peste suína. Em sua homenagem, LIGNIÈRES, em 1900, denominou este gênero. Na Alemanha, em 1888, isolou-se o *Bacterium enteritidis* de um surto de toxinfecção alimentar, onde 58 pessoas foram afetadas devido a ingestão de carne bovina contaminada (BARROW, 1993). Depois de 1900, Schottmüller designou, como paratifo, as enfermidades abdominais do homem similares ao tifo.

Em aves, a primeira descrição documentada de salmonelose foi realizada no ano de 1885, em pombos e, somente, entre os anos 1920 e 1930, foram descritos os primeiros surtos em galinhas e perus (SILVA, 1991).

O conhecimento da *Salmonella* patogênica com especificidade para as aves é datado de 1899, em que RETTGER e KLEIN isolaram e descobriram, respectivamente, os sorovares *S. Pullorum* e *S. Gallinarum*. Com o tempo, diversos autores vêm isolando numerosos agentes do grupo, em destaque, com maior incidência, a *S. enterica* sorovares Typhimurium e Enteritidis (SE), sorovares particularmente responsáveis pelas intoxicações alimentares no homem. A

Salmonella foi identificada como uma importante causa de doenças a 100 anos atrás e tem sido objeto de extensivos estudos (LAX *et al.*, 1995).

No início do século XX, a caracterização das bactérias do gênero *Salmonella* ainda era confusa. A partir de 1925, começou a ficar mais clara devido a utilização de provas sorológicas, posteriormente, foram descritos vários sorotipos de *Salmonella*, classificados através da terminologia de White, atingindo aproximadamente 900, que deram origem ao esquema de Kaufmann-White, o qual foi reconhecido a partir de 1932 (CORRÊA e CORRÊA, 1992). O século XIX e XX, a febre tifóide, causada por *S. Typhi*, predominou entre as salmoneloses humanas, tornando-se rara a partir de 1950. As manifestações clínicas de *Salmonella* em seres humanos passaram de uma infecção sistêmica para uma gastroenterite de origem alimentar, provocada por outros sorotipos, marcadas por diarreia, febre e dor abdominal, com rara invasão sistêmica (TIETJEN e FUNG, 1995).

A partir de 1980, ocorreram surtos humanos causados pelo sorovar Enteritidis nos EUA, Grã – Bretanha e outros países da Europa, chamando atenção pelas fontes comuns de infecção. As investigações epidemiológicas identificaram o consumo de ovos ou alimentos contendo ovos como responsáveis pela maioria dos surtos devido a fagotipos específicos de SE. Essas informações foram divulgadas com grande alarde pelos veículos de comunicação, causando grandes prejuízos aos produtores de ovos (SILVA e DUARTE, 2002).

2.2 ETIOLOGIA

As *Salmonella* são bactérias da família das *Enterobacteriaceae* que incluem, aproximadamente, 2300 sorotipos, entre os quais 1367 pertencem a subespécie *enterica* (CAMPOS, 2002). As *Salmonella* estão amplamente difundidas na natureza e são capazes de infectar o trato intestinal de uma ampla gama de animais, tanto de sangue frio quanto de sangue quente, entre eles o homem. São bactérias móveis, excetuando-se as *Salmonella* específicas das aves (*Salmonella*

enterica sorovar Pullorum, causador da pulorose e a *S. enterica* sorovar Gallinarum causador do tifo aviário). São bastonetes curtos, Gram negativos, aeróbios e anaeróbios facultativos de fácil crescimento em meios comuns (BIER, 1981). São relativamente resistentes ao calor e substâncias químicas, porém não sobrevivem à temperatura de 55 °C em 1 h ou em 60 °C de 15 a 20 minutos (GAMA, 2001). As *Salmonella* são bactérias mesófilas, com temperatura de crescimento ótimo entre 35 e 37 °C, possuem a forma de bacilos pequenos medindo 0,7 a 1,5 por 2,0 a 5,0 micras. A maioria dos sorotipos é produtora de gás, H₂S, lisina e ornitina descarboxilase positiva. São urease e indol negativos e reduzem o nitrato a nitrito (CAMPOS, 2002).

O crescimento bacteriano é retardado por baixas temperaturas, portanto o controle dessa variável é significativo no comércio de produtos de origem avícola (GAST e HOLT, 2001). Demonstrando a importância deste fato, pode-se exemplificar o caso da inspeção federal do Canadá que exige temperaturas entre 2 e 3° C na conservação de carcaças, 1° C para miúdos, 10° C para cortes, sala de desossa, setor de embalagens e sala de gotejamento (COSTA, 1996).

A capacidade de sobrevivência ou de multiplicação dos microrganismos que estão presentes em um alimento depende de uma série de fatores, entre eles: os fatores intrínsecos, através das características próprias dos alimentos e os fatores extrínsecos, relacionados com o ambiente em que esses alimentos se encontram.

Em relação ao pH, a *Salmonella* cresce em intervalo de 4,5 a 9,0, com crescimento ótimo na faixa de 6,5 a 7,5, pH da maioria dos alimentos de origem animal. Geralmente em pH abaixo de 4,0 e acima de 9,0 as *Salmonella* são destruídas lentamente (COSTA, 1996). A atividade de água (a_w) ideal é de 0,995 de crescimento, podendo crescer em a_w aproximada de 0,93 a 0,95 (FRAZIER e WESTHOFF, 1993).

A divisão do gênero *Salmonella* é caracterizada através dos tipos sorológicos e essa divisão toma por base a especificidade imunológica dos chamados antígenos somáticos (O), antígenos capsular (Vi) e antígenos flagelares

(H). Os antígenos “O” são designados por números arábicos e caracterizam os sorogrupos de *Salmonella*, por isso o mesmo antígeno “O” é comum a vários sorotipos. Esse antígeno localiza-se na fração lipopolissacarídica (LPS) da membrana externa da bactéria. Os antígenos “H” são de natureza protéica e, também, são espécie-específico, são designados por letras minúsculas do alfabeto e por números arábicos, pois o número de antígenos flagelares é superior ao número de letras do alfabeto. Esses antígenos podem ocorrer em duas fases, denominadas de fase 1 e fase 2, significando que uma *Salmonella*, portadora de determinado antígeno flagelar, pode dar origem a um clone que expressa outro antígeno flagelar durante o processo de multiplicação. Algumas *Salmonella* não apresentam flagelos e são portanto imóveis, enquanto outras podem ter flagelos em uma fase apenas (monofásica). Entretanto, a maioria das *Salmonella* é bifásica, isto é, apresenta flagelos da fase 1 e de fase 2 simultaneamente (CAMPOS, 2002). Esse fenômeno é conhecido como variação de fase.

Os antígenos “Vi” e “O” são termoresistentes e os antígenos “H” são termolábeis. Só existe um tipo imunológico de antígeno “Vi”, encontrado somente em *S. Typhi*, *S. Dublin*, *S. Paratyphi C* (CAMPOS, 2002) e *S. Hirschfeldii* (FRANCO e LANDGRAF, 1996).

Atualmente, a Organização Mundial de Saúde (OMS), através do Centro de Referência e Pesquisa de *Salmonella*, recomenda uma nomenclatura que reflète os recentes avanços na taxonomia do gênero, consistindo de duas espécies, *Salmonella enterica* classificada em seis subespécies (*enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diazarizonae*, *houtenae* e *indica*) e *Salmonella bongori*. Os nomes foram mantidos somente para os sorotipos da subespécie *enterica*, que devem ser escritos com a primeira letra maiúscula e não devem ser de forma itálica (CAMPOS, 2002).

A *Salmonella* provoca nas aves as seguintes enfermidades que afetam a indústria avícola: a pulorose, causada por *S. enterica* sorovar Pullorum; tifo aviário, causada pela *S. enterica* sorovar Gallinarum; e o paratifo aviário, causado por qualquer *Salmonella* que não seja um dos agentes da pulorose ou do tifo aviário. Entre as paratifóides, a *Salmonella enterica* sorovares Typhimurium, Agona e Enteritidis, estas ocasionando salmoneloses em diversos animais (LAX *et al.*, 1995), sendo de grande interesse nos últimos anos devido à infecção alimentar ocasionada

em humanos (SEO *et al.*, 2000). LAX *et al.* (1995) citam que a Salmonelose é uma coletiva descrição de um grupo com sintomas ao qual pode levar a severa febre por meio de infecções intestinais ocasionadas pelo consumo de alimentos contaminados.

2.3 EPIDEMIOLOGIA

O germe é muito difundido geograficamente no mundo todo, principalmente em regiões onde existe uma alta densidade avícola. A salmonelose pode acometer diversos animais, com destaque as aves e mamíferos. Tanto as *Salmonella* específicas das aves, quanto as paratíficas, podem causar problemas na produção, resultando em índices zootécnicos baixos, ocasionando perdas e prejudicando a comercialização dos produtos de origem avícola no mercado interno e externo (BERCHIERI Jr. e BARROW, 1995).

A transmissão de *Salmonella* pode ocorrer por diversas formas e, devido a isso, sua epidemiologia é bastante complexa (HINTON, 1988), sendo difícil determinar como um lote foi infectado ou como ocorre a disseminação bacteriana no plantel. Entre os mecanismos de transmissão, podemos citar: aquisição de aves contaminadas, seres humanos, equipamentos, água, aves silvestres, roedores (SILVA e DUARTE, 2002), animais domésticos e insetos como citam JOVER (1968) e MANSON (1995), além de serem isoladas de moscas, pulgas e baratas, sabendo-se que a SE pode sobreviver, persistentemente, através do ciclo vital das moscas (BERCHIERI Jr. e BARROW, 1995).

Estudos revelam que os microrganismos Gram-negativos são os mais freqüentes nas infecções do trato urinário de cães, com destaque para *Escherichia coli* e *Proteus spp.*, seguidos por agentes Gram-positivos dos gêneros *Staphylococcus* e *Streptococcus*. O gênero *Salmonella* não tem sido descrito como agente casual destas infecções em animais domésticos, porém RIBEIRO *et al.* (2003) identificaram a SE como possível responsável em um relato de infecção do

trato urinário de um cão, ratificando que os cães possuem a possibilidade de servirem como reservatório do gênero *Salmonella*.

A contaminação de matérias primas e rações para aves contribuem para a introdução de *Salmonella* nos plantéis (GIRÃO *et al.*, 1985), porém SILVA e DUARTE (2002) relataram que, em praticamente todos os levantamentos realizados, não há a ocorrência dos sorovares adaptados às aves como *S. Pullorum*, *Gallinarum* e nem SE. Entretanto, as matérias primas de origem animal têm sido retiradas das formulações de rações como forma de controle de *Salmonella* ou as mesmas têm sofrido processo de peletização e tratamento químico os quais não garantem a eliminação deste agente patogênico. A detecção de bactérias em matérias-primas e rações prontas demonstra ser esse um meio de transmissão considerado de grande importância para a disseminação da bactéria (BERCHIERI Jr. *et al.*, 1984).

A porta de entrada geralmente é a via oral, entretanto a infecção pela via respiratória também é possível (TANNOCK e SMITH, 1971). Segundo NAKAMURA *et al.* (1997), o fluxo do ar pode influenciar na maior ou menor disseminação de *Salmonella* no ambiente.

A SE pode infectar um lote de aves e invadir lotes vizinhos sem apresentar nenhum sintoma da doença. Essa infecção inaparente não se limita ao intestino, estendendo-se também aos órgãos internos, incluindo o sistema reprodutivo, com conseqüente contaminação da progênie ou de ovos comerciais para consumo humano (PEREIRA *et al.*, 1999).

NASCIMENTO (1996) e GIORGI (1972) citados por PEREIRA *et al.* (1999) relatam que um número pequeno de aves contaminadas levadas ao abatedouro pode vir a contaminar toda a linha de abate, comprometendo a qualidade do produto final.

A contaminação de ovos pela *Salmonella* pode se dar de duas formas, através da forma vertical – via do ovo (METHNER *et al.*, 1995) e/ou através de infecção horizontal, ocorrência freqüente na contaminação de ovos. O agente localizado na vagina se adere à casca, ultrapassando-a e contaminando o conteúdo

interno do ovo (MIYAMOTO, *et al.*, 1997). A contaminação horizontal dentro de incubadoras também é freqüente (BAILEY *et al.*, 1994; CASON *et al.*, 1994), ocorrendo a contaminação externa da casca e, conseqüentemente, a penetração da bactéria através dos poros dos ovos.

A contaminação vertical pode se dar diretamente na gema ou albúmen através dos órgãos reprodutivos antes da formação da casca como cita SHIVAPRASAD *et al.* (1990). A infecção do ovário da galinha conduz à contaminação dos ovos que no caso da *S. Pullorum*, pode persistir por meses (BARROW, 1999).

Segundo SNOEYENBOS (1991) e BARROW e LOVELL (1991), a *S. Gallinarum*, *S. Pullorum* e *S. Enteritidis* podem ser transmitidas verticalmente por localização no aparelho reprodutivo.

KELLER *et al.* (1997) citam que tanto a *S. Enteritidis* como a *S. Typhimurium* possuem um potencial igual para colonizar o tecido do trato reprodutivo e os ovos em formação no oviduto antes da postura.

COX *et al.* (1990) mostraram que 75 % das amostras de fragmentos dos ovos e “pool” de materiais de papel em incubadoras comerciais continham *Salmonella*, indicando muitas oportunidades para a contaminação de lotes recém incubados.

Como fontes de infecção, podemos citar, além dos animais enfermos, os animais aparentemente são que podem ser portadores e eliminadores de *Salmonella* e contribuir para a propagação da infecção. Estes eliminam os agentes através das dejeções.

A colonização das aves é dose dependente e varia com o dia do desafio. Sabe-se que aves de um dia de idade podem ser colonizadas com menos do que cinco células de *Salmonella* e que a colonização em aves mais velhas se dá de forma irregular requerendo doses maiores de *Salmonella*. Apenas um ovo

contaminado com uma única *Salmonella* pode, substancialmente, contaminar outros ovos e aves em uma incubadora (BAILEY *et al.*, 1992).

2.3.1 Registros de ocorrência de *Salmonella*

Apesar das medidas de biossegurança empregadas na indústria avícola, como também o rígido controle da salmonelose com o sacrifício das aves infectadas, essa enfermidade ainda continua sendo responsável por grandes perdas econômicas tanto para a avicultura, por causar severos quadros de enterites e baixa produção, como também, freqüentes problemas de saúde pública (COX *et al.*, 2000). A presença de *Salmonella* em alimentos de origem animal pode alcançar altos percentuais dado ao nível elevado de animais com infecções subclínicas. Segundo MOSSEL e GARCIA (1985), a carne de frango e outros produtos cárneos, ovos e produtos lácteos são os alimentos mais comumente implicados em surtos de salmonelose.

Trabalho realizado nos Estados Unidos da América, durante o período de 1983 a 1987, por TIETJEN e FUNG (1995) mostrou a ocorrência de 41 surtos de salmonelose, sendo que 8,8 % deles estavam associados ao consumo de carne de frango, 11,2 % ao consumo de carne bovina e 4,1 % decorrente de carnes de perus contaminados.

Segundo SKOV *et. al.* (2002), a *Salmonella* Enteritidis, junto com a *Salmonella* Typhimurium, foram responsáveis pelo aumento, na Dinamarca, pelos casos de salmonelose diagnosticados em humanos na última década. HONG'OMBE *et al.* (1999) identificaram em várias ocasiões a *S. Enteritidis* em frangos de corte abatidos prontos para o mercado. IZAT *et al.* (1991) realizaram testes para verificar a ocorrência, o número e os sorotipos de *Salmonella* presentes em carcaças de frango congeladas, em três mercados do Arkansas – EUA, os resultados obtidos por esses autores foram: das 72 amostras, 5 a 34 microrganismos por 100 mL de fluído da enxaguadura das carcaças, sendo considerado pelos autores um número baixo,

entretanto o percentual de carcaças positivas para *Salmonella* teve uma variação de 17 % a 50 %, os sorotipos isolados foram *S. Typhimurium*, *S. Paratyphi* e *S. Arizonae*.

A maioria dos surtos de toxinfecção alimentar em humanos tem sido associada ao consumo de ovos, alimentos preparados com ovos crus ou cozidos e carnes de frango contaminados com *Salmonella* (POPPE, 1994).

BARROW (1999) cita que a legislação européia requer o controle de matrizes na esperança de que essa abordagem de cima para baixo irá gradualmente aperfeiçoar a situação dos frangos de corte e ovos para o consumo humano, para que a saúde pública possa ser preservada.

A Organização Mundial de Saúde (OMS) indica que a SE parece estar aumentando no continente norte - americano, sul - americano, Europa e talvez África (RODRIGUES *et al.*, 1990). Alimentos e produtos de origem animal entre eles ovos e carne de frango têm sido com frequência acusados de serem veículos de infecção humana por *Salmonella*. O *Codex Alimentarius* recomenda a ausência de qualquer sorovar de *Salmonella* em 25 gramas de amostra analisada, incluindo carne de aves e ovos. Os alimentos de origem animal continuam a ser os principais responsáveis pela infecção humana, entre eles a carne de aves, ovos e derivados.

No Brasil, o primeiro relato da ocorrência de SE em aves foi realizado por pesquisadores da Universidade de São Paulo -USP em 1990 (FERREIRA *et al.*, 1990).

PEREIRA *et al.* (1999) isolarem 03 cepas (2,83 %) de *Salmonella* Enteritidis de amostras de swabs de cloacas de 106 frangos de corte em quatro unidades de criação industrial, do Estado do Rio de Janeiro, sendo as três amostras originárias de uma única unidade de criação. Esses autores analisaram o sistema de criação dessas aves e encontraram que o piso era de chão batido, possível responsável pelas más condições sanitária do ambiente.

No passado, os alimentos contendo ovos já foram os principais causadores de salmonelose nos EUA. Alterações na legislação e na indústria avícola praticamente eliminaram as salmoneloses associadas com o consumo de ovos e derivados nas décadas de 70 e 80. Entre as medidas, estava a coleta várias vezes ao dia e o resfriamento imediato dos ovos em uma temperatura abaixo de 8 °C, preferencialmente a 4 °C, e a utilização de embalagem, permitindo espaçamento e boa ventilação para os ovos. Aparentemente, essas medidas não têm surtido efeito no controle dos surtos por SE, que segue sendo uma das principais causas de infecções alimentares em todo mundo (SILVA e DUARTE, 2002).

Os custos médicos e as perdas de produtividade devido à infecção por *Salmonella* nos EUA, estimados em um bilhão de dólares em 1987 (ROBERTS, 1988), aumentaram para quatro bilhões em 1994, sendo a SE o principal agente causador, e, de acordo com a OMS, os EUA têm a menor incidência de SE entre os países desenvolvidos (SILVA e DUARTE, 2002). Na Holanda, os custos recentes das salmoneloses humanas causadas por SE foram estimados em 79,5 milhões de Florins anualmente.

No Brasil, levantamento feito entre 1970 e 1990 no Instituto Adolfo Lutz em São Paulo, mostrou que a *S. Enteritidis* foi caracterizada em apenas 0,37% das 28.658 amostras de fontes humanas e 0,85 % das 14.345 amostras não-humanas, porém, pesquisas desenvolvidas pelo mesmo Instituto, durante os anos de 1991 a 1995, revelaram que a SE foi o sorovar mais comum dentre as *Salmonella* identificadas como ilustra a Tabela 1 (TAVECHIO *et al.*, 1996).

A ocorrência de *Salmonella* na casca e na gema de ovos de galinhas ainda é preocupante. Durante o ano de 2000, trabalho desenvolvido em pontos de venda da cidade de Campinas – SP mostrou que de 124 amostras obtidas no comércio, 12 (9,6 %) e quatro (3,2 %) foram positivas para a *Salmonella* na casca e na gema, respectivamente, sendo a SE o único sorotipo identificado (OLIVEIRA e SILVA, 2000).

Em trabalho recente, relacionado ao isolamento de *Salmonella* em carcaça congelada de frango, obteve-se como resultado um percentual médio de

contaminação de 32,0 % sendo considerado alto e preocupante, visto que, mesmo a carcaça de frango congelada pode veicular *Salmonella* para seres humanos (SANTOS *et al.*, 2000).

COSTA (1996) utilizou 150 amostras de frangos representadas por 60 carcaças colhidas em um abatedouro submetido a controle higiênico-sanitário permanente, 45 carcaças colhidas em abatedouro não submetido ao citado controle e 45 amostras de cortes de frango colhidas no comércio (15 pares de asas, 15 pares de coxas com sobrecoxa e 15 cortes do peito). O pesquisador pôde concluir que, embora o percentual de contaminação verificado nas carcaças dos abatedouros com controle não apresentasse uma grande diferença em relação às amostras dos abatedouros sem controle, é necessário o controle higiênico-sanitário na indústria avícola como forma de reduzir os níveis de contaminação dos produtos por *Salmonella*.

Tabela 1. Isolamento de *Salmonella* de fontes humanas e não humanas entre os anos de 91 - 95

Sorovares de <i>Salmonella</i>	Fontes humanas (%)					Total	Fontes não-humanas (%)					Total
	91	92	93	94	95		91	92	93	94	95	
Typhimurium	11,1	13,1	11	7,8	4,8	200	9,9	5	5,8	4,4	2,1	151
Agona	16	12,5	8,6	3,6	3,6	185	6,4	3,7	3,6	4,4	1,2	115
Infantis	17,2	3,6	2,8	4,4	2,8	144	2,9	7,6	1	4,9	4	120
Hadar	6,6	5,6	11,6	1,9	0,8	102	2,6	7,4	2,5	2,7	3,6	116
Enteritidis	1,2	2	10,1	43,3	64,9	668	0	0	1,8	22	40,7	546
Outros	37	45,2	35,1	27,7	18,5		78,2	76,3	85,3	61,6	48,4	
sorovares												
Total de amostras	488	305	327	524	610	2254	312	462	916	528	1018	3236

Fonte: Tavechio *et al.*, (1996)

A contaminação de produtos avícolas, de carnes e de ovos para o consumo humano pode ocorrer através das infecções intestinais e sistêmicas das aves, durante o abate e processamento, contato com superfícies contaminadas, pelas mãos dos manipuladores e contaminação cruzada durante o preparo dos alimentos, entre outros fatores (SILVA, 1996).

Segundo LILLARD (1989), um levantamento realizado pelo serviço de Inspeção e Segurança de Alimentos (FSIS), em 1987, nos EUA, demonstrou que 3 a 4 % dos frangos que chegavam na linha de abate eram positivos para *Salmonella* sp., enquanto 35 % das carcaças processadas saíam contaminadas. Esses achados demonstram que ocorre contaminação cruzada durante o processamento dos frangos. A tecnologia de abate de aves não garante um produto livre de *Salmonella*. ALMEIDA e SILVA (1992) confirmaram que a depenação e evisceração são pontos críticos de contaminação das carcaças por *Salmonella* durante o abate e processamento das aves.

CUNHA NETO *et al.* (1976), citado por COSTA (1996), pesquisaram, em Belo Horizonte, a presença de *Salmonella* em carcaças de frangos em três abatedouros e obtiveram uma taxa de positividade de 34 %, sendo identificados os sorotipos *S. Newport* e *S. Derby*. Durante o ano de 1982, CUNHA NETO *et al.* realizaram a pesquisa de isolamento em 300 carcaças de frangos provenientes de duas granjas, detectaram a prevalência de 20 % com maior frequência dos sorotipos de *S. Typhimurium* e *S. Anatum*.

ARUMUGASWAMY *et al.* (1995), citados por COSTA (1996), analisaram cortes de frango cru (peito, asa e pescoço) e miúdos (fígado e moela), obtidos de supermercados, feiras e lojas varejistas da Malásia e verificaram a presença de *Salmonella* em 13 (39 %) das 33 amostras de cortes, 6 (35 %) das 17 amostras de fígado e 8 (44 %) das 18 amostras de moela analisadas. Os sorotipos identificados com maior frequência foram *S. Blockley*, *S. Enteritidis* e *S. Chincol*.

2.4 PATOGENIA

A infecção normalmente ocorre por via oral. Os organismos invadem rapidamente os tecidos dos hospedeiros, através do tecido linfóide, inclusive as placas de Peyer e, no caso das galinhas, a amígdala cecal e possivelmente também

os enterócitos da mucosa intestinal (POPIEL e TUMBULL, 1985; BARROW, 1999). Estudos *in vitro* mostraram que a *Salmonella* induz o seu engolfamento pela célula epitelial, em um processo ativo que requer gasto de energia pela célula hospedeira (CAMPOS, 2002). A invasão ocorre especialmente via superfície apical, onde no interior de uma distância crítica da célula, a *Salmonella* induz um rompimento e alongação da microvilosidade procedendo a endocitose. A bactéria atinge a corrente sanguínea provavelmente de modo intracelular, sendo removida pelo baço, fígado e medula (BARROW, 1999). Pode ocorrer também através das células M, sendo que, segundo CAMPOS (2002), a *S. Typhi* parece utilizar apenas a célula M. Essas células fazem parte da mucosa e se localizam sobre uma coleção de folículos linfóides denominadas Placas de Peyer. As células M ingerem bactérias e outros antígenos por fagocitose e os transportam através da barreira intestinal para os macrófagos do tecido subjacente.

Nessa fase acontece a multiplicação bacteriana em uma taxa que reflete a virulência da linhagem em questão e o fundo genético do hospedeiro. A *S. Gallinarum* e *S. Pullorum*, em galinhas, pode disseminar-se nas fezes após a infecção do tecido linfóide na parede do intestino delgado. Já a *S. Typhi* é disseminada nas fezes após infecção da vesícula biliar. Em sorotipos mais invasivos, a infecção pode se dar através do trato reprodutivo. A *Salmonella* Enteritidis pode colonizar os folículos preovulatórios interagindo com as células da granulosa ovariana (THIAGARAJAN *et al.*, 1994).

A adesão de *S. Typhimurium* em culturas de células causa uma alteração na superfície da célula hospedeira, caracterizada por alongamento e dilatação da membrana celular, sendo este processo denominado de *Ruffling*, pois a membrana celular passa a apresentar um aspecto ondulado (CAMPOS, 2002). A *Salmonella* se encontrará no interior de vesículas endocíticas (fagossomos em macrófagos) após sua internalização, se multiplicando, mas nunca são encontradas livres no citoplasma.

BIER (1981) cita que a *S. Typhi* penetra pela via digestiva e, durante o período de incubação, multiplica-se no tecido linfóide da submucosa intestinal (placas de Peyer) e nos linfonodos regionais. Essa multiplicação se dá no interior de

macrófagos e plasmócitos, sendo provável que tais focos de proliferação intracelular atinjam a corrente sangüínea, via linfático eferente e dutos torácicos. Na primeira semana da doença há bacteremia (hemocultura positiva) e através do sangue há propagação da *Salmonella* ao fígado, baço e medula óssea, onde prolifera, ocorrendo reinvasão do sangue e liberação de endotoxina (toxemia). Na segunda semana, a hemocultura tende a tornar negativa devido ao aparecimento de anticorpos opsonizantes (anti-O) atingindo o período de convalescença podendo o doente adquirir a condição de portador devido a infecção crônica da vesícula biliar (coprocultura positiva).

2.5 PATOLOGIA

A *Salmonella* tem como órgão de predileção o intestino, onde se instalam e se reproduzem, conforme as espécies afetadas e o tipo de agente. Quando o agente etiológico ingressa na corrente sangüínea poderá ocorrer a forma septicêmica, quando se observam lesões hepáticas com aumento de volume do órgão e formação dos nódulos paratíficos, embora esses achados não sejam patognomônicos. Caso o agente chegue a ultrapassar o fígado, poderá também ser observado nos pulmões, provocando uma pneumonia lobular, geralmente grave (SATO *et. al.*, 1997).

Macroscopicamente, as lesões podem apresentar sinais de desidratação, pele flácida, saco da gema coagulado ou não absorvido, congestão do fígado e baço e presença de pequenos pontos branco-acinzentados de áreas de necrose, perihepatite, rins congestionados, pericardite com aderências, peritonite acompanhada ocasionalmente por focos necróticos e exsudato caseoso nos cecos (SILVA, 1996).

A infecção pode resultar em várias complicações, incluindo gastroenterites, peritonites, hemorragias na camada serosa, no pericárdio e peritônio com inflamação deste, estando os órgãos contidos na cavidade abdominal, fígado, baço e intestinos recobertos por uma capa fina de fibrina. Inflamação congestiva da

mucosa intestinal. Em animais adultos, ocorrem ulcerações na mucosa, nos órgãos genitais das galinhas, inflamação do oviduto e ovário contendo vitelo deformado, angulosos, as articulações com deformações (JOVER, 1968; BERCHIERI Jr., 2000).

A pulorose está fortemente relacionada com a idade, nível de contaminação, linhagem das aves e manejo. As formas aguda e superaguda dão-se em pintos de poucos dias de idade. Elas surgem após a eclosão, podendo evoluir rapidamente e causar alta mortalidade na segunda semana de vida. Passando as duas semanas, pode cessar a mortalidade com as aves se recuperando posteriormente (ROCA *et al.*, 1991). Em alguns casos, a mortalidade pode ser em 25 a 30 % sendo bastante variável, dependendo do sistema imune das aves e das condições de manejo. As aves com mais idade passam a ter a pulorose na forma crônica que repercute na postura das galinhas e em um desenvolvimento lento e irregular nas aves jovens.

Entre as alterações microscópicas, pode-se citar, na forma superaguda, uma congestão vascular em vários órgãos como fígado, baço e rins. Na forma aguda e sub-aguda, há pontos necróticos no fígado, congestão renal e nos cecos de aves jovens há extensa necrose da mucosa e sub-mucosa com o lúmen contendo debris celulares necrosados, misturado com fibrina e heterófilos (BERCHIERI Jr., 2000). Há serosites no pericárdio, pleuroperitônio e trato intestinal. Em casos agudos, observam-se lesões heterofílicas e fibrina, já em estágios mais tardios encontram-se apenas linfócitos, plamócitos e células histiocíticas. No aparelho reprodutivo, é observado ovarites, que resultam em degeneração folicular.

O tifo aviário causado pela *Salmonella enterica* sorovar Gallinarum é uma enfermidade aguda com um breve período de incubação; não se pode falar sobre percentual de mortalidade devido à existência de grande variabilidade. ROCA *et al.* (1991) citam que há relatos de percentual de mortalidade em cerca de 100 %. Em um lote, pode-se observar aves com o quadro clínico da doença e aves que mostram aspecto normal de saúde. Essa enfermidade apresenta características de septicemia e toxemia. Há congestão dos órgãos internos e destruição das hemácias pelo sistema mononuclear fagocitário com conseguinte anemia. Há esplenomegalia e hepatomegalia nos quadros agudos. O fígado torna-se friável com coloração atípica

(esverdeado) com pontos necróticos (esbranquiçado) e hemorrágicos. Há pontos necróticos também no coração e no baço e este possui, ainda, pontos de hemorragia. Pode ser observado, como na pulorose, processo inflamatório com formação de nódulos em diversos órgãos (BERCHIERI Jr., 2000). O ovário pode aparecer atrofiado ou com os folículos hemorrágicos, assim como ocorre na pulorose.

As aves que estão enfermas com o paratifo aviário, quando apresentam um quadro severo, desenvolvem septicemia aguda com rápida morte, sendo que nesse caso, não há presença de alterações macroscópicas. Quando o curso da doença se prolonga, há enterite severa com necrose focal da mucosa do intestino delgado. Há congestão renal, baço, fígado e tubo digestivo e, em pintainhos, pode haver má absorção do tubo digestivo. Em aves adultas, há atrofia do ovário, folículos alterados, hemorrágicos e caseosos.

A infecção do trato digestivo das aves por *Salmonella* paratifóides é mais eficaz e persistente no ceco, reto e ingluvío, nessa ordem (HARGIS *et al.*, 1995).

2.6 SINTOMATOLOGIA

A salmonelose tem como característica, de modo geral, a sonolência, fraqueza, anorexia, diminuição da curva de crescimento e amontoamento. Ovos infectados por *Salmonella* podem favorecer o aparecimento de pintainhos moribundos e mortos já na incubadora.

Em alguns casos, sinais evidentes da infecção não são observados de cinco a dez dias após o nascimento dos pintos, mas a doença ganha impulso nos próximos sete a dez dias. O pico de mortalidade geralmente ocorre durante a segunda ou terceira semana de vida, onde as aves ficam prostradas e tendem a se amontoar para se aquecerem (JOHNSON *et al.*, 1992).

Na pulorose, há diarreia branca a branco – amarelada com morte posterior e acomete, principalmente, aves nos primeiros dias de vida, resultante da transmissão transovariana. O pico de mortalidade acontece durante a 2ª e 3ª semana. Há eriçamento das penas, asas caídas e aspecto debilitado, a respiração passa a ser dificultosa. Os animais que sobreviverem à enfermidade podem vir a se recuperar, porém poderão ser portadores e eliminar a bactéria em seus ovos durante a postura (BERCHIERI Jr., 2000). A pulorose é mais comum em aves jovens, porém podem acometer também aves adultas e sua sintomatologia nem sempre é evidente. Entre os sinais manifestados, observa-se a curva de postura inferior ao padrão da linhagem, queda no consumo da ração, eriçamento das penas, crista pálida e retraída. Há diminuição da eclodibilidade e diminuição da fertilidade.

Já o Tifo aviário é mais observado em aves adultas, com a diminuição da alimentação, aves quietas e prostradas, a diarreia possui coloração amarela - esverdeada a esverdeada. O curso pode ser de cinco a sete dias, podendo se prolongar. A mortalidade não ocorre de uma só vez.

As infecções paratífóides geralmente causam problemas apenas em aves jovens. Os sintomas são confundidos com os de outras doenças e incluem sonolência, as aves permanecem paradas com a cabeça baixa e olhos fechados, eriçamento das penas e asas caídas. Há amontoamento próximo a fonte de calor, perda de apetite e aumento do consumo de água, diarreia aquosa profusa e emplastramento da cloaca (BERCHIERI Jr. e BARROW, 1995).

GAST e BEARD (1990) relatam que a SE, ao infectar os órgãos reprodutivos de poedeiras, pode proporcionar redução da produção de ovos.

Em seres humanos, as manifestações clínicas da infecção por *Salmonella* variam desde leves sinais intestinais à septicemia, com óbitos, em geral, restritos a recém-nascidos, idosos e pessoas que apresentam algum distúrbio imunológico. A diarreia é o principal sintoma, sua intensidade varia de acordo com o paciente, sendo, na maioria dos casos, ocorrendo a cada 10 a 15 minutos e por várias horas, passando a ocorrer de duas a três horas por dia ou mais. Dores abdominais, cólicas,

febre, náuseas, vômito e dor de cabeça também podem estar presentes (SILVA, 1991).

2.7 MEDIDAS DE CONTROLE E PROFILAXIA

Com o passar dos anos, os métodos para o controle de infecção por *Salmonella* foram estudados em profundidade (BARROW, 1991). Hoje em dia, a indústria avícola introduziu em diversos países, medidas para serem aplicadas nos lotes de reprodução, para reduzir o perigo de posterior multiplicação das *Salmonella* nos animais vivos. Esse esforço é continuado durante toda a cadeia de produção até chegar à carne para consumo, ovos e os seus produtos, podendo ajudar a alcançar uma situação isenta de contaminação pelos agentes patogênicos (MULDER, 1995).

Muitos são os fatores que influenciam a contaminação das aves, tanto vivas quanto sacrificadas. Nesse sentido, para se conduzir medidas que visem o controle e a profilaxia é importante se basear nos fatores que predispõem à contaminação bacteriana e nos conhecimentos anteriormente citados e, desse modo, minimizar-se-á as perdas ocasionadas por essas bactérias.

2.7.1 Métodos de Diagnóstico

O diagnóstico pode servir como forma de diminuir a salmonelose em humanos e animais. Um diagnóstico definitivo e eficaz para pulorose, tifo aviário e paratifo aviário está baseado no isolamento e identificação da *Salmonella*. Contudo, o diagnóstico pode ser complementado pelo histórico, sinais clínicos, lesões e mortalidade (MACHADO, 2000).

Para o diagnóstico clínico, necessita-se fazer a anamnese bem feita, acompanhada dos achados clínicos e de necropsia, porém é difícil se analisado apenas os sintomas e as lesões, devendo-se fazer o diagnóstico diferencial através da investigação bacteriológica e sorológica. Os resultados dos exames sorológicos precisam ser confirmados com os exames bacteriológicos. O veterinário deverá usar os achados clínicos e anátomo – patológicos discutidos anteriormente como uma arma para direcionar de forma objetiva os exames laboratoriais, pois somente estes poderão fornecer, com maior exatidão, o diagnóstico final.

Para o diagnóstico por isolamento bacteriano de aves com sinais clínicos da doença ou suspeitas sorológicas, é comum a utilização de “swabs” de órgãos ou de fragmentos colhidos com material estéril. No monitoramento de lotes, são mais usadas as coletas através de “swabs” de cloaca, “swabs” de arrasto, cama, fezes frescas, conteúdo de comedouros e água, e, no caso de poedeiras comerciais, ovos e embriões também podem ser cultivados (BERCHIERI Jr. e BARROW, 1995).

A escolha do procedimento laboratorial adequado é um pré-requisito essencial para o isolamento de qualquer microrganismo, pois sabe-se que há diversos fatores que podem afetar os resultados de comparações de métodos de isolamento de *Salmonella* (ALBUQUERQUE *et al.*, 2000). Esses autores utilizaram diferentes meios de cultivo para o isolamento de *Salmonella* em matérias-primas.

Entre os exames laboratoriais mais utilizados, pode-se citar: os testes sorológicos (ELISA, Hemoaglutinação rápida em placas) e os meios de cultivo bacteriano (agar Verde Brilhante, agar MacConkey, *Salmonella* - *Shigella*, entre outros).

Segundo OLIVEIRA (1984), para o diagnóstico de portadores da pulorose, usa-se o teste de Hemoaglutinação efetuado no próprio aviário, usando antígeno de laboratório idôneo controlado com soros positivos e negativos na hora da prova, as aves deverão estar em jejum por algumas horas, o soro e o antígeno devem estar na mesma temperatura, sendo o resultado lido por um período de um minuto, após a mistura de uma gota de antígeno e uma gota de sangue colhido da ave. As reações positivas são as que apresentarem aglutinação em toda à área da superfície.

O teste de soroglutinação rápida em placas está sujeito a alterações nos resultados, podendo encontrar resultados falso-positivos devido o teste apresentar baixa especificidade e falso-negativos em consequência, também, da baixa sensibilidade (GAST e BEARD, 1990).

BERCHIERI Jr. (2000) cita que os órgãos de predileção para isolamento da bactéria são o baço, fígado, coração, ovário, conteúdo intestinal, saco da gema, medula óssea, pulmão e locais lesionados, como a articulação (artrite) e sacos aéreos (aerossaculite). ROCA *et al.* (1991) citam que na forma aguda septicêmica dos pintainhos, a *S. Pullorum* pode ser isolada a partir de qualquer órgão parenquimatoso.

2.7.2 Higienização e Controle do Ambiente

A higienização do ambiente é necessária para um controle efetivo, não podendo ser de forma aleatória, e sim racional. É importante a escolha de desinfetantes ideais para cada situação e ambiente (SALLE e SILVA, 2000). Muitos são sensíveis à variação de pH ou de temperatura. É importante compatibilizar suas propriedades com as necessidades, levando em conta o tipo de microorganismo que se pretende controlar, o local e o objeto a desinfetar (SALLE e SILVA, 2000).

O controle, como anteriormente mencionado, é bastante complexo, pois existem fontes potenciais de contaminação como ração, roedores, insetos, transporte e o ambiente de processamento de aves. Todas essas fontes são potencialmente importantes (BAILEY, 2000).

O controle de portadores intermediários como ratos, pássaros e insetos, também são motivos de investigação. HENZLER e OPITZ. (1992) isolaram SE de 24 % de ratos capturados e somente 7,5 % do ambiente.

2.7.3 Antimicrobianos

Sulfonamidas e Nitrofuranos podem atuar contra a *Salmonella*. Esses reduzem a mortalidade mas não evitam que as aves deixem de ser portadoras. Esses antibióticos podem interferir com a resposta sorológica e portanto são contraindicados por pelo menos seis semanas antes do teste de pulorose (BERCHIERI Jr. 2000). A furazolidona prestou durante 40 anos grande benefício à avicultura e à suinocultura mundial, particularmente, nas atividades tecnificadas. Deve-se muito a esse nitrofurano o controle da salmonelose. Atualmente, face às novas avaliações toxicológicas e, sobretudo, pelo surgimento de substitutivos mais eficientes e menos tóxicos, esse composto tende a sair do comércio de insumos pecuários medicamentosos. A Portaria Ministerial 448/98 proibiu o uso de Cloranfenicol, Furazolidona e Nitrofurazona para animais produtores de alimentos.

SMITH e TUCKER (1975) afirmam que trabalhos experimentais com a excreção fecal de *S. Typhimurium* por frango de corte demonstraram que dependendo da escolha do agente antimicrobiano, eles podem não ser muito eficazes, podendo aumentar a excreção desses agentes nas fezes.

Segundo BARROW (1999), o abuso de agentes quimioterápicos pode resultar no desenvolvimento de resistência, tanto na flora de coliformes, quanto na de *Salmonella*. O controle sobre as vendas e a administração (ou a ausência de tudo isso em muitos países) de antimicrobianos é um sério problema de saúde pública em todo o mundo.

O uso de antimicrobianos pode selecionar bactérias resistentes no ecossistema de uso (SILVA e DUARTE, 2002). Patógenos humanos e genes de resistência podem passar entre humanos, animais e outros ecossistemas, via contato com animais ou através do consumo de alimento ou água contaminada (KELLEY *et al.*, 1998).

A resistência é observada no uso de antimicrobianos em dosagens subterapêuticas como meio de se obter melhor produtividade na avicultura industrial.

ELBOUX *et al.* (2002) citam que houve um aumento de resistência de *Salmonella* ao ácido nalidíxico e cefoxitina comparado a amostras isoladas a mais de 10 anos, detectando, também, aumento de sensibilidade a nitrofurantoína, amicacina e aztreonam.

A resistência pode ser natural ou adquirida. A natural corresponde a uma característica da espécie bacteriana, e a adquirida, a característica de uma ou mais amostras da espécie. No primeiro caso, todas as amostras da espécie, independentemente do local de isolamento, são sempre resistente, já a resistência adquirida, somente parte das amostras é resistente, a proporção destas variando de lugar para lugar, dependendo basicamente da intensidade do uso do antimicrobiano (TRABULSI e TOLEDO, 1999).

2.7.4 Imunidade e Vacinação

Na ocorrência do desafio de campo de *Salmonella*, a imunidade vacinal impede que as cepas de campo possam aderir ao intestino. Aves apropriadamente vacinadas podem suportar uma infecção e eliminar a bactéria mais rapidamente e efetivamente do que as aves não imunes.

As vacinas de *Salmonella* com cepas mortas e vivas atenuadas estão sendo empregadas. As vacinas produzidas através de bactérias mortas de *Salmonella* têm sido largamente encontradas na proteção contra as salmoneloses em experimentos animais, entretanto o nível e duração da proteção são pobres (LAX *et al.*, 1995).

O uso de vacinas vivas atenuadas é um meio eficiente de aumentar a resistência contra a infecção por *S. Gallinarum*, em que outros métodos de controle podem não ser possíveis. WITVLIET *et al.* citado por BARROW (1999) afirmam que vacinas contra *S. Gallinarum* poderiam ser eficazes contra a *Salmonella* Enteritidis.

SCHARR (2003) cita que o aumento da demanda em proteger o consumidor impõe um alto desafio à indústria de produtos alimentícios. Novas tecnologias em todas as áreas estão voltadas para essas demandas, inclusive a imunidade conferida por vacinas mais seguras e eficazes, sendo o principal instrumento para a melhora da segurança alimentar em produtos avícolas.

2.7.5 Exclusão competitiva

O aumento da resistência aos patógenos adquirido com a idade tem sido considerado como consequência da instalação gradual de microrganismos que compõem a microflora intestinal. Nesse sentido, métodos vêm sendo estudados para favorecer o desenvolvimento da microbiota não patogênica das aves de modo a exercer competição contra os microrganismos. Desse modo, os pintainhos adquirem resistência à colonização por *Salmonella* similarmente ao que ocorrem com as aves adultas.

O uso da microflora para evitar a instalação subsequente de *Salmonella* no campo minimiza o problema mas não protege totalmente as aves e esse método não deve ser utilizado quando a contaminação estiver em níveis acentuados em pintos nos primeiros dias de vida. Existe dificuldade de padronização e controle da quantidade do uso de cultura mista de flora intestinal de aves adultas para controlar a colonização cecal de aves jovens por *Salmonella* (BERCHIERI Jr., 2000).

BARROW (1999) cita que as tentativas para se produzir uma preparação definida resultaram em um produto menos eficaz, sendo muito sensíveis aos efeitos dos antibióticos promotores de crescimento, o que pode neutralizar a sua eficácia.

O uso de microbiota cecal anaeróbia (MCA), isolada ou em associação com o ácido acético, reduz, significativamente, a colonização do intestino das aves tanto para a *S. Typhimurium* quanto para a *S. Enteritidis* (ANDREATTI FILHO *et al.*,

1997). Já o uso isolado do ácido acético, propiônico ou fórmico isolado não alterou o curso da colonização. Porém, o uso dos ácidos orgânicos e da MCA teve pouco efeito na redução da infecção sistêmica, demonstrando que o uso de MCA tem ação restrita ao trato digestivo.

OLIVEIRA *et al.* (1998) citam que cultura em aerobiose de fezes provenientes de aves adultas é eficaz contra a colonização cecal por *S. Typhimurium* e *S. Infantis*, SEO *et al.* (2000) citam que o uso da flora intestinal normal de aves como parte de um regime de exclusão competitiva pode fornecer em pintos de um dia proteção contra a colonização de *Salmonella* e prevenir o estabelecimento de infecção persistente de SE.

3. JUSTIFICATIVA

A salmonelose vem constantemente sendo apontada como uma das principais doenças causadoras de grandes prejuízos econômicos à indústria avícola (Pulorose e Tifo aviário), bem como uma enfermidade de constante preocupação na saúde pública (Paratifo aviário). Para empregar programas sanitários eficientes no controle dessa enfermidade, é necessário conhecer os níveis de contaminação de aves destinadas ao consumo humano, como também realizar a tipificação, destacando os principais sorotipos causadores da salmonelose em nossa região, e detectar quais os antimicrobianos mais efetivos no combate às bactérias isoladas.

4. HIPÓTESE CIENTÍFICA

É possível isolar e tipificar *Salmonella* de produtos avícolas destinados ao consumo humano da Região Metropolitana de Fortaleza e identificar os antimicrobianos mais eficientes no combate à salmonelose.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo Geral

- Realizar o Isolamento e a tipificação de *Salmonella* spp. da cadeia produtiva de frango de corte da Região Metropolitana de Fortaleza - Ceará.

5.2 Objetivos Específicos

- Realizar o isolamento e a tipificação de *Salmonella* spp. em lotes de frangos de corte nas fases inicial, recria e final com: um, 20 e 45 dias de idade respectivamente.
- Realizar o isolamento e a tipificação de *Salmonella* spp. de carcaças de frangos de corte oriundas de abatedouros sem fiscalização federal.
- Realizar o isolamento e tipificação de *Salmonella* spp. de carcaças (resfriadas e congeladas) de frangos de corte, prontas para o consumo, adquiridas de pontos comerciais.

- Identificar, *In vitro*, os antimicrobianos mais eficazes contra as cepas de *Salmonella* isoladas e tipificadas da Região Metropolitana de Fortaleza.
- Identificar as *Enterobactereaceae* mais frequentes em fezes e carcaças de frangos de corte.

6. MATERIAL E MÉTODOS

6.1 LOCAL DE EXECUÇÃO

As análises laboratoriais foram realizadas no Unidade Laboratorial Animal (UNILAN)/MAPA/CE e no BIOLAB/CE para os cultivos bacterianos, confirmação sorológica e teste de sensibilidade aos antimicrobianos, e a tipificação das cepas foi realizada pelo Instituto Adolfo Lutz em São Paulo.

6.2 AMOSTRAS DA FASE DE PRODUÇÃO DE FRANGO DE CORTE

Foram coletadas fezes de 21 lotes de frangos de corte de quatro granjas industriais localizadas no Estado do Ceará, em três fases de criação (01, 20 e 45 dias), totalizando 63 amostras. As coletas foram realizadas através de um “pool” de 100 amostras de fezes frescas distribuídas dentro de um galpão, acondicionadas em sacos plásticos estéreis e encaminhadas ao laboratório de execução, estando desta forma de acordo com os critérios adotados pelo Plano Nacional de Sanidade Avícola – PNSA (Brasil/MAARA, 2002).

6.3 AMOSTRAS DE PRODUTOS AVÍCOLAS DESTINADOS AO CONSUMO

Foram coletadas carcaças de frango vendidas em pontos comerciais, prontas para o consumo. Essas amostras foram divididas nas seguintes categorias: carcaças de frango recém - abatidas oriundas de dois abatedouros sem fiscalização federal (14 amostras), carcaças de frango resfriadas (18 amostras); carcaças de frango congeladas (19 amostras).

6.4 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

Tanto as amostras de fezes (fase de produção do frango de corte) quanto as amostras de carcaças prontas para o consumo, foram colhidas aleatoriamente em dias normais de manejo, abate e comercialização de empresas distintas da Região Metropolitana de Fortaleza. Para a manipulação das fezes, utilizou-se pesagem de 25 g para cada 225 mL de água peptonada tamponada a 0,1 % (BRASIL, MAARA, 2002), já as carcaças foram submetidas ao método de “enxagüadura”, citado por COX *et al.* (1978), realizado com adição de 300 mL de água peptonada tamponada a 0,1 %. As soluções provenientes desse método foram vertidas em frascos tipo Erlenmeyer.

O cultivo bacteriano seguiu as normas estipuladas pelo Plano Nacional de Sanidade Avícola (BRASIL, MAARA, 2002) com algumas modificações. O protocolo iniciou-se com o pré-enriquecimento da seguinte forma: uma vez no laboratório, as soluções resultantes do processo de enxagüadura foram mantidas à temperatura de incubação a 37 °C por 24 h. Após esse período, o passo seguinte foi de enriquecimento seletivo, que consistia na retirada de alíquotas do pré-enriquecimento para os meios Rappaport-vassiliadis na proporção de 1:100 e Selenito Cistina na proporção de 1:10. De cada uma das culturas de enriquecimento seletivo, utilizou-se uma alça de níquel-cromo e alíquotas foram semeadas de forma

asséptica em placas contendo os meios agar Verde Brilhante, agar MacConkey e agar *Salmonella – Shigella*. A temperatura de incubação foi padronizada em 37 °C por um período de 24 h.

A identificação presuntiva foi realizada através das culturas obtidas do plaqueamento seletivo. Dessa forma, foram colhidas, com auxílio de uma agulha de platina previamente flambada, amostras de cada uma das placas semeadas, sendo escolhidas entre duas e três colônias sugestivas para *Salmonella* e incubadas em tubos contendo agar inclinado Tríplice Açúcar Ferro (TSI) e agar inclinado Lisina-Ferro (LIA). Para a realização da prova do Indol, foi utilizado o meio SIM (Sulfeto, Indol e Motilidade) que caracteriza as bactérias em relação à motilidade, à produção de sulfeto e à reação de Indol. A prova do Citrato também foi realizada. A incubação seguiu a temperatura de 37 °C por um período de 24 h. Assim sendo, as bactérias foram classificadas quanto ao gênero de acordo com as características bioquímicas apresentadas nessas provas.

As Colônias classificadas bioquimicamente como *Salmonella* foram submetidas a sorologia com soros polivalentes anti-*Salmonella* somático (O) e flagelares (H). As colônias suspeitas foram transferidas, com alça de níquel-cromo, para lâminas de vidro contendo gotas de solução salina a 0,85%. Após a homogeneização de cada cultura, foi acrescida uma gota de soro polivalente anti-*Salmonella* somáticos (O) e flagelares (H), sendo positivas as amostras que apresentassem aglutinação na mistura. As amostras positivas foram conservadas em agar Nutriente, sendo então encaminhadas ao Instituto Adolfo Lutz em São Paulo para a tipificação.

Para a comparação entre as diversas categorias das amostras foi utilizado o teste não paramétrico para análises qualitativas Qui-quadrado (χ^2), considerando como diferença estatística uma probabilidade de 5% ($p < 0,05$).

6.5 TESTE DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

Foi verificado o comportamento de todas as amostras isoladas de *Salmonella* spp frente à ação de antimicrobianos. As cepas foram submetidas a testes de sensibilidade segundo método de KIRBY-BAUER (BAUER *et al.*, 1966).

Cada uma das cepas foi inoculada em caldo BHI e incubadas por 24 h a 37 °C. Após esse período, cada amostra foi semeada de modo uniforme em placas contendo agar de Mueller Hinton. Para tal, utilizou-se “swabs” esterilizados os quais foram mergulhados na cultura e retirado o excesso por pressão na parede interna do tubo. As placas permaneceram à temperatura ambiente por cinco minutos antes da aplicação dos discos.

Os discos impregnados com os antimicrobianos foram distribuídos nas placas, com auxílio de uma pinça previamente flambada, de forma asséptica e pressionados levemente contra a superfície do meio. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h. Os antimicrobianos utilizados foram Ampicilina (10 µg), Amoxicilina (10 µg), Amicacina (30 µg), Norfloxacina (10 µg), Tetraciclina (30 µg), Cloranfenicol (30 µg), Netilmicina (30 µg), Gentamicina (10 µg), Sulfonamida (300 µg) e Carbenicilina (100 µg).

A leitura dos halos de inibição foi realizada com utilização de uma régua milimetrada, comparando os valores obtidos com a tabela padrão. A classificação das amostras em resistentes e sensíveis seguiu de acordo com o estabelecido pelo *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS), para os isolados que apresentaram resistência intermediária foram considerados resistentes, seguindo o procedimento utilizado pelo UNILAN.

7. RESULTADOS

7.1 ISOLAMENTO DE *Salmonella* spp.

A presença de *Salmonella* foi investigada em amostras de fezes de 21 lotes de frangos de corte em três fases de produção, totalizando 63 amostras. Nesta etapa do experimento não foi obtido nenhum isolamento dessa bactéria, evidenciando que os lotes pesquisados encontravam-se livres de contaminação por *Salmonella*. O resultado pode ser indicativo de que as granjas da Região Metropolitana de Fortaleza apresentaram um bom estado de higiene e manejo.

Com relação às amostras das carcaças de frango destinadas ao consumo humano (recém - abatidas, resfriadas e congeladas), foram isoladas cepas de *Salmonella* nas três categorias pesquisadas neste experimento como representa a Tabela 2.

Tabela 2 – Isolamento e tipificação de *Salmonella* em carcaças de frango destinadas ao consumo humano e vendidas em pontos comerciais de Fortaleza, Ceará, Brasil.

Carcaças	Amostras (n)	Isolados (%)	<i>Salmonella</i> isoladas (n)
Recém - abatidas	14	2 (14,3)	S. Panama (2)
Resfriadas	18	3 (16,7)	S. Newport (1); S. Enteritidis (2)
Congeladas	19	1 (5,26)	S. Enteritidis (1)
Total	51	6 (11,8)	

n – Número de amostras

Não diferiram estatisticamente – ($p < 0,05$)

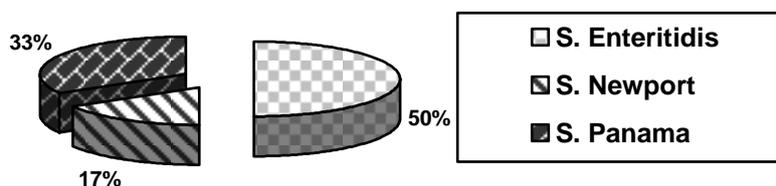
Dentre as amostras de carcaças de frango recém - abatidas, foi isolada a *Salmonella* Panama (14,3 %). Os achados relacionados às análises das carcaças

resfriadas evidenciaram alto índice de contaminação (16,7 %), onde foram encontradas SE e S. Newport. Os isolados de carcaças congeladas de frango, destinadas ao consumo humano, corresponderam ao menor índice de isolamento (5,26 %). Dentre as empresas que comercializam aves congeladas a única cepa isolada foi de SE.

As amostras mostraram variações quanto à contaminação por *Salmonella*, porém essas diferenças existentes entre as diversas categorias de carcaças de frangos de corte analisadas não foram significativas estatisticamente ($p < 0,05$).

O Gráfico 1 representa a distribuição das cepas isoladas, onde pode-se observar que das seis *Salmonella* isoladas houve predominância da *Salmonella* Enteritidis, sugerindo maior risco para a saúde pública ao consumir carcaças mal conservadas.

Gráfico 1 – Percentual de isolados de *Salmonella* em carcaças de frango destinadas ao consumo humano e vendidas em pontos comerciais de Fortaleza, Ceará, Brasil.



Entre os isolados, destaca-se a *Salmonella* Enteritidis (Gráfico 1) que apresentou maior percentual de isolamento (50 %) seguida da *Salmonella* Panama (33,3 %) e da *Salmonella* Newport com 16,6 % dos isolados.

Os testes de sensibilidade aos antimicrobianos mostraram resultados preocupantes (Tabela 3). O comportamento dos isolados de carcaça de frango frente à ação de antimicrobianos demonstra que todos eles apresentaram resistência a Ampicilina e Tetraciclina. Quatro isolados - *Salmonella* Panama (1) e *Salmonella* Enteritidis (3) – apresentaram resistência a Amoxicilina. Três isolados - *Salmonella*

Panama (1) e *Salmonella* Enteritidis (2) – foram resistentes a Sulfonamida, enquanto que apenas um isolado de *S. Enteritidis* apresentou resistência a Amicacina e um isolado de *S. Panama* apresentou resistência a Norfloxacin.

Tabela 3 – Comportamento de sorovares de *Salmonella* isoladas de carcaças obtidas na indústria e comércio de Fortaleza, Ceará, Brasil, frente à ação de antimicrobianos

<i>Salmonella</i>	Nº de amostras	Resistência aos seguintes antimicrobianos									
		AM (10)	TT (30)	AMO (10)	AMI (30)	GEN (10)	NET (30)	SUL (300)	NOR (10)	CLO (30)	CAR (100)
Panama	2	2	2	1	-	-	-	1	1	-	-
Newport	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-
Enteritidis	3	3	3	3	1	-	-	2	-	-	-
Total (%)	100,0	100,0	100,0	66,7	16,7	-	-	50,0	16,7	-	-

AM – Ampicilina TT – Tetraciclina AMO – Amoxicilina AMI – Amicacina GEN – Gentamicina
NET – Netilmicina SUL – Sulfonamidas NOR – Norfloxacina CLO – Cloranfenicol CAR - Carbenicilina

7.2 ISOLAMENTO DE ENTEROBACTÉRIAS DE FEZES E CARÇAÇAS DE FRANGOS DE CORTE

Paralela à pesquisa de *Salmonella*, foi realizada a identificação de outras bactérias da família *Enterobacteriaceae*, quanto ao gênero, presentes nas fezes e em carcaças de frango. Para SUZUKI (1994), o amadurecimento do sistema imune e a instalação gradual da microbiota intestinal impedem a colonização do trato digestório por microrganismos patogênicos. Alguns autores têm demonstrado que enquanto a grande maioria das enterobactérias é inibida com o aumento da idade das aves, outras, no entanto, são isoladas mais freqüentemente.

Os resultados obtidos evidenciaram a presença de enterobactérias presentes nas fezes e nas diversas categorias de carcaças prontas para a comercialização. Através das provas bioquímicas, foi possível identificar as seguintes enterobactérias: *Proteus* sp., *Arizona* sp., *Enterobacter* sp., *Citrobacter* sp., *Pseudomonas* sp., *Edwardsiella* sp., *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp. e *Shigella* sp. Pode-se observar na tabela 4, que houve uma variação quanto à identificação do número de bactérias entre as diversas categorias de amostras analisadas.

Tabela 4. Frequência de isolamento de enterobactérias em amostras fecais e amostras de carcaças de frangos de corte prontas para a comercialização em Fortaleza, Ceará, Brasil.

ENTEROBACTÉRIAS	FEZES (30 Amostras*)	CARÇAÇAS RECÉM- ABATIDAS (14 Amostras)	CARÇAÇAS RESFRIADAS (18 Amostras)	CARÇAÇAS CONGELADAS (19 Amostras)
	N / %	n / %	n / %	n / %
<i>Proteus</i> sp.	26 / 86,7	13 / 92,9	11 / 61,1	10 / 52,6
<i>Arizona</i> sp.	2 / 6,7	-	-	-
<i>Enterobacter</i> sp.	20 / 66,7	4 / 28,6	2 / 11,1	2 / 10,5
<i>Citrobacter</i> sp.	2 / 6,7	-	-	1 / 5,3
<i>Pseudomonas</i> sp.	2 / 6,7	-	-	2 / 10,5
<i>Edwardsiella</i> sp.	1 / 3,3	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	18 / 60	10 / 71,4	9 / 50,0	5 / 26,3
<i>Klebsiella</i> sp.	2 / 6,7	-	3 / 16,7	3 / 15,8
<i>Shigella</i> sp.	4 / 13,3	2 / 14,3	1 / 5,6	-

n= número de amostras isoladas

% = Percentual de amostras positivas

* = Amostras analisadas

Diante desses resultados pode-se observar uma ligeira queda no número de isolamentos, salientando que as carcaças de frangos recém - abatidas ainda possuem uma elevada carga microbiana, demonstrado pelo alto percentual de contaminação em alguns gêneros de bactérias como: *Proteus* sp.; *Escherichia coli* e *Shigella* sp. e *Enterobacter* sp. Esse resultado, possivelmente, tem como causa a falta de controle sanitário presente nos estabelecimentos de abate, visto que esses estabelecimentos não sofriam nenhum tipo de fiscalização sanitária. A frequência de isolados das carcaças resfriadas e, mais ainda, de carcaças congeladas mostraram queda na contaminação bacteriana, excetuando-se as bactérias: *Pseudomonas* sp.; *Klebsiella* sp. e *Citrobacter* sp. como mostra a tabela 4.

8. DISCUSSÃO

A salmonelose é uma das zoonoses bacterianas mais problemáticas para saúde pública principalmente por ser sua epidemiologia bastante complexa (ZANCAN *et al.*, 2000), sendo a carne de frango um produto de alto risco, pois o sistema de produção e abate de frangos favorece a presença de *Salmonella* no produto final.

Vários são os métodos existentes para determinar a contaminação por *Salmonella* em amostras (READ *et al.*, 1994), sendo a investigação da presença das salmonelas nos lotes de aves através do exame bacteriológico das fezes um método sensível (AHO, 1992), permitindo melhores resultados, mais confiáveis, quando comparados com a pesquisa da bactéria em swabs cloacais e pesquisa de anticorpos no soro das aves (GIESSEN *et al.*, 1991), tendo a vantagem de não causar estresse nas aves e ser mais representativa.

A ausência de *Salmonella* nas 63 amostras de fezes dos lotes de frangos de corte produzidos na Região Metropolitana de Fortaleza demonstra um bom estado de higiene e manejo, estando de acordo com os registrados por MOREIRA

(2002), que não isolou *Salmonella* em pintos de um dia de idade provenientes de empresas produtoras de frangos de corte desta mesma região. No entanto, GAMA (2001) encontrou em pintainhas de poedeiras comerciais contaminação por *Salmonella* Enteritidis, sendo que ZANCAN *et. al.* (2000) encontrou *Salmonella* em 44,45 % das caixas que transportavam pintainhas destinadas à postura comercial.

O controle da infecção de aves por *Salmonella* continua sendo importantíssimo para o sucesso da avicultura industrial. Esses resultados mostram a preocupação dos técnicos que trabalham na avicultura em evitar o aparecimento de enfermidades em planteis avícolas e, de forma mais intensa, a preocupação em impedir a presença de *Salmonella* paratíficas nos rebanhos avícolas, para evitar a participação das aves em casos de infecção alimentar em seres humanos.

Com relação às amostras das carcaças de frango destinadas ao consumo humano, foram isoladas *Salmonella* nas três categorias de carcaças pesquisadas nesse experimento.

As amostras mostraram variações quanto à contaminação por *Salmonella*, porém essas diferenças, entre as formas de conservação das carcaças, não foram significativas estatisticamente ($p < 0,05$).

Como mostrado na Tabela 2, o isolamento total de *Salmonella* representado em 11,8 % é considerado alto, pois o *Codex Alimentarius* estipula a contaminação zero em 25 g de alimento analisado, entre eles aves e ovos (SANTOS *et. al.* 2000). O percentual encontrado, mesmo sendo considerado elevado, é inferior aos descritos por SANTOS *et. al.* (2000) que encontraram um índice de contaminação de 32,0 % e ARVANITIDOU *et. al.* (1998) encontraram 69,0 %. Já os percentuais (14,8 % e 9,21 %) de isolamento em carcaças encontrados por SHARMA (1992) foram similares aos obtidos por esta pesquisa.

A presença de *Salmonella* Panama (14,3 %) em carcaças de frango recém - abatidas junto com o alto índice de contaminação por SE e S. Newport em carcaças de frango resfriadas sugerem que a qualidade dos abatedouros bem como as técnicas empregadas durante o abate deverão ser revistas. NAVARRO *et. al.*

(1995) afirmam que o número de casos de toxinfecção alimentar em humanos na América Central e Sul cresceu consideravelmente, principalmente devido ao sorotipo Enteritidis (SANTOS *et. al.*, 2000). A importância do manipulador durante o abate tem sido estudada por diversos autores, pois a falta de higiene favorece a propagação de contaminantes nas superfícies das carcaças. PETHER e GILBERT (1971) analisaram o grau de eliminação de *S. Anatum* nas pontas dos dedos de voluntários, previamente contaminados. Os pesquisadores verificaram que o isolamento de *Salmonella* da polpa digital desses indivíduos, depois de lavadas as mãos com água corrente e sabão por um período de 15 segundos, sendo diretamente proporcional à população bacteriana na hora do inóculo, sendo 100 % positivas com inóculo de 10^6 e 30 % na faixa de 10^3 a 10^4 desta bactéria.

Com relação aos isolados em carcaças resfriadas, uma pertence a *Salmonella enterica* sorovar Newport e as outras duas pertencentes ao sorovar *Salmonella* Enteritidis, o que é bastante preocupante, pois trabalhos de outros pesquisadores relatam que o grande responsável hoje em dia pelas infecções alimentares em humanos ocasionadas por *Salmonella* é o sorovar Enteritidis. Resultados apresentados por COSTA *et al.* (1996) demonstraram que a contaminação de carcaça resfriada é alta e poucos são os relatos em carcaças congeladas.

SANTOS *et. al.* (2003) utilizaram 272 isolados de *S. Enteritidis*, dos quais 111 foram isolados de carcaça de frango congeladas, 126 de alimentos e material biológico de humanos envolvidos em episódios de toxinfecção alimentar humana e 35 de diferentes materiais de origem avícola, sendo o fagotipo 4 predominante entre eles.

ROBERTS (1982) observou um percentual de 80 % de contaminação em carcaça congelada, esse resultado, em conjunto com o presente trabalho, indicam a possibilidade da carcaça, mesmo congelada, veicular *Salmonella* para os seres humanos. Em contrapartida, FORSTER e MEAD (1976) afirmam que o congelamento da carcaça tende a reduzir ou prejudicar a sobrevivência das enterobactérias.

Semelhantemente aos relatos de ZANCAN *et. al.* (2000) e GAMA (2001), a *Salmonella* Enteritidis predominou entre os sorotipos isolados das carcaças. Segundo BERCHIERI Jr. e BARROW (1995), as *Salmonella*, entre elas: a SE, podem alcançar a corrente sanguínea, disseminarem-se pelo organismo animal, sendo excretadas ao ambiente em grande número pelas fezes.

Dentre os isolados tipificados (Gráfico 1) a *Salmonella* Newport teve o menor número de isolamentos. A cepa isolada que predominou neste experimento foi a *Salmonella* Enteritidis (50,0 %). Este resultado concorda com os obtidos por SANTOS *et. al.* (2003) e dados internacionais (RODRIGUES *et. al.* 1990).

KINDE *et. al.* (1997) obtiveram sete isolamentos de SE em águas oriundas de desagües das plantas de tratamento de abatedouro municipais no Estado da Califórnia dos 683 isolados de *Salmonella*. CORTINEZ *et. al.* (1995) isolaram S. Newport e S. Panama de amostras colhidas em rios da Argentina, e similarmente aos sorotipos identificados deste experimento, HOFER *et. al.* (2000), também isolaram estes sorotipos em carne de eqüideos abatidos do nordeste brasileiro.

MACHADO *et al.* (1994) encontraram, em amostras cecais, logo após o abate, 10 % de *Salmonella* e, em carcaças prontas para o consumo, 13,3 % dessa mesma bactéria em um abatedouro avícola de Santa Catarina durante os anos de 1989 e 1990.

É comum o surgimento de *Salmonella* resistentes aos antimicrobianos e este fato tem sido agravado com o uso indiscriminado de antibióticos em rações animais como promotores de crescimento. Os testes de sensibilidade aos antimicrobianos demonstraram resultados preocupantes, pois todos os isolados apresentaram resistência a ampicilina e tetraciclina com 100 % de resistência bacteriana, estando de acordo com os resultados encontrados por CORTINEZ *et al.* (1995) que observaram *Salmonella* com sensibilidade a gentamicina e cloranfenicol, o mesmo não ocorrendo com a tetraciclina. BERCHIERI JR. (1983) encontrou o percentual de resistência à tetraciclina de 77,0 % e ANTUNES *et. al.* (2003) encontraram um menor percentual de isolados resistentes a tetraciclina (36,0 %).

BOKANYI JR. *et. al.* (1990) encontraram os percentuais de 3,6 % de resistência à ampicilina e 34,5 % à tetraciclina. BOKANYI JR. *et. al.* (1990), LEE *et. al.* (1993) e NASCIMENTO *et. al.* (1997) apresentaram resultados semelhantes em relação à sensibilidade ao cloranfenicol (100,0 %). LEE *et. al.* (1993) e SANTOS *et. al.* (2000) apresentaram resultados iguais em relação à resistência total à ampicilina. Nossos resultados demonstraram que 66,7 % dos isolados apresentaram resistência a Amoxicilina, enquanto que ANTUNES *et. al.* (2003) encontraram 19 %, 19 % e 3 % de isolados de *Salmonella* em aves resistentes a amoxicilina, carbenicilina e cloranfenicol, respectivamente. A baixa porcentagem dos isolados resistentes as sulfonamidas está de acordo com resultados encontrados por ARVANITIDOU *et. al.*(1998) que registraram 19,35 % das cepas isoladas resistentes à ampicilina e poucas cepas resistentes a sulfafurazole.

Com base nos resultados, admite-se que o sistema produtivo do frango de corte criado em nossa região tem excelente qualidade microbiológica, através de alto padrão de controle sanitário e manejo, porém perdendo qualidade na etapa final, através do processo de abate para a comercialização local, faltando, neste sentido, rígido controle de qualidade da carne destinada ao consumo humano de nossa região. Os resultados do teste de sensibilidade aos antimicrobianos servem de alerta, pois o uso indiscriminado de antimicrobianos como promotores de crescimento e no tratamento de infecções tem contribuído para o crescente aumento de resistência bacteriana aos antimicrobianos.

Em relação as enterobactérias isoladas, o gênero *Proteus* foi o que apresentou maior número de isolamentos das amostras analisadas, seguido da *Escherichia coli* e do gênero *Enterobacter*. Os *Proteus* são patógenos em potencial, embora seu envolvimento com as doenças de origem alimentar ainda sejam discutíveis. No entanto, são muito importantes na deterioração dos alimentos (FRANCO e LANDGRAF, 1996). A presença desses microrganismos não está relacionada diretamente com infecções, e sim como agentes contaminantes. O *Proteus* é, por excelência, um germe envolvido com a decomposição de carcaças e pode ser encontrado tanto em fezes e águas de esgotos, como em carnes putrefeitas, feridas supuradas e outras (BIER, 1981). As bactérias do grupo *Shigella* são responsáveis pela shigelose ou disenteria bacilar, caracterizando-se por invasão

e destruição da camada epitelial da mucosa com intensa reação inflamatória (CAMPOS, 2002). Segundo FRANCO e LANDGRAF (1996), as bactérias do grupo coliformes são divididas em totais e fecais, sendo que, os coliformes totais são bactérias da família *Enterobacteriaceae* capazes de fermentar a lactose com produção de gás, quando incubados a temperatura de 35 a 37 °C, durante um período de 48 h. Fazem parte deste grupo a *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiella*, todas essas isoladas em nosso experimento. São encontradas nas fezes e em outros ambientes como vegetais e solo. Os coliformes fecais correspondem aos coliformes totais que possuem capacidade de continuar fermentando lactose com produção de gás quando incubados à temperatura de 44 a 45,5 °C. Atualmente, muitos laboratórios, estão preferindo enumerar as bactérias pertencentes à família *Enterobacteriaceae* como todo, pois as bactérias do grupo coliforme são mal definidas taxonomicamente e números falsos eram obtidos. As enterobactérias são uma família de bacilos Gram-negativos, com muitas propriedades em comum. Embora possam ser encontrados amplamente na natureza, a maioria habita o intestino do homem e dos animais, seja como membros da microbiota normal ou como agentes de infecção.

9. CONCLUSÕES

Os resultados encontrados neste estudo indicaram que os lotes de frangos de corte da Região Metropolitana de Fortaleza encontravam-se em boa qualidade quanto ao controle microbiológico de *Salmonella*. Entretanto, as carcaças de frango destinadas ao consumo humano, sendo elas recém - abatidas, resfriadas ou congeladas apresentaram índices de contaminação indicativos de má qualidade no controle microbiológico, sendo necessária a adoção de rigorosas medidas higiênico-sanitárias em abatedouros e comércio, para reduzir o percentual de carcaças de frangos de corte contaminadas por enterobactérias patogênicas e, conseqüentemente, reduzir os riscos que esses microrganismos apresentam para a saúde pública.

Embora as diferenças de contaminação por *Salmonella* entre as categorias de carcaças analisadas não tenham sido significativas, houve evidências que sugerem o menor risco de contaminação, não somente por *Salmonella*, mas também por outras enterobactérias, em carcaças congeladas.

Em relação à ação dos antimicrobianos, os isolados apresentaram maior resistência à ampicilina e à tetraciclina, e todos os isolados foram sensíveis à gentamicina, à netilmicina, ao cloranfenicol e à carbenicilina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHO, M.,. Problems of *Salmonella* sampling. **International Journal of Food Microbiology**, v 15, p. 225 – 235, 1992.

ALBUQUERQUE, R; ITO, N.M.K.; MIYAJI, C.I. Estudo comparativo de diferentes meios de cultura para o isolamento de *Salmonella* em matérias-primas e rações. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 37 n.1, 2000.

ALMEIDA, P.F.; SILVA, E.N. Estudos sobre o controle e disseminação bacteriana em carcaças de frangos de abatedouros industriais. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 44, n.2, p. 105 – 120, 1992.

ANDREATTI FILHO, R. L., SILVA, E. N., CURI, D. R. Ácidos orgânicos e microbiota cecal anaeróbica no controle da infecção experimental de frangos por *Salmonella typhimurium* e *Salmonella enteritidis*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.49, p. 661 – 672, 1997.

ANTUNES, P.; CRISTINA, R.; SOUSA, J.C.; PEIXE, L.; PESTANA, N. Incidence of *Salmonella* from poultry products and their susceptibility to antimicrobial agents. **International Journal Food of Microbiology**, v. 82, p. 97 – 103, 2003..

ARVANITIDOU, M., TSAKRIS, A., SOFIANOU, D., KATSOUYANNOPOULOS, V., Antimicrobial resistance and R-factor transfer os salmonellae isolated from chicken carcasses in Greek hospitals. **International Journal of Food Microbiology**, v. 40, p. 197-201, 1998.

BAILEY, J. S.; COX, N. A.; BLANKENSHIP, L.C.; STERN, N.J. Hatchery contamination reduces the effectiveness of competitive exclusion treatments to control *Salmonella* colonization of broiler chicks. **Poultry Science**, v. 71, (suplementt): 6. (Abst.), 1992.

BAILEY, J. S.; COX N. A.; BERANG, M. E. Hatchery - Acquired *Salmonella* in broiler chicks. **Poultry Science**, v. 73, p.1153 – 1157, 1994.

BAILEY, J.S. Controle de *Salmonella* em incubatório. In.: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2000, **Anais...** Campinas: FACTA, v 1, p. 31 – 39, 2000.

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

BARROW, P.A. *Salmonella* control-past, present and future. **Avian Pathology**, v.22, p. 651 – 669, 1993.

BARROW, P. A. *Salmonella* em avicultura – Problemas e novas idéias sobre possibilidades de controle. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v.1, p. 09 – 16, 1999.

BAUER, A.W., KIRBY W.M.M., SHERRIS, J. C. e TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal Clinic Pathology**, v. 45, p. 493 – 496, 1966.

BERCHIERI Jr., A. **Contaminação por *Salmonella* em farinhas de origem animal utilizadas no preparo de ração**. 1983, 83p, Dissertação (Mestrado), Instituição de Ciências Biomédicas, USP, São Paulo, Brasil.

BERCHIERI Jr., A; IRINO, K.; NEME, S.N.; PAULILLO, A.C.; CALZADA, C.T.; FERREIRA, S.A.; PESSOA, G.V.A. Contaminação por *Salmonella* em farinhas de origem animal utilizadas no preparo de ração. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.41, p. 83-88, 1984.

BERCHIERI Jr., A.; BARROW, P.A. Patologias e métodos diagnósticos de *Salmonella Enteritidis* em aves. In.: CONFERÊNCIA APINCO 1995 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 1995,. **Anais...** Curitiba: FACTA, p. 1 – 5,.1995.

BERCHIERI Jr, A. Salmoneloses Aviárias. In.: **Doenças das Aves**, FACTA, Campinas – SP, p. 185 – 196, 2000.

BIER, O., **Bacteriologia e Imunologia**, Melhoramentos, 21 ed, p. 517 – 531, 1981.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Portaria nº 126, de 03 de Novembro de 1995. Normas para Credenciamento e Monitoramento de Laboratórios de Diagnóstico das *Salmonella* aviárias (*S. Enteritidis*, *S. Gallinarum*, *S. Pullorum* e *S. Typhimurium*). **Plano Nacional de Sanidade Avícola**, 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 70, de 06 de outubro de 2003, que institui o Programa de Redução de Patógenos Monitoramento Microbiológico e Controle de *Salmonella* sp. em Carcaças de Frangos e Perus. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2003.

BOKANYI Jr., R., STEPHENS, J. F. e FOSTER, D.N. Isolation and characterization of *Salmonella* from broiler carcasses or parts. **Poultry Science**, v. 69, p. 592 – 598, 1990.

CAMPOS, L.C. *Salmonella*. In. TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F.; GOMPertz, O.F.; CANDEIAS, J.A.N. **Microbiologia**, Atheneu, São Paulo, 3 ed., p 229 – 234, 2002.

CASON, J. A.; BAILEY, J. S.; COX, N. A. Transmission of *Salmonella typhimurium* during hatching of broiler chicks. **Avian Diseases**, v. 38, p. 583 – 588, 1994.

CORRÊA, W.M.; CORRÊA, C.M. Paratífos em geral. In: **Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos**. 2 ed. Rio de Janeiro: MEDSI, p. 163-174, 1992.

CORTINEZ, I.J.M.; VELASQUEZ, L.D.C.; ESCUDERO, M.E.; CAFFER, M.I.; COBO, M.F.; GUZMAN, A.M.S. *Salmonella* serotypes from surface waters in San Luis, Argentina. **Revista Microbiologia**, v. 26, 180 – 185, 1995.

COSTA, F.N. **Sorotipos de *Salmonella* em carcaças e cortes de frango obtidos na indústria e no comércio e comportamento das cepas isoladas frente à ação de antimicrobianos.** 1996. 82 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Universidade Estadual Paulista (UNESP), Jaboticabal, São Paulo.

COX, N.A.; MERCURI, A.J.; TANNER, D.A.; CARSON, M.O.; THOMSON, J.E.; BAILEY J.S. Effectiveness of sampling methods for *Salmonella* detection on processed broilers. **Journal Food Protection**, v. 41, p. 341 –343, 1978.

COX, N. A.; BAILEY, J. S.; MAUDIN, J. M.; BLANKENSHIP, L. C. Presence and impact of Salmonellae contamination in the commercial integred broiler hatchery. **Poultry Science**, v. 69, p.1606 – 1609, 1990.

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, p1571 – 1574, 2000.

CUNHA NETO, S.J.; BRANT, P.C.; PESSOA, G.V.A. Sorotipos de salmonella isolados de concentrado, cama, e carcaças de frango de corte em duas granjas em Goiânia – GO. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 34, n.2, p. 337 – 344, 1982.

ELBOUX, A. N. D.; PEQUINI, M. R. S.; FERREIRA, C. S. A.; FERREIRA, A. J. P. Resistência de *Salmonella* spp. aos antimicrobianos. In.: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2002, **Anais...** Campinas: FACTA, suplemento 4, p. 114, 2002.

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

FORSTER, R.D.; MEAD, G.C. Effect of temperature and added polyphosphate on the survival of salmonellae in poultry meat during cold storage. **Journal Applied Bacteriological**, v. 41, p. 504 – 510, 1976.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo editora Atheneu, 1996.

FRAZIER, W.C.; WESTHOFF, D.C. **Microbiología de los alimentos**. Zaragoza (Espanña), editora Acribia, 1993.

GAMA, N.M.S.Q. **Salmonella spp em aves de postura comercial**. 2001. 58 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Universidade Estadual Paulista (UNESP), Jaboticabal, São Paulo.

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

GAST, R.K.; HOLT, P.S. Assessing the frequency and Consequences os *Salmonella enteritidis* deposition on the egg yolk membrane. **Poultry Science**, v. 80, p. 997 – 1002, 2001.

GIESSEN, A.W., PETERS, R., BERKERS, P.A., JANSEN, W.H., NOTERMANS, S.H. *Salmonella* contamination of poultry flocks in the Netherlands. **Veterinary Quaterly**, v.13, p. 41 – 46, 1991.

GIORGI, W. **Animais domésticos como portadores de Salmonella: significado epidemiológico e sua relação com a saúde pública**. 1972, São Paulo, 55 p. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências Biomédicas – Universidade de São Paulo.

GIRÃO, F.G.F.; NOGUEIRA, R.H.G.; OLIVEIRA, R.L.; FERREIRA, H.B. Isolamento de *Salmonella* em matérias primas, rações e materiais colhidos de aves com problemas sanitários. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.37, p.249 – 256, 1985.

HARGIS, B. M., CALDWELL, D. J., BREWER, R.L. *et al.* Evaluation of the chicken crop as a source of *Salmonella* contamination for broiler carcasses. **Poultry Science**, v. 74, p.1548 – 1552, 1995.

HENZLER, D. J. e OPITZ, H. M. The role of mice in the epizootiology of *Salmonella enteritidis* infestation on chicken layer farms. **Avian Diseases**, v. 36, p. 625 – 631, 1992.

HINTON, M. *Salmonella* infection in chicks following the consumption of artificially contaminated feed. **Epidemiology and Infection**, v. 100, p.247 – 256, 1988.

HOFER, E.; ZAMORA, M.R.N.; LOPES, A.E.; MOURA, A.M.C.; ARAÚJO, H.L.; LEITE, M.D.D.; FILHO, S.J.S.. Sorovares de *Salmonella* em carne de eqüídeos abatidos no nordeste do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 20, p 80-84, 2000.

HONG'OMBE, B. M.; SHARMA, R. N.; SKJERVE, E.; TUCHILI, L. M. Occurrence of *Salmonella enteritidis* in pooled table eggs and market ready chicken carcasses in Zambia. **Avian Diseases**, v. 43, p.597 – 599, 1999.

IZAT, A.L.; KOPER, J.M.; MCGINNIS, J.D. Incidence, number, and serotypes of *Salmonella* on frozen broiler chickens at retail. **Poultry Science**, v. 70, p. 1438 – 1440, 1991.

JOVER, F. P. **Enfermidades y Parasitos de Las Aves Domesticas**. 2ed., Ministério da Agricultura, Madrid, p. 145 – 187, 1968.

JOHNSON, D.C.; DAVID, M.; GOLDSMITH, S. Epizotiological investigation of an outbreak of pullorum disease in an integrated broiler operation. **Avian Diseases**, v.36, p. 770 – 775, 1992.

KELLER, L.H.; SCHIFFERLI D. M.; BENSON C. E.; ASLAM, S.; ECKROADE R. J. Invasion of chicken reproductive tissues and forming eggs is not unique to *Salmonella enteritidis*. **Avian Diseases**, v. 41, p. 535 – 539, 1997.

KELLEY, T. R. *et al.* Antibiotic resistance of bacterial litter isolates. **Poultry Science**, v. 77, p. 243 – 247, 1998.

KINDE, A.; ADELSON, A.; ARDANS, A.; LITTLE, E.H.; WILLOUGHBY, D., BERCHTOLD, D.; READ, D.H.; BREITMEUER, R.; KERR, D.; TARBELL, R.; HUGHES, E. Prevalence of *Salmonella* in municipal sewage treatment plant effluents in Southern California. **Avian Diseases**, v. 41, p.392 – 398, 1997.

LAX, A. J.; BARROW, P. A.; JONES, P. W.; WALLIS, T. S. Current Perspectives in Salmonellosis. **British Veterinary Journal**, v. 151, p. 351 – 377, 1995.

LEE, L.A.; THREATT, V.L.; PUHR, N.D.; LEVINE, P.; FERRIS, K.; TAUXE, R.V. Antimicrobial-resistant *Salmonella* spp. isolated from healthy broiler chickens after slaughter. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 202, p. 752 – 755, 1993.

LILLARD, H.S. Factors affecting persistence of *Salmonella* during the processing of poultry. **Journal Food Protection**. v. 52, n.11, p. 829 – 832, 1989.

MACHADO, A.A.C. **Prospecção sorológica de *Salmonella pullorum* em pombos (*Columbia livia*) capturados em granjas avícolas de Fortaleza – 2000**, 45f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias – Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, Ceará.

MACHADO, R.A., TOSIN, I., LEITÃO, M.F.F. Occurrence of *Salmonella* sp. and *Campylobacter* sp. In chickens during industrial processing. **Revista Microbiologia**, v. 25, n.4, p. 239 – 244, 1994.

MANSON, J. Panorámica general del problema de las Salmonellas a nivel mundial com referencia especial a la *Salmonella enteritidis*. In.: XXXII SYMPOSIUM DE LA SECCIÓN ESPAÑOLA DE LA WPSA, 1995. **Anais...** p 107 – 136, 1995.

METHNER, V.; AL – SHABIBI, S.; MEYER, H. Infection model for hatching chicks infected with *Salmonella enteritidis*. **Journal Veterinary Medicine**, v. 42, p.471 – 480, 1995.

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

MOREIRA, A.P.O. **Pesquisa de *Salmonella* sp. em frangos de corte de um dia de idade da Região Metropolitana de Fortaleza – CE.** 2002, 56p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil.

MOSSEL, D.A.A.; GARCIA, B.M. **Microbiologia de los alimentos.** Madri: Acribia, p. 458, 1985.

MULDER, R. W. A.W. Prevencion y Control de los Microorganismos Patogénicos en la Industria Avícola. In.: XXXII SYMPOSIUM DE LA SECCIÓN ESPAÑOLA DE LA WPSA, 1995, **Anais...** p 137 – 144, 1995.

NAKAMURA, M.; TAKAGI, M.; TAKANASHI, T.; SUZUKI, S.; SATO, S.; TAKEHARA, K. The effect of the flow of air on horizontal transmission of *Salmonella enteritidis* in chickens. **Avian Diseases**, v. 41, p. 354 – 360, 1997.

NASCIMENTO, V.P. Salmoneloses paratíficas: uma revisão e situação atual. In: SIMPÓSIO TÉCNICO DE PRODUÇÃO DE OVOS – APA, 6, 1996, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Associação Paulista de Avicultura, p. 134, 1996.

NASCIMENTO, V.P.; CARDOSO, M.O.; RIBEIRO, A.R.; SANTOS, L.R.; SILVA, A.B.; PONTES, A.P.; OLIVEIRA, S.D. Prevalência e perfis de resistência de *Salmonella* isoladas de carcaças de frango frente a antimicrobianos e desinfetantes selecionados, In: XIX CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 1997, **Anais...** Rio de Janeiro. p. 291, 1997.

NAVARRO, M.P. Infecção por *Salmonella enteritidis* em reprodutoras pesadas na América Latina. In.: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 1995, **Anais...** Curitiba. p. 7 – 16, 1995.

OLIVEIRA, S. J. De. **Salmonella**. In. Bacteriologia Especial, Sullina, Porto Alegre – RS, p 162 – 177, 1984.

OLIVEIRA, G. H., ALMEIDA, W.A. F., BERCHIERI Jr. Controle da Transmissão por Contato de *Salmonella* entre aves de exploração comercial. In.: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 1998, **Anais...** Campinas. p. 60, 1998.

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

PEREIRA, V.L.A., SILVA, G.M.; LEMOS, M. Presença de *Salmonella* em frangos de corte aparentemente sadios em unidades de criação industrial na região de São José do Vale do Rio Preto – RJ. **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias**, v. 6, n.3, p. 156 – 161. 1999.

PETHER, J.V.S.; GILBERT, R.J., The survivals of salmonellas on fingertips and transfer of the organisms to food. **Journal of Hygiene**, v. 69, p. 673 – 681, 1971.

POPPE, C. *Salmonella enteritidis* in Canadá. **Internacional Journal Food Microbiology**, v. 21, p. 1-5, 1994.

POPIEL, I.; TUMBULL, P.C.B. Passage of *Salmonella enteritidis* and *Salmonella thompson* through chick ileocaecal mucosa. **Infection and Immunity**, v. 47: p. 786 – 792, 1985.

READ, S.C., IRWIN, R.J., POPPE, C. e HARRIS, J. A comparison of two methods for isolation of *Salmonella* from poultry litter samples. **Poultry Science**, v. 73: p. 1617 – 1621, 1994.

RIBEIRO, M.G., BRITO, C.J.C., PAES, A.C., MEGID, J., PINTO, J.P.A.N. e LISTONI, F.J.P. Infecção do trato urinário em cão por *Salmonella enterica* sorotipo Enteritidis. Relato de caso. **Clínica veterinária**, v. 43, 30 – 37, 2003.

ROBERTS, T. Factors contributing to outbreaks of food poisoning in England and Wales 1970 - 1979. **Journal of Hygiene**, v.89, p. 491 – 498., 1982.

ROBERTS, T. *Salmonellosis* control : Estimated economic costs. **Poultry Science**, v. 67, p. 936 – 943, 1988.

ROCA, F.L., CIFUENTES, E. R., FELIU, M. C., LLOVERAS, A. G. e PONTES, M. P. **Higiene y Patología Aviaries**. Real Escuela de Avicultura, Barcelona, p. 59 – 73, 1991.

RODRIGUES, D. C.; TAUXE, R. V.; ROWE, B. International increase in *Salmonella enteritidis*: A new pandemic? **Epidemiology. Infection**, v. 105 p. 21 – 27, 1990.

SALLE, C.T.P.; SILVA A.B. Prevenção de Doenças/ Manejo Profilático/ Monitoria. In: BERCHIERI Jr., A e MACARI, M. **Doenças das Aves**, FACTA, Campinas – SP, p. 01 – 12, 2000.

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

SANTOS, L. R.; NASCIMENTO, V. P.; OLIVEIRA, S. D.; RODRIGUES, D. P.; REIS, E.M.F.; RIBEIRO, A.R.; FERNANDES, S.A. Phagotypes of *Salmonella enteritidis* isolated from clinical end food samples, and from broiler carcasses in southern Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 45, p. 1-4, 2003.

SATO, Y.; SATO, G; TUCHILI, L.; PANDEY, G.S.; NAKAGIMA, A.; CHIMANA, H.; SINSUNGWE, H. Status of *Salmonella gallinarum-pullorum* infections in poultry in Zambia. **Avian Diseases**, v. 41, p. 490 – 495, 1997.

SCHARR, H. Controle de *Salmonella* na União Européia. In: **CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS**, 2003, Campinas: FACTA, p. 358 - 368.

SEO, K. H.; HOLT, P. S.; GAST, R. K.; HOFACRE, C. L. Elimination of Early *Salmonella enteritidis* infection after treatment with competitive-exclusion culture and enrofloxacin in experimentally infected chicks. **Poultry Science** , v. 79, p.1408 – 1413, 2000.

SHARMA, V.D. *Salmonella* contamination of foods of animal origin. In.: **SALMONELLA AND SALMONELLOSIS SYMPOSIUM**, 1992, **Anais...** Ploufragan, França. p. 137 – 138, 1992.

SHIVAPRASAD, H. L.; TIMONEY, J. F.; MORALES, S.; LUCIO, B.; BACKER, R. C. Pathogenesis of *Salmonella enteritidis* infection in laying chickens. I studies on egg transmission, clinical signs, fecal shedding, and serologic responses. **Avian Diseases**, v. 34, p. 548 – 557, 1990.

SILVA, E.N. Salmonelose: problemas atuais de patologia aviária e saúde pública. In.: **CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS**, 1991, **Anais...**Campinas: FACTA, p. 37 - 47.

SILVA, E.N. *Salmonella enteritidis* em avicultura, o que de prático podemos fazer? In.: **CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS**, 1996, **Anais...** Campinas: FACTA, p. 207 – 210, 1996.

SILVA, E. N.; DUARTE, A. *Salmonella enteritidis* em aves: Retrospectiva da situação atual. In.: **CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS**, 2002, **Anais...** Campinas: FACTA, p. 215 – 232, 2002.

SKOV, M. N.; FELD, N. C.; CARSTENSEN, B.; MADSEN, M. The serologic response to *Salmonella typhimurium* in experimentally infected chickens, followed by an indirect lipopolysaccharide enzyme – linked immunosorbent assay and bacteriologic

examinations through a one – year period. **Avian Diseases**, v. 46, p.265 – 273, 2002.

SMITH, H. W.; TUCKER J. F. The effect of antibiotic therapy on the faecal excretion of *Salmonella Typhimurium* by experimentally infected chickens. **Journal of Hygiene**, v. 75, p. 275 – 292, 1975.

SNOEYENBOS, G. H. Pullorum Disease. In.: **Diseases of Poultry**, 9th ed. Calnek, B. W., Barnes, H. J. Beard, C. W. Reid, W. M. e Yoder, H. W p. 73 – 86, 1991.

SUZUKI, S. Pathogenicity of *Salmonella enteritidis* in poultry. **International Journal of Food Microbiology**, v. 21, p. 89 – 105, 1994.

TANNOCK, G. W.; SMITH, J.M.B. A *Salmonella* carrier state involving the upper respiratory tract of mice. **Journal of Infectious Diseases**, v. 123, p. 502 - 506, 1971.

TAVECHIO, A.T.; FERNANDES, S.A.; NEVES, B.C.; DIAS, A.M.G.; IRINO, K. Changing patterns of *Salmonella* serovars: increase of *Salmonella enteritidis* in São Paulo. Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 38: p.315 – 322, 1996.

THIAGARAJAN, D.; SAEED, A. M.; ASEM, E. K. Mechanism of transovarian transmission of *Salmonella enteritidis* in laying hens. **Poultry Science**, p . 89 – 98, 1994.

TIETJEN, M.; FUNG, D.Y.C. *Salmonellae* and food safety. **Critical Review of Microbiology**, v. 21, p. 53 – 83, 1995.

TRABULSI, L. R.; TOLEDO, M.R.F. Resistência bacteriana a drogas. In. TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O.F.; CANDEIAS, J.A.N. **Microbiologia**, Atheneu, São Paulo, 3 ed., p105 – 109, 1999.

UBA – União Brasileira de Avicultores: 2003. Dados exibidos no site: www.uba.org.br/. Acesso em 25 de Setembro de 2004.

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

ANEXOS

ARTIGO 1

Utilização de diferentes meios de cultura para o isolamento de enterobactérias em amostras fecais de frangos de corte procedentes de granjas industriais do Estado do Ceará, Brasil

Walber Feijó de Oliveira¹, William Maciel Cardoso^{2*}, Luis Carlos Lemos Marques⁴, Rosa Patrícia Ramos Salles¹, José Luiz de Castro Aguiar Filho¹, Régis Siqueira de Castro Teixeira³, Josué Moura Romão³ e Armanda Cavalcante Pinheiro Lima³

¹ Alunos do curso de Pós-graduação da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará

² Prof. Doutor da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, Brasil

³ Alunos de Graduação da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará

⁴ Unidade Laboratorial de Apoio Animal (UNILAN)/Ministério da Agricultura (MAPA) – Secção Ceará

Este artigo foi submetido ao periódico: Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias em 13 de Abril de 2004

Utilização de diferentes meios de cultura para o isolamento de enterobactérias em amostras fecais de frangos de corte procedentes de granjas industriais do Estado do Ceará, Brasil

Use of different culture medias to enterobacteria isolation in feces samples from industrial broiler flocks in Ceará State, Brazil

Walber Feijó de Oliveira¹, William Maciel Cardoso^{2*}, Luis Carlos Lemos Marques⁴, Rosa Patrícia Ramos Salles¹, José Luiz de Castro Aguiar Filho¹, Régis Siqueira de Castro Teixeira³, Josué Moura Romão³ e Armanda Cavalcante Pinheiro Lima³

¹ Alunos do curso de Pós-graduação da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará

² Prof. Doutor da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, Brasil

³ Alunos de Graduação da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará

⁴ Unidade Laboratorial de Apoio Animal (UNILAN)/Ministério da Agricultura (MAARA) – Secção Ceará

*** Autor para correspondência**

William Maciel Cardoso

Av. Rogaciano Leite, 200 Aptº 1303 Bl. Tulipe, Bairro Salinas

Cep. 60.810-000 Fortaleza – Ceará, Brasil

Fone/fax: 85 241 1307 ou 299 2760 ou 9989 47 42

e-mail: william.maciел@uol.com.br

Resumo

A pesquisa teve como objetivo isolar e comparar meios de cultura para enterobactérias provenientes de amostras fecais de frangos de corte. Utilizou-se diferentes meios de cultura para o isolamento de enterobactérias em amostras fecais de frangos de 10 lotes de granjas industriais do Estado do Ceará, Brasil, em três fases de criação (1, 25 e 45 dias). Os resultados demonstraram a presença de enterobactérias em todos os lotes em diferentes fases de criação, observando-se uma ligeira queda no número de isolamentos em relação à idade do frango. Os resultados totais das três idades foram: *Proteus* sp.(86,7%), *Enterobacter* sp.(66,7%), *Escherichia coli*(60%), *Shigella* sp.(13,3%), *Pseudomona* sp.(6,7%), *Citrobacter* sp.(6,7%) *Arizona* sp.(6,7%), *Klebsiella* sp.(6,7%) e *Edwardsiella* sp.(3,3%). A bactéria *Proteus* apresentou o maior número de isolamentos em todas as fases de criação, havendo queda apenas na fase final. O contrário ocorreu com as bactérias *Klebsiella* e *Pseudomona* que houve ligeiro aumento durante a fase final do frango. A combinação dos meios de cultivo Caldo Selenito-cistina + Agar MacConkey e Caldo Selenito-cistina + Agar Salmonella-Shigella obteve melhor taxa de isolamentos para os *Proteus*.

Abstract

This work was designed to isolate and compare culture medias to enterobacteria isolation from broiler feces samples. The enterobacteria isolation was performed using different culture medias. The feces samples belonged to ten industrial broiler flocks at three different ages (1, 25 and 45 days of age) in Ceara State, Brazil. The results showed that all analyzed broiler flocks presented enterobacteria and there was a small decrease in the rate of isolations in relation to the crescent broiler ages. The total results of isolation in the three age samples were: *Proteus* sp.(86,7%), *Enterobacter* sp.(66,7%), *Escherichia coli*(60%), *Shigella* sp.(13,3%), *Pseudomona* sp.(6,7%), *Citrobacter* sp.(6,7%) *Arizona* sp.(6,7%), *Klebsiella* sp.(6,7%) and *Edwardsiella* sp.(3,3%). The bacteria *Proteus* sp. were the most isolated in all ages, and showed a decrease in the isolation rate in the last age. However, the bacteria *Klebsiella* sp. and *Pseudomona* sp. had an increase in the isolation rate in the last age. The comparison of culture medias

showed that the samples processed with Selenite Cystine + MacConkey Agar and Selenite Cystine + Salmonella-Shigella Agar presented the best isolation rates to *Proteus sp.*

Introdução

A cadeia produtiva do frango de corte depende da biosegurança e da qualidade dos produtos que são ofertados à população, visto que esta fonte de proteína é mais acessível e barata. O intenso processamento de produtos avícolas necessita de constantes averiguações a respeito de sua qualidade microbiológica. A microbiota intestinal das aves é composta de inúmeras espécies bacterianas, formando um sistema complexo e dinâmico (Silva, 2000). Vários são os produtos de origem animal que podem ser responsáveis por surtos de infecções alimentares em humanos. Estes alimentos quando são processados inadequadamente durante a linha de abate podem ser contaminados por produtos fecais podendo muitas vezes não causar, directamente, problemas de saúde mas podem levar a uma degradação do alimento, diminuindo consideravelmente o tempo de vida de estocagem dos produtos, que do ponto de vista económico e sanitário, isto é altamente desfavorável. Robbs e Robbs (1979) com o objectivo de avaliar as condições microbiológicas de produtos cárneos comercializados no Rio de Janeiro observaram que vários produtos encontram-se contaminados com níveis acima do padrão de contaminantes aceitáveis e os índices indicadores de condições higiênico-sanitárias e contaminação fecal (coliformes totais e estreptococos fecais), revelam sempre maiores percentagens de contaminação. Quando as salmonelas estão presentes no alimento, em geral, o seu número é pequeno em relação ao restante da microflora, por conseguinte, torna-se necessário o emprego de meios de pré-enriquecimento selectivo para melhor isolamento (Carvalho e Costa, 1979).

Devido ao saprofitismo de alguns microrganismos no trato gastrintestinal das aves, vários agentes têm sido frequentemente isolados a partir do material fecal. Desta maneira, as aves têm sido consideradas como importante fonte de disseminação das bactérias intestinais para o meio ambiente e deste para o

homem, podendo a cama dos galpões conter uma população diversificada de microrganismos, alguns deles potencialmente patogênicos para o homem, aves ou ambos (Carvalho et al., 2001).

Os coliformes representados pelos gêneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Hafnia* e *Citrobacter*, fermentadores de lactose da família Enterobacteriaceae, são frequentemente utilizados como indicadores higiênico-sanitário no controle de qualidade de água e alimentos. Sabe-se, contudo, que o grupo coliforme não se comporta de maneira uniforme no que diz respeito à especificidade de habitat e tempo de sobrevivência em outros ambientes que não o trato intestinal (ICMSF, 1983).

Este trabalho teve por objectivo isolar enterobacteriaceas patogênicas presentes na criação industrial de frango de corte produzidos na Região Nordeste brasileira, bem como, comparar diferentes meios de enriquecimento e plaqueamento para o cultivo bacteriano.

Material e Métodos

Foram coletadas fezes de 10 lotes de frango de corte de granjas industriais localizadas no Estado do Ceará, em três fases de criação (01, 20 e 45 dias), totalizando 30 amostras. As colectas foram realizadas através de um “pool” de 100 amostras de fezes frescas distribuídas dentro de um galpão, acondicionadas em sacos plásticos estéreis e encaminhados ao laboratório de execução, estando desta forma, de acordo com os critérios adoptados pelo Plano Nacional de Sanidade Avícola - PNSA (Brasil/MAARA, 2002).

Para o procedimento de identificação microbiológica das enterobactérias foi utilizado o protocolo experimental que inicia-se com o pré-enriquecimento; as fezes foram pesadas e homogenizadas utilizando-se a proporção de 25 g para cada 225 mL de água peptonada tamponada a 0,1 % e incubadas à temperatura de 37 °C por um período de 24 h. Em seguida, utilizou-se o enriquecimento selectivo após a fase de pré-enriquecimento. Alíquotas de 0,1 e 1 mL dessa cultura pré-enriquecida, foram retiradas para os meios, rappaport-vassiliadis (contendo 10 mL) e selenito cistina (contendo 10 mL), respectivamente. Os tubos contendo estes meios foram incubados e em seguida semeados em placas contendo meios selectivos indicadores. Em cada uma das culturas de enriquecimento selectivo, utilizou-se uma alça de níquel-cromo onde as alíquotas foram semeadas de forma asséptica em três placas contendo os seguintes Agar: Verde-

brilhante; MacConkey e Salmonella-Shigella. A incubação foi realizada sob uma temperatura de 37°C por um período de 24 h.

A identificação presuntiva foi realizada através das culturas obtidas no plaqueamento selectivo, destas foram colhidas com auxílio de uma agulha de platina previamente flambada, amostras de cada uma das placas semeadas. Foram escolhidas entre três a cinco colônias com as mesmas características para realização das provas bioquímicas através de tubos contendo os meios Agar inclinado tríplice açúcar ferro (TSI) e Agar inclinado lisina-ferro (LIA). Para a realização da prova do Indol, foi utilizado o meio SIM (Sulfeto, Indol, Motilidade) que caracteriza as bactérias em relação a motilidade, a produção de sulfeto e a reação ao Indol. A prova do citrato também foi realizada. Todas as provas foram realizadas sob uma temperatura de incubação de 37 °C por um período de 24 h. Assim sendo, as bactérias foram classificadas quanto ao gênero de acordo com as características bioquímicas apresentadas nestas provas.

Para comparação entre os diversos tipos de meios de isolamento bacteriano foi utilizado o teste não paramétrico para análises qualitativas do Qui-quadrado.

Resultados e discussão

Os resultados obtidos evidenciaram a presença de enterobactérias em todos os lotes em diferentes fases de criação: inicial (um dia de idade), crescimento (20 dias de idade) e final (45 dias de idade). Através das provas bioquímicas foi possível identificar as seguintes enterobactérias: *Proteus* sp. (86,7%), *Arizona* sp. (6,7%), *Enterobacter* sp. (66,7%), *Citrobacter* sp. (6,7%), *Pseudomona* sp. (6,7%), *Edwardsiella* sp. (3,3%), *Escherichia coli* (60%), *Klebsiella* sp. (6,7%) e *Shigella* sp. (13,3%). Podemos observar, através da tabela 1, que houve uma variação quanto à identificação do número de bactérias entre as diversas fases de criação.

Tabela 1. Frequência de isolamento de enterobactérias em amostras fecais de dez lotes de frango de corte em três fases de criação.

BACTÉRIAS	INICIAL (1 dia de idade)		CRESCIMENTO (20 dias de idade)		FINAL (45 dias de idade)	
	nº (+)	%	nº (+)	%	nº (+)	%
<i>Proteus</i> sp.	10	100	10	100	6	60
<i>Arizona</i> sp.	1	10	1	10	0	0
<i>Enterobacter</i> sp.	7	70	8	80	5	50
<i>Citrobacter</i> sp.	1	10	1	10	0	0
<i>Pseudomona</i> sp.	0	0	0	0	2	20
<i>Edwardsiella</i> sp.	1	10	0	0	0	0
<i>Escherichia coli</i>	7	70	7	70	4	40
<i>Klebsiella</i>	0	0	0	0	2	20
<i>Shigella</i> sp.	1	10	0	0	3	30

n= número de amostras isolada

Diante destes resultados podemos observar uma ligeira queda no número de isolamentos no decorrer da idade, possivelmente devido ao crescimento da microflora intestinal das aves contribuindo para que estas sejam inibidas. Outra possível hipótese poderia estar relacionada à ação dos antibióticos utilizados nas aves como promotores de crescimento, pois segundo Silva et al. (1999), os promotores de crescimento não atuam de forma uniforme contra as bactérias. Já Suzuki (1994) afirma que o amadurecimento do sistema imune e a instalação gradual da microbiota intestinal impedem a colonização

do trato digestivo por microrganismos patogênicos. Alguns autores têm demonstrado que enquanto a grande maioria das enterobactérias é inibida com o aumento da idade das aves, outras, no entanto são isoladas mais frequentemente Suzuki (1994). A bactéria do gênero *Proteus* foi a que apresentou maior número de isolamentos em todas as fases de criação, havendo queda apenas na fase final. O contrário ocorreu com as bactérias *Klebsiella* e *Pseudomona* que houve ligeiro aumento durante a fase final de criação.

Os *Proteus* são bacilos móveis, com flagelos peritríquios. São patógenos em potencial, embora seu envolvimento com as doenças de origem alimentar ainda seja discutível, embora sejam muito importantes na deterioração dos alimentos (Franco e Landgraf, 1996). A presença destes microrganismos não está relacionada directamente com infecções, e sim como agentes contaminantes. Hobbs e Roberts (1999) citam que estas bactérias estão relacionadas às intoxicações em peixes escombróides, podendo os seres humanos apresentar sintomas como: náuseas; vômitos; inchaços ao redor dos olhos; língua e gengiva com cianose, coceiras, dor de cabeça e dificuldade respiratória. O *Proteus* é, por excelência, um germe envolvido com a decomposição de carcaças e pode ser encontrado tanto em fezes e águas de esgotos, como em carnes putrefeitas, feridas supuradas e outras (Bier, 1981). Segundo Landgraf e Franco (1996) as bactérias do grupo coliformes são divididos em totais e fecais, sendo que, os coliformes totais são bactérias da família enterobacteriaceae capazes de fermentar a lactose com produção de gás, quando incubados a temperatura de 35 a 37 °C, durante um período de 48 h. Fazem parte deste grupo a *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiella*, todas estas isoladas em nosso experimento. São encontradas nas fezes e outros ambientes como vegetais e solo. Os coliformes fecais correspondem aos coliformes totais que possuem capacidade de continuar fermentando lactose com produção de gás quando incubados à temperatura de 44 a 45,5 °C. Actualmente, muitos laboratórios, estão preferindo enumerar as bactérias pertencentes à família enterobacteriaceae como todo, pois as bactérias do grupo coliforme são mal definidas taxonomicamente e números falsos eram obtidos. As enterobactérias são uma família de bacilos gram-negativos, com muitas propriedades em comum. Embora possam ser encontrados amplamente na natureza, a maioria habita o

intestino do homem e dos animais, seja como membros da microbiota normal ou como agentes de infecção (Trabulsi e Campos, 2002).

As bactérias do grupo *Shigella* foram isoladas em quatro amostras. Estas bactérias são responsáveis pela shigelose ou desintéria bacilar, caracterizando-se por invasão e destruição da camada epitelial da mucosa com intensa reacção inflamatória (Campos, 2002). As enterobactereaceae e os lactobacillus isolados da mucosa cecal de galinhas adultas podem inibir *in vitro* o desenvolvimento de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium através de mecanismos separados (Craven e Williams, 1997).

Tabela 2. Isolamento de enterobactérias em diferentes meios de enriquecimento em 30 amostras analisadas.

Bactérias	MEIOS DE ENRIQUECIMENTO						Total (+)
	RV	SV	RM	SM	RS	SS	
<i>Proteus</i>	5 ^a	10 ^a	9 ^a	21 ^b	10 ^a	20 ^{ab}	26
<i>Arizona</i>	1 ^a	1 ^a	1 ^a	2 ^a	0 ^a	0 ^a	2
<i>Enterobacter</i>	0 ^a	0 ^a	16 ^c	8 ^{bc}	7 ^{bc}	4 ^b	20
<i>Citrobacter</i>	0 ^a	0 ^a	2 ^a	1 ^a	0 ^a	0 ^a	2
<i>Pseudomonas</i>	0 ^a	0 ^a	0 ^a	2 ^a	0 ^a	0 ^a	2
<i>Edwardsiella</i>	1 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	1
<i>Eschecherichia coli</i>	0 ^a	0 ^a	12 ^b	10 ^b	6 ^b	0 ^a	18
<i>Klebsiella</i>	0 ^a	0 ^a	0 ^a	2 ^a	1 ^a	2 ^a	2
<i>Shigella</i>	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	2 ^{ab}	4 ^b	4
TOTAL	7	11	40	46	26	30	22

a,b,c – Letras minúsculas diferentes entre as colunas expressam diferenças significativas (p< 0,05).

RV– Caldo Rappaport-vasiliadis + Agar Verde Brilhante

SV– Caldo Selenito-cistina + Agar Verde Brilhante

RM– Caldo Rappaport-vasiliadis + Agar MacConkey

SM– Caldo Selenito-cistina + Agar MacConkey

RS– Caldo Rappaport-vasiliadis + Agar Salmonella-Shigella

SS– Caldo Selenito-cistina + Agar Salmonella-Shigella

Podemos observar, na tabela 2, que para o isolamento de *Proteus* os meios SM e SS foram os que obtiveram melhor crescimento, diferindo estatisticamente (p<0,05) dos demais meios. Enquanto que para o isolamento de outras bactérias como *Arizona*, *Citrobacter*, *Pseudomonas*, *Edwardsiella* e *Klebsiella*

estes resultados não apresentaram diferenças estatísticas. Entretanto o meio SM foi o que apresentou o maior número de isolados seguidos pelos meios RM e RS, respectivamente.

Nossos resultados demonstram que poucas foram as combinações que atingiram 100% dos isolados em relação ao número total de isolamentos para cada bactéria, demonstrando a necessidade de vários meios para a determinação da qualidade microbiológica de uma amostra. Edwards e Ewing, (1972) afirmam que melhor que os resultados apresentados por um caldo sobre outro, seria a utilização combinada de mais que um deles.

Agradecimentos

A Unidade Laboratorial de Apoio Animal do Ministério da Agricultura – Seção Ceará em nome da Dra. Ana Paula Morano Marques e ao Laboratório de Patologia Animal – BIOLAB S/A – Fortaleza – Ceará.

Bibliografia

- Bier, O. (1981). Bacteriologia e Imunologia, Melhoramentos, 21ª edição, 517 – 531.
- Campos, L.C.(2002). Shigella. In: *Microbiologia*, 3ª edição. Editores: L.R. Trabulsi, F. Alterthum, O.F. Gompertz, e J.A.N. Candeias. Atheneu, São Paulo, 235 – 238.
- Carvalho, E. P. e Costa, L. C. G. (1979). Diferentes temperaturas e meios de cultura para o isolamento de *Salmonella* sp. e outras bactérias, em rações iniciais para frango de corte. *Revista de Microbiologia*, São Paulo, 10, 10 – 13.
- Carvalho, A.C.F.B., Florioto, J.F. e Schocken-Iturrino, R.P. (2001). *Campylobacter* e *Salmonella* nas fezes e em diferentes tipos de cama de frango. *ARS Veterinária*, Jaboticabal, 17, 201 – 206.
- Cox, N.A., Mercuri, A.J., Tanner, D.A., Carson, M.O., Thomson, J.E., Bailey, J.S (1978). Effectiveness of sampling methods for *Salmonella* detection on processed broilers. *Journal Food Protection*, Des Moines, 41, 341 –343.
- Craven, S.E. e Williams, D. D. (1997). Inhibition of *Salmonella typhimurium* attachment to chicken cecal mucus by intestinal isolates of enterobacteriaceae and lactobacilli. *Avian disease*, 41, 548 – 558.

- Edwards, P. R. e Ewing, W. H. (1972). Identification of Enterobacteriaceae. 3ª edição. Mineapolis (MA): Burgess Publishing Co.
- ICMSF. International Commission on Microbiological Specifications for Foods. (1983). *Microorganisms in foods*. I. Their significance and methods of enumerations. 3ª edição. Toronto: University of Toronto Press. 1983, 431p.
- Franco, B. D. G. M. e Landgraf, M. (1996). Microbiologia dos alimentos. São Paulo editora Atheneu.
- Robbs, N. K. e Robbs, P.G. (1979). Condições microbiológicas de produtos cárneos comercializados no Rio de Janeiro. *Revista de Microbiologia*, São Paulo, 10, 92-96.
- Silva, E. D. (2000). Probióticos e prebióticos na alimentação das aves. *Conferência Apinco de Ciência e Tecnologia Avícolas*, Campinas: FACTA, 241 - 251.
- Silva, N., Braga, C.E., Costa, G.M., Lobato, F.C.F. (1999). Isolamento e teste de susceptibilidade a antimicrobianos de bactérias em infecções uterinas de éguas. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 51, 213 – 216.
- Suzuki, S. (1994). Pathogenicity of Salmonella enteritidis in poultry. *International Journal of Food Microbiology*, 21, 89 – 105.
- Trabulsi, L.R. e Campos, L.C. (2002). Generalidades sobre Enterobactérias. In: *Microbiologia*, 3ª edição. Editores: L.R. Trabulsi, F. Alterthum, O.F. Gompertz, e J.A.N. Candeias. Atheneu, São Paulo, 207 – 213.

ARTIGO 2

FIRST IDENTIFICATIONS AND SUSCEPTIBILITY TO ANTIMICROBIAL AGENTS OF ISOLATED STRAINS OF *SALMONELLA SP.* FROM POULTRY PRODUCTS IN CEARA STATE, BRAZIL

Walber Feijó de Oliveira¹, William Maciel Cardoso^{2*}, Rosa Patrícia Ramos Salles¹, Josué Moura Romão³, Régis Siqueira de Castro Teixeira³, Márcia Helena Niza Ramalho Sobral¹
and Luis Carlos Lemos Marques⁴

¹ Postgraduate students in Veterinary Sciences of Ceara State University

² Professor Doctor of Veterinary Medicine Faculty of Ceara State University

³ Undergraduate students of Veterinary Medicine Faculty of Ceara State University

⁴ Veterinary of Laboratorial Unit for Animal Support from Ministry of Agriculture

**Este artigo foi submetido ao periódico: International Journal of Food
Microbiology em 27 de Outubro de 2004**

FIRST IDENTIFICATIONS AND SUSCEPTIBILITY TO ANTIMICROBIAL
AGENTS OF ISOLATED STRAINS OF *SALMONELLA SP.* FROM
POULTRY PRODUCTS IN CEARA STATE, BRAZIL

Walber Feijó de Oliveira¹, William Maciel Cardoso^{2*}, Rosa Patrícia Ramos Salles¹, Josué
Moura Romão³, Régis Siqueira de Castro Teixeira³, Márcia Helena Niza Ramalho Sobral¹
and Luis Carlos Lemos Marques⁴

***Author correspondence:**

William Maciel Cardoso

Av. Rogaciano Leite, 200 Aptº 1303 Bl. Tulipe, Bairro Salinas

Postal code. 60810-000 Fortaleza – Ceará, Brasil

Phone/Fax: 55 (085) 241 1307 or 299 2748 or 9989 4742

e-mail: william.maciел@uol.com.br and walberfo@bol.com.br

¹ Postgraduate students in Veterinary Sciences of Ceara State University

² Professor Doctor of Veterinary Medicine Faculty of Ceara State University

³ Undergraduate students of Veterinary Medicine Faculty of Ceara State University

⁴ Veterinary of Laboratorial Unit for Animal Support from Ministry of Agriculture

ABSTRACT

Abstract

The objective of this research was to perform the first isolations and verify the susceptibility to antimicrobial agents of isolated strains of *Salmonella sp.* from poultry products in Ceara State, Brazil. There were 114 samples divided in, 63 broiler carcass from two slaughterhouses and two supermarkets and 51 feces samples from broiler farms in Ceara Sate with three differents production phases and each sample consisted of a pool of 100 fresh feces. The samples were submitted to the microbiological analyses and the isolated *Salmonella* strains were submitted to antimicrobial sensitivity test. The results showed that the broiler farms in Ceara State had good sanitary status, because there was no isolation of *Salmonella* on feces samples, while the broiler carcass samples showed high contamination rates, with 11,8%. There were three serotype identification: *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis, 50 %; *Salmonella enterica* sorovar Panama 33 % and *Salmonella enterica* sorovar Newport, 17%. The susceptibility tests to antimicrobial agents presented 100% of *Salmonella* resistance against Ampicillin and Tetracycline but none against Gentamicin, Netilmicin, Carbenicillin, Chloramphenicol.

INTRODUCTION

Brazil is one of the biggest broiler producers in the world. To maintain this annual productivity it is necessary a rational growth with emphasis in the quality of the poultry products. This way, the government adopts sanitary programs with the objective of controlling diseases that promote economic and health problems. The general procedures of prophylaxis and the norms of biological security applied in all the aviculture phases (broiler grand-parent farms, broiler parent farms, commercial broiler chick farms and incubators) hinder but don't impede the presence of bacteria. Among the pathogenic microorganisms in the industrial aviculture, the genus *Salmonella* assume a big importance.

Related to public health there are *Salmonella* that cause the paratyphoid infection, like *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella infantis* and *Salmonella agona* that are considered important sources of food-borne illness. These bacteria are not related with specific diseases and are capable to infect indistinctly many species of animals, including humans (Lax *et al.*, 1995).

The importance of *Salmonella* in the public health is very significant, for example nearly 84% of food-borne human illnesses in Scotland from 1980 to 1989 (Oboegbulem *et al.*, 1993) and 81% in Italy from 1991 to 1994 (Scuderi *et al.*, 1996) were attributed to *Salmonella*. According to the Centers for Disease Control and Prevention in United States, *Salmonella* is responsible for 1,34 million of illnesses, 16,430 hospitalizations and 582 deaths each year (Mead *et al.*, 1999). The total annual cost resulting from food-borne *Salmonella* infections in United States has been estimated at up to US\$3.5 billion dollars (U.S. Department of Agriculture, 1995).

The epidemiology of *Salmonella* infections in birds is very complex (Hinton, 1988), being difficult to determine how a flock was infected or how the dissemination occurred in the flock. Hong'ombe *et al.*, (1999) identified in many situations the *S. enteritidis* in broiler

carcasses ready for market. Many authors have identified the poultry products as infection fonts of *Salmonella* that causes enteritis in humans (Dhillon *et al.*, 2001). Approximately 10% of salmonellosis cases are caused by poultry meat and in the United States exists between 15 to 20 cases of salmonellosis to each 100,000 people (Bryan and Doyle, 1995). According to Skov *et al.*, (2002) the number of diagnosed cases of salmonellosis in humans from Denmark increased in the last decade, and the serotypes *S. enteritidis* and *S. typhimurium* were more commonly isolated.

The principal outbreaks of human salmonellosis have been characterized due to consume of incorrectly managed aliments in restaurants and institutional kitchens. The incorrect cooking of aliments, the slow freezing, the maintenance of aliments for many hours without refrigeration have been demonstrated as factors that contribute to the appearance of disease in humans (Costa, 1996).

It is possible to find reports related to detection and outbreaks of salmonellosis in broiler carcasses and aliments with egg contents, in spite of the programs of Brazilian Agriculture Ministry to the control of poultry pathogens. There are factors related with these isolations and the principal are the incorrect management of many companies, the epidemiologic complexity of *Salmonella* and the insufficiency of sanitary fiscalization during the production and commercialization phases of products of animal origin. However, studies related to contamination with *Salmonella* in chickens are practically inexistent in our region.

In that respect, it is necessary the constant monitoring of the sanitary quality of birds for human consume in Ceará State, Brazil. This way, the objective of this research was the isolation and identification of *Salmonella* serotypes in production and commercialization phases of broilers and verification of behavior of the *Salmonella* spp. strains in relation to the use common antimicrobial drugs.

MATERIALS AND METHODS

Samples of production phase

The feces collection occurred in 21 flocks of broilers at three breeding ages: initial (1 day of age), growth (20 days) and final (45 days), totaling 63 samples, from poultry companies in Ceara State. Each sample consisted of a pool of 100 fresh feces collected, randomly, from the commercial broiler houses. The collected samples were maintained in sterile plastic sacks and were sent to the analyses laboratory, according to the criteria adopted by the National Program of Poultry Sanity-PNSA (Brasil/MAARA, 2002).

Samples of broilers for consume

The broiler carcasses were collected from commercial points, and were divided in the following categories: fresh carcasses (14 samples), from two slaughter-houses without federal sanitary fiscalization being collected seven samples from each one; refrigerated carcasses (18 samples), being ten from “RA” company and eight from “RB” company and frozen carcasses (19 samples), being ten samples from “CA” company and nine from “CB” company.

Microbiological analysis

The feces samples (in production phase) and the carcasses (for consume) were collected randomly at normal days of management, slaughter and commercialization. To the feces analyses 25 g were diluted in 225 mL of buffered peptone water at 0.1 % and the carcass samples were submitted to the method “carcass wash”, through the addition of 300 mL of buffered peptone water at 0.1 % described by Cox *et al.*, (1978). The solutions that belonged from this method were transferred to Erlenmeyers.

The bacterial culture followed the norms stipulated by National Program of Poultry Sanity (Brasil/ MAARA, 2002) with some modifications. The protocol began with preenrichment: the solutions resulting from the process “carcass wash” were incubated at 37 °C for 24 hours. Later, aliquots from preenrichment were inoculated in selective enrichment liquid media in ratio of 1/100 in Rappaport-vassiliadis broth and 1/10 in Selenite-Cysteine broth. A loopful of each broth was streaked on plates of Brilliant Green agar, MacConkey agar and *Salmonella-Shigella* agar. The temperature and the period of incubation were standardized at 37 °C for 24 hours, respectively for all the stages.

From each plate two or three suspected colonies of *Salmonella* were collected for presumptive identification by biochemistry tests. The media utilized for presumptive identification were: Triple Sugar Iron agar inclined (TSI); Lysine-Iron agar inclined (LIA); Sulfur Indol Motility (SIM) and the Citrate test. They were incubated at 37 °C for 24 hours.

The colonies with biochemistry profile of *Salmonella* were submitted to serologic tests using polyvalent sera against O and H *Salmonella* antigens. The colonies that agglutinated during the period of one to two minutes were considered positive for *Salmonella* and were conserved in Nutrient agar. Isolates were sent to Adolfo Lutz Institute in São Paulo city, Brazil, for complete identification and serotyping.

Antimicrobial sensitivity test

The behavior of all the strains isolated of *Salmonella* sp. was verified in relation to the action of antimicrobial drugs. The strains were submitted to sensitivity tests according to the BAUER-KIRBY method (Bauer *et al.*, 1966).

Each one of the strains was inoculated in BHI (brain and heart infusion) broth and after 24 hours of incubation at 37 °C they were screened through sterile swabs on plates with Mueller-Hinton agar.

The plates were maintained in environment temperature for a period of five minutes and later the diffusion disks with antimicrobial drugs were distributed on the plates and incubated for 24 hours at 37 °C. The antimicrobial drugs were: Ampicillin (10 µg); Amoxicillin (10 µg); Amikacin (30 µg); Norfloxacin (10 µg); Tetracycline (30 µg); Chloramphenicol (30 µg); Netilmicin (30 µg); Gentamicin (10 µg); Sulfonamide (300 µg) e Carbenicillin (100 µg).

The interpretation of results were done by measuring inhibition zones with the use of a millimeter scale rule. The results were presented as resistant or sensitive according to *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS, 2000).

Statistical Analysis

To comparison of the companies and the categories was applied the non parametric test to qualitative analysis Chi-squared (χ^2) considering as statistic difference a probability of 5% ($p < 0.05$).

RESULTS

The presence of *Salmonella spp.* was investigated in feces samples of 21 flocks from three production phases, totaling 63 samples. There was no isolation in this experimental phase, evidencing that the analyzed flocks were free of *Salmonella* infection.

There was *Salmonella* isolation in all categories of analyzed broiler carcasses to human consume, as shown in Table1.

Table 1 – Isolation and typifying of *Salmonella* from broiler carcasses

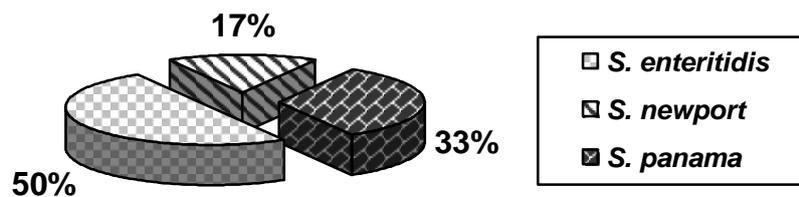
Carcasses	Isolation (%)	Samples (n)	Isolated strains (n)
Fresh	2 (14.3)	14	<i>S. panama</i> (2)
Refrigerated	3 (16.7)	18	<i>S. newport</i> (1); <i>S. enteritidis</i> (2)
Frozen	1 (5.26)	19	<i>S. enteritidis</i> (1)
Total	6 (11.8)	51	

n- number of samples

Without statistic difference ($p < 0.05\%$)

Among the samples of fresh carcasses there was isolation of *Salmonella panama* (14.3%). The findings related to refrigerated carcasses showed the high rate of contamination with *Salmonella enteritidis* and *Salmonella newport* (16.7%). The lowest rate of isolation was in frozen carcasses, with the isolation of *Salmonella enteritidis* (5.26%).

There was variance of *Salmonella* contamination among the carcasses samples, however these differences were not statistic significant ($p < 0.05\%$).

Graphic 1- Percentage of *Salmonella* isolated strains from broiler carcasses

Among the isolated strains, *Salmonella enteritidis* presented the highest rate of isolation (50%), followed by *Salmonella panama* (33.3%) and *Salmonella newport* (16.6%).

The results of antimicrobial sensibility tests are in Table 2. The behavior of the isolated strains from broiler carcasses in relation to the action of antibiotics shows that all the isolated strains present resistance against Ampicilina and Tetraciclina. Four isolates:

Salmonella panama (1) and *Salmonella enteritidis* (3) presented resistance to Amoxycillin. Three isolates: *Salmonella panama* (1) and *Salmonella enteritidis* (2) were resistant to Sulfonamide, while just one isolate of *Salmonella enteritidis* presented resistance to Amikacin and one isolate of *Salmonella panama* presented resistance to Norfloxacin.

Table 2 - Antimicrobial sensibility test to *Salmonella* strains isolated from broiler carcasses

<i>Salmonella</i>	N° of samples	Resistance to antibiotics (µg)									
		AMP (10)	TET (30)	AMO (10)	AMI (30)	GEN (10)	NET (30)	SUF (300)	NOR (10)	CHL (30)	CAR (100)
Panamá	2	2	2	1	-	-	-	1	1	-	-
Newport	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-
Enteritidis	3	3	3	3	1	-	-	2	-	-	-
Total (%)	100,0	100,0	100,0	66,7	16,7	-	-	50,0	16,7	-	-

Legend: AMP – Ampicillin, AMO – Amoxycillin, AMI – Amikacin, NOR – Norfloxacin, TET – Tetracycline, CHL – Chloramphenicol, NET – Netilmicin, GEN – Gentamicin, SUF – Sulfonamide, CAR – Carbenicillin

DISCUSSION

Salmonella is one of the most important sources of food-borne illness to human health, principally for the complexity of Salmonellosis epidemiology (Zacan *et al.*, 2000). The broiler meat is a product of high risk, according to Berchieri, (2000) the production system and the broiler slaughter facilitate the presence of *Salmonella* in the final product.

There are many methods to verify the contamination of *Salmonella* in samples (Read *et al.*, 1994). The bacterial analysis of feces is a sensitive test (Aho, 1992) and present better results when compared to the methods through the utilization of cloacal swabs and antibody research in avian serum, and there is an advantage that does not cause stress and is more representative (Giessem *et al.*, 1991).

The absence of *Salmonella* in the 63 samples of feces from broiler flocks in Ceará State shows the good management and hygiene, these results are agreeing with Moreira, (2002), that did not found *Salmonella* in 1 day old broiler chicks from poultry companies in the same region. However, Gama (2001) found *Salmonella enteritidis* contamination in commercial layer chicks and Zancan (2000) verified 44.45% of *Salmonella* contamination in the transport boxes of commercial layer chicks.

Regarding the broiler carcasses samples, there were isolations in all kinds of carcasses analyzed in this experiment, as shown in Table 1.

Among the fresh carcasses, there was the isolation of *Salmonella panama* (14.3%). The findings related to refrigerated carcasses demonstrated high level of contamination (16.7%) with *Salmonella enteritidis* and *Salmonella newport*. The lower rate of contamination occurred in frozen carcasses (5.26%) with the isolation of *Salmonella enteritidis*.

The total rate of *Salmonella* isolations in broiler carcasses was 11.8% and is considered high, because the *Codex Alimentarius* stipulates 0% of contamination to 25 g of analyzed food, including poultry meat and eggs (Santos *et al.*, 2000). This percentage is inferior to the results described by Santos *et al.* (2000) with 32% of contamination, by Machado and Bernardo (1990) with 57% of contamination, by Plummer *et al.* (1995) with 23% and Arvanitidou *et al.* (1998) with 69%. Our results are similar to the percentage verified by Sharma (1992) with 14.8% and 9.21% of contamination on broiler carcasses. However our results are superior to the results reported by Verde *et al.*, (2003) that found 3.6% of *Salmonella* contamination on broiler carcasses and the U.S. Department of Agriculture that reported that the national pathogen-reduction program reduced the incidence of *Salmonella* contamination on broiler carcasses to less than 10% in 2000 (U.S. Department of Agriculture, Food Safety and Inspections Service, 2000).

The presence of *Salmonella panama* (14.3%) in fresh broiler carcasses and the high rate of *Salmonella enteritidis* and *Salmonella newport* in refrigerated broiler carcasses supposes that the slaughter process must be observed. Navarro (1995) affirms that the number of food-borne disease increased considerably in Central and South America, principally by *Salmonella enteritidis* (Santos *et al.*, 2000). The importance of the responsible slaughter manipulator has been studied for many authors, because the lack of hygiene favors the dissemination of contamination of broiler surfaces. Pether and Gilbert, (1971) analyzed the level of dissemination of *Salmonella anatum* from the extremity of fingers from human volunteers previously infected. They verified that the isolation of *Salmonella* from the finger extremity of these people was direct proportional to the inoculated bacterial population, the results were 100% positive to 10^6 bacteria inoculated and 30% to the interval of 10^3 to 10^4 bacteria inoculated.

Among the three isolated strains in refrigerated carcasses, one was *Salmonella newport* and the other two were *Salmonella enteritidis*, and that is dangerous, because many authors report that *Salmonella enteritidis*, among the genus *Salmonella*, is the principal source of food-borne disease (Ferris *et al.*, 1999; Rodrigue *et al.*, 1990; Plummer *et al.*, 1995; Banatvala *et al.*, 1999). According to Costa *et al.*, (1996) there are high levels of contamination on refrigerated carcasses and there are few reports about *Salmonella* in frozen carcasses.

Santos *et al.*, (2002) verified that from 272 isolates of *Salmonella*, 111 were in frozen carcasses, 126 in food and biological human material involved with cases of food-borne diseases and 35 in different poultry materials, and the phagetype 4 was the most prevalent.

Roberts (1982) observed a percentage of 80% of contamination in frozen carcasses. This result and our experiment are indicative of the possibility of broiler carcasses, even

frozen, disseminate *Salmonella* to humans, however Foster and Mead (1976) affirm that the carcass freezing decreases or prejudices the survival of the family *Enterobacteriaceae*.

Among the strains isolated and characterized (Graphic 1) the *Salmonella newport*, has the lowest rate of isolation in broiler carcasses. According to Uyttendaele *et al.*, (1998) *Salmonella newport* was the most prevalent *Salmonella* isolated in turkeys, and this serotype is not commonly isolated from chickens (Bokanyi *et al.*, 1990; Ferris *et al.*, 1999; Poppe *et al.*, 1998). *Salmonella enteritidis* was the most prevalent isolate in this experiment (50%). This result is agreeing with Santos (2003) and Rodrigues *et al.* (1990).

Kinde *et al.*, (1997) verified seven isolates of *Salmonella enteritidis* from 683 isolated strains in the water coming from slaughter-house in districts of California State. Other contamination fonts were described by other authors, like Cortinez *et al.*, (1995) that isolated *Salmonella newport* and *Salmonella panama* from samples of water from rivers in Argentina and Hofer *et al.*, (2000) isolated these serotypes from equine meat in the Northeast Region of Brazil.

It is common the appearance of *Salmonella* strains resistant to antibiotics and that can be consequence of the large use of antibiotics on feed as growth promoters. The antimicrobial sensibility tests in this experiment showed dangerous results, because all the isolates presented resistance to Ampicillin and Tetracycline with 100% of bacterial resistance. These results are agreeing to the findings of Cortinez *et al.* (1995) that observed strains with sensibility to Gentamicin and Chloramphenicol and with sensibility to Tetracycline. Berchieri *et al.*, (1983) verified 77% of resistance to Tetracycline and Antunes *et al.*, (2003) found 36% of *Salmonella* strains resistant to Tetracycline. Bokanyi *et al.*, (1990), Lee *et al.*, (1993) and Nascimento *et al.*, (1997) showed similar results with 100% of sensibility to Chloramphenicol. Lee *et al.*, (1993) and Santos *et al.*, (2000) presented similar results with 100% of resistance to Ampicillin. Our results showed that 66.7% of isolates had resistance to

Amoxicillin, while Antunes *et al.*, (2003) found 19%, 19% and 3% of resistance to Amoxicillin, Carbenicillin and Chloramphenicol, respectively. The low isolation rates of *Salmonella* strains resistant to sulfonamide are agreeing with Arvanitidou *et al.*, (1998) that verified 19.35% of resistance to Ampicillin and few strains were resistant to sulfafurazole.

According to the results, the broilers produced in Ceará State had good microbiological quality during the production phase, however in the meat processing and commercialization we observed a decrease of microbiological quality of poultry products analyzed in this experiment. Regarding to antimicrobial sensibility tests, the results are worrying, because 100% of isolates were resistant to Ampicillin and Tetracycline.

ACKNOWLEDGES

The authors wish to acknowledge UNILAN (Animal Laboratorial Unit from Ceará Sate) and MAPA (Ministry of Agriculture from Ceará Sate) for their technical and instrumental collaboration, the Adolfo Lutz Institute for the typifying of *Salmonella* strains and the Veterinary Doctor Ana Paula Francisca A. R. M. for her teachings and friendship.

REFERENCES

- Aho, M., 1992. Problems of *Salmonella* sampling. *International Journal of Food Microbiology* 15, 225 – 235.
- Antunes, P., Cristina, R., Sousa, J.C., Peixe, L., Pestana, N., 2003. Incidence of *Salmonella* from poultry products and their susceptibility to antimicrobial agents. *International Journal Food of Microbiology* 82, 97 – 103.
- Arvanitidou, M., Tsakris, A., Sofianou, D., Katsouyannopoulos, V., 1998. Antimicrobial resistance and R-factor transfer os salmonellae isolated from chicken carcasses in Greek hospitals. *International Journal of Food Microbiology* 40, 197-201.
- Bokanyi, R.P., Stephens, J.F., Foster, D.N., 1990. Isolation and characterization of *Salmonella* from broiler carcasses or parts. *Poultry Science* 69, 592 – 598.
- Bryan, F.L., Doyle, M.P., 1995. Health risks and consequences of *Salmonella* and *Campylobacter jejuni* in raw poultry. *Journal of Food Protection* 58, 326– 344.
- Dhillon, A.S., Shivaprasad, H.L., Roy, P., Alisantosa, B., Schaberg, D., Johnson, S., 2001 Pathogenicity of Environmental Origin *Salmonella* in Specific Pathogen – Free Chicks. *Poultry Science* 80, 1323 – 1328.
- Banatvala, N., Cramp, A., Jones, I.R., Feldman, R.A. 1999. Salmonellosis in North Thames (East), UK: Associated risk factors. *Epidemiology and Infection* 122, 201-207.
- Bauer, A.W., Kirby, W.M.M., Sherris, J.C., Turck, M., 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal Clinic Pathology* 45, 493 – 496.
- Berchieri, A.J., 1983. Contaminação por *Salmonella* em farinhas de origem animal utilizadas no preparo de ração. Master Dissertation. Instituição de Ciências Biomédicas, USP, São Paulo, Brasil, 83p.
- Berchieri, A J., 2000. Salmoneloses Aviárias. In: Berchieri, A.J., Macari, M. (Eds), *Doenças das Aves*, FACTA, Campinas – SP. 185 – 196.
- Bokanyi, R.P.Jr., Stephens, J.F., Foster, D.N. 1990. Isolation and characterization of *Salmonella* from broiler carcasses or parts. *Poultry Science* 69, 592 – 598.
- BRASIL. 2002. Normas para Credenciamento e Monitoramento de Laboratórios de Diagnóstico das Salmonelas aviárias (*S. Enteritidis*, *S. Gallinarum*, *S. Pullorum* e *S. Tyhimurium*). Ministério da Agricultura e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Portaria nº 126, de 03 de Novembro de 1995.. Plano Nacional de Sanidade Avícola.
- Cortinez, I.J.M., Velasquez, L.D.C., Escudero, M.E., Caffer, M.I., Cobo, M.F., Guzman, A.M.S., 1995. *Salmonella* serotypes from surface waters in San Luis, Argentina. *Revista Microbiologia São Paulo* 26, 180 – 185.

- Costa, F.N., 1996. Sorotipos de *Salmonella* em carcaças e cortes de frango obtidos na indústria e no comércio e comportamento das cepas isoladas frente à ação de antimicrobianos. 82 p. Master dissertation. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Universidade Estadual Paulista (UNESP), Jaboticabal, São Paulo, Brasil.
- Cox, N.A., Mercuri, A.J., Tanner, D.A., Carson, M.O., Thomson, J.E., Bailey, J.S., 1978. Effectiveness of sampling methods for *Salmonella* detection on processed broilers. *Journal Food Protection*, Des Moines. 41, 341 –343.
- Ferris, K.E., Fisher, S.D., Flugrad, B.R., Timm, J.M. 1999. *Salmonella* serotypes from animals and related sources reported during July 1998 – June 1999. Proc 103rd Ann Meet U.S. Anim Health Assoc. U.S. Animal Health Association: Richmond, VA, 488 – 507.
- Forster, R.D., Mead, G.C. 1976. Effect of temperature and added polyphosphate on the survival of salmonellae in poultry meat during cold storage. *Journal of Applied Bacteriology* 41, 504 – 510.
- Gama, N.M.S.Q., 2001. *Salmonella* spp em aves de postura comercial. Master dissertation. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Universidade Estadual Paulista (UNESP), Jaboticabal, São Paulo. Brasil. 58 p.
- Giessen, A.W., Peters, R., Berkers, P.A., Jansen, W.H., Notermans, S.H., 1991. *Salmonella* contamination of poultry flocks in the Netherlands. *Veterinary Quarterly* 13, 41 – 46.
- Hinton, M., 1988. *Salmonella* infection in Chicks Following the Consumption of Artificially Contaminated Feed. *Epidemiology and Infection* 100, 247 – 256.
- Hofer, E., Zamora, M.R.N., Lopes, A.E., Moura, A.M.C., Araújo, H.L., Leite, M.D.D., Filho, S.J.S., 2000. Sorovares de *Salmonella* em carne de equídeos abatidos no nordeste do Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 20, 80-84.
- Hong'ombe, B.M., Sharma, R.N., Skjerve, E., Tuchili, L.M., 1999. Occurrence of *Salmonella enteritidis* in Pooled Table Eggs and Market Ready Chicken Carcasses in Zambia. *Avian Diseases* 43, 597 – 599.
- Kinde, A., Adelson, A., Ardans, A., Little, E.H., Willoughby, D., Berchtold, D., Read, D.H., Breitmeuer, R., Kerr, D., Tarbell, R., Hughes, E., 1997. Prevalence of *Salmonella* in Municipal Sewage Treatment Plant Effluents in Sourthern California. *Avian Disease* 41, 392 – 398.
- Lax, A.J., Barrow, P.A., Jones, P.W., Wallis, T.S., 1995. Current Perspectives in Salmonellosis. *British Veterinary Journal* 151, 351 – 377.
- Lee, L.A., Threatt, V.L., Puhr, N.D., Levine, P., Ferris, K., Tauxe, R.V., 1993. Antimicrobial-resistant *Salmonella* spp. isolated from healthy broiler chickens after slaughter. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 202, 752 – 755.
- Machado, J., Bernardo, F. 1990. Prevalence of *Salmonella* in chicken carcasses in Portugal. *Journal of Applied Bacteriology* 69, 477 - 480.

- Mead, P.S., Slutsker, L., Diet, V., McCaig, L.F., Bresee, J.S., Shapiro, C., Griffin, P.M., Tauxe, R.V. 1999. Food-related illness and death in the United States. *Emerging Infectious Diseases* 5, 607 – 625.
- Moreira, A.P.O., 2002. Pesquisa de *Salmonella* sp. em frangos de corte de um dia de idade da Região Metropolitana de Fortaleza – CE. Master dissertation. Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias – UECE. Fortaleza, CE, Brasil. 56p.
- Nascimento, V.P., Cardoso, M.O., Ribeiro, A.R., Santos, L.R., Silva, A.B., Pontes, A.P., Oliveira, S.D., 1997. Prevalência e perfis de resistência de *Salmonella* isoladas de carcaças de frango frente a antimicrobianos e desinfetantes selecionados, In: XIX Congresso Brasileiro de Microbiologia, Rio de Janeiro, Brasil p. 291.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2000. MIC Testing – Supplemental tables. M100 – S10 (M7). NCCLS, Weyne, Pa.
- Navarro, M.P., 1995. Infecção por *Salmonella enteritidis* em reprodutoras pesadas na América Latina. In: Conferência APINCO 1995 de Ciência e Tecnologia Avícolas, Curitiba, Paraná, Brasil. 7 – 16.
- Oboegbulem, S.I., Collier, P.W., Sharp, J.C.M., Reilly, W.J. 1993. Epidemiological aspects of outbreaks of food-borne salmonellosis in Scotland between 1980 and 1989. *Revue scientifique et technique* 12,957 – 967.
- Pether J.V.S., Gilbert, R.J. 1971. The survivals of salmonellas on fingertips and transfer of the organisms to food. *The Journal of Hygiene* 69, 673-681.
- Plummer, R.A.S., Blissett, S.J., Dodd, C.E.R., 1995. *Salmonella* contamination of retail chicken products sold in UK. *Journal of Food Protection* 58, 843 – 846.
- Poppe, C., Duncan, C.L., Mazzocco, A. 1998. *Salmonella* contamination of hatching and table eggs: a comparison. *Canadian Journal of Veterinary Research* 62, 191 – 198.
- Read, S.C., Irwin, R.J., Poppe, C., Harris, J., 1994. A comparison of two methods for isolation of *Salmonella* from poultry litter samples. *Poultry Science*. 73, 1617 – 1621.
- Roberts, T., 1982. Factors contributing to outbreaks of food poisoning in England and Wales 1970 - 1979. *The Journal of Hygiene* 89, 491 – 498.
- Rodrigues, D.C., Taxue, R.V., Rowe, B., 1990. International increase in *Salmonella enteritidis*: A new pandemic? *Epidemiology and Infection* 105, 21 – 27.
- Scuderi, G., Fantasia, M., Filetici, E., Anastásio, M.P. 1996. Foodborne outbreaks caused by salmonella in Italy, 1991 – 1994. *Epidemiology and Infection* 116, 257 – 265.
- Santos, D.M.S., Berchieri, A.J., Fernandes, S.A., Tavechio, A.T., Amaral, L.A., 2000 *Salmonella* em Carcaças de Frango Congeladas. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 20, 39-42.

- Santos, L.R., Nascimento, V.P., Oliveira, S.D., Rodrigues, D.P., Reis, E.M.F., Ribeiro, A.R., Fernandes, S.A. 2003. Phagetypes of *Salmonella enteritidis* isolated from clinical and food samples, and from broiler carcasses in southern Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 45(1), 1-4.
- Sharma, V.D., 1992. *Salmonella* contamination of foods of animal origin. In: *Salmonella and Salmonellosis Symposium*, Ploufragan, França. 137 – 138.
- Skov, M.N., Feld, N.C., Carstensen, B., Madsen, M., 2002. The Serologic Response to *Salmonella typhimurium* in Experimentally Infected Chickens, Followed by an Indirect Lipopolysaccharide Enzyme – Linked Immunosorbent Assay and Bacteriologic Examinations Through a One – Year Period. *Avian Diseases*. 46, 265 – 273.
- U. S. Department of Agriculture. 1995. Pathogen reduction; hazard analysis and critical control point (HACCP) systems. *Fed Reg* 60, 6774 – 6889.
- U. S. Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service. 2000. Interim progress report on *Salmonella* testing of raw meat and poultry products. Washington, D.C.
- Uyttendaele, M.R., Debevere, J.M., Lips, R.M., Neyts, K.D., 1998. Prevalence of *Salmonella* in poultry carcasses and their products in Belgium. *International Journal of Food Microbiology*. 40, 1 – 8.
- Verde, J.C.L., Bezerra, F.S.B.C., Soares, M.I.M., Brito, E.C.O., Santos, C.D., 2003. Monitoramento de *Salmonella* em carcaça de frango coletados em diversos estabelecimentos comerciais da cidade de Fortaleza do Estado do Ceará, Brasil. In: XIII Encontro Nacional de Analistas de Alimentos. p. 164.
- Zancan, F.T., Berchieri, A.J., Fernandes, S.A., Gama, N.M.S.Q., 2000. *Salmonella* investigation in transport boxes of day-old birds. *Brazilian Journal of Microbiology*. 31, 230 – 232.

FOTOS

FOTOS



Foto 1 - Meios de enriquecimento seletivo (Selenito Cistina e Rappaport Vassiliadis)



Foto 2 - Agar Verde-brilhante: **a** – positivo para *Salmonella*, **b** – negativo para *Salmonella*



Foto 3 - Prova do TSI