

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

ADONAI ARAGÃO DE SIQUEIRA

**AVALIAÇÃO DA TRANSMISSÃO E CONTAMINAÇÃO DE
CODORNAS JAPONESAS (*COTUNIX JAPONICA*) POR *SALMONELLA*
PULLORUM**

FORTALEZA

2009

ADONAI ARAGÃO DE SIQUEIRA

AVALIAÇÃO DA TRANSMISSÃO E CONTAMINAÇÃO DE CODORNAS JAPONESAS
(*COTUNIX JAPONICA*) POR *SALMONELLA* PULLORUM

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

Área de Concentração: Reprodução e Sanidade Animal.

Linha de Pesquisa: Reprodução e sanidade de carnívoros, onívoros, herbívoros e aves.

Orientador: Prof. Dr. William Cardoso Maciel

FORTALEZA

2009

S 619a Siqueira, Adonai Aragão de

Avaliação da transmissão e contaminação de codornas japonesas (*Coturnix japonica*) por *Salmonella* Pullorum / Adonai Aragão de Siqueira.- Fortaleza, 2009.

76p.; il.

Orientador: Prof. Dr. William Cardoso Maciel

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

1. *Salmonella* Pullorum. 2. Codornas japonesas. 4. Infecção Experimental. I. Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária.

CDD: 636.5

ADONAI ARAGÃO DE SIQUEIRA

AVALIAÇÃO DA TRANSMISSÃO E CONTAMINAÇÃO DE CODORNAS JAPONESAS
(*COTUNIX JAPONICA*) POR *SALMONELLA* PULLORUM

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

Aprovado em: ____ / ____ / ____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. William Cardoso Maciel
Universidade Estadual do Ceará
Orientador

Profa.Dra.Adriana de Queiroz Pinheiro
Universidade Estadual do Ceará
Examinadora

Profa. Dra. Rosa Patrícia Ramos Salles
Universidade Estadual do Ceará
Co-orientadora\Examinadora

Dr. Francisco Militão de Souza
Universidade Estadual do Ceará
Suplente

DEDICATÓRIA

Dedico.

À Deus, pela vida e pelo amor doado a todos os seres, aos meus pais, Antônio e Elizabeth, por me darem o apoio e serem exemplos de vida para que eu pudesse alcançar mais esta vitória, à minha irmã Karina pelas palavras de incentivo e companheirismo.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual do Ceará - UECE, por ter me proporcionado à chance de galgar mais uma etapa na minha vida acadêmica.

À Faculdade de Veterinária - FAVET, pelo apoio incomensurável a essa conquista.

Ao Laboratório de Estudos Ornitológicos - LABEO, pela oportunidade de conhecer o maravilhoso mundo das aves e da pesquisa científica.

À Fundação Cearense de Amparo à Pesquisa - FUNCAP, que proveu apoio financeiro durante a realização do curso de mestrado, sob a forma de bolsa de estudos colaborando para a realização deste trabalho.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV), com quem tenho convivido desde a graduação.

Ao meu orientador, Dr. William Cardoso Maciel, por sua orientação e dedicação por todos estes anos, desde meu início na área da Medicina Veterinária.

À Dra. Rosa Patrícia Ramos Salles, pelos trabalhos e dedicação nesta dissertação, que muito contribuiu para alcançar e ampliar os objetivos propostos.

Ao doutorando e amigo Régis Siqueira de Castro Teixeira, pela companhia em todos os passos da graduação e mestrado, admiro sua inteligência e dedicação.

Aos estudantes de iniciação científica do LABEO: José Daniel Moraes de Andrade, Emanuella Evangelista da Silva, Samuel Bezerra de Castro, Camila Muniz Cavalcanti, Átilla Holanda de Albuquerque e Elisângela de Souza Lopes e Ricardo José Pimenta Felício Sales pela ajuda durante a realização da parte prática do trabalho. Mais que ajudar, eles foram co-realizadores do experimento, pois, sem a participação destes, os momentos de descontração e de apoio, este trabalho teria sido muito mais difícil de ser realizado.

Aos meus pais, Antônio e Elizabeth Siqueira, por serem os meus maiores incentivadores, sempre me orientado e indicando o melhor caminho a seguir.

À minha irmã, Karina, pela paciência, amizade e companheirismo em todos os momentos.

RESUMO

A coturnicultura é uma atividade consolidada na avicultura alternativa industrial. Devido a esse desenvolvimento, novas pesquisas estão surgindo para melhorar a produtividade em todas as atividades deste setor. Com isso a sanidade de codornas criadas em larga escala tanto para a postura como para corte transforma-se em um campo de estudos importante. Uma das principais enfermidades que prejudica a produção das aves é a pulorose, causada pela bactéria *Salmonella Pullorum* (SP). A SP ocasiona perdas produtivas significativas na indústria avícola, contaminando também os produtos oriundos da produção de codornas. Desta forma, este trabalho teve por objetivo verificar a relação entre o tempo de eliminação da *Salmonella Pullorum* a partir da 03 dia pós-infecção nas fezes e a dos ovos e dos órgãos em codornas japonesas, inoculadas por via oral, bem como avaliar o nível de infecção dessas aves. Para tanto 60 aves foram utilizadas e separadas em três grupos, cada um com vinte aves. As aves do grupo A foram inoculadas com $1,5 \times 10^2$ Unidades Formadoras de Colônias (UFC), as do B com $7,5 \times 10^9$ UFC e as do C com uma solução estéril. Nos dias 03, 06, 09, 16 e 23 dias pós-inoculação (dpi) foram coletados suabes cloacais individuais, ovos, assim como, cecos, intestino, ovário, oviduto e fígado das aves para o cultivo bacteriano. Foi realizada a contagem das UFC de todas as amostras. Foi observado um alto nível de eliminação e contaminação em todos os grupos. As aves do grupo B nos 03 e 06 dpi eliminaram uma maior quantidade de SP do que as do grupo A. A transmissão para os ovos foi alta nos 03, 06 e 09 dpi diminuindo, progressivamente, nos dias posteriores. Em relação à contaminação dos órgãos, entre os grupos não houve diferença estatística, porém numericamente o grupo B apresentou maior isolamento nos 03 e 09 dpi. Até o final do experimento (16 e 30 dpi) as aves continuaram eliminando a SP. A contagem das UFC variou entre 2,53 e 2,3 em todos os dias de coleta e em todos os órgãos, entretanto o fígado apresentou um maior nível de contaminação atingindo no 3 dpi 2,53 UFC/mL. Macroscopicamente, foram observadas várias alterações patológicas como esteatoses e pontos hemorrágicos no fígado, atresia folicular e presença de gases nos cecos, entretanto a partir do 09 dpi houve um decréscimo absoluto das alterações encontradas. Dessa forma, conclui-se que a SP afeta os órgãos internos das codornas, possuindo elevada eliminação e disseminação para seus ovos.

Palavras-chave: *Salmonella Pullorum*, Codornas Japonesas, Infecção Experimental.

ABSTRACT

The quail raising is a consolidated activity in poultry commercial alternative. Due to this development, new research is emerging to better productivity in all activities of this sector. Thus the health of these birds becomes an important field of study in large-scale production of quail for both the production of egg and for the production of cut. One of the main diseases that affect the production of poultry is disease pullorum, this is caused by the pathogen *Salmonella Pullorum* (SP). These bacteria cause significant production losses in the poultry industry, as well as contaminate the products from the production of quail. Thus, this study aims to investigate the relationship between the time of elimination of *Salmonella* sp. fecal samples and infection of eggs and organs in Japanese quail infected orally as well as assess the level of infection of birds. To achieve this goal were 60 adult Japanese quails divided into three groups randomly, each group with 20 birds. In group A was orally inoculated *Salmonella Pullorum* strain with a dose of 1.5×10^2 colony forming units (CFU) and group B with a dose of 7.5×10^9 CFU and group C was the control group in which the birds were inoculated with a saline solution. on days 3, 6, 9, 16 and 23 postinoculation (DPI) were collected one swab in one cloacae, eggs as well as caecum, intestines, ovary, oviduct and liver, for the procedure microbiological. Were counted on the colony forming units (CFU) of all samples. There was a high level of shedding and infection in all groups. The birds of group B in 03 and 06 dpi shedding a greater amount of SP than group A. The transmission to the eggs was high in 03, 06 and 09 dpi decreasing progressively in the days after. Regarding infection of organs between groups was no statistical difference, although numerically the group B showed greater isolation in 03 and 09 dpi. By the end of the experiment (16 and 30 dpi) the birds continued shedding SP. The count of CFU varied between 2.53 and 2.3 on all days of collection and in all organs, however the liver showed a higher level of contamination, reaching in 3dpi 2,53 CFU/mL. Macroscopically, we observed several pathological changes such as steatosis and hemorrhagic spots in the liver, follicular atresia and the presence of gas in the cecum, however from 09 dpi there was an absolute decrease of alterations. Thus it is concluded that SP affects the internal organs of the quail, but also indicate a high shedding and infection of bacteria and their spread to their eggs.

Keywords: *Salmonella Pullorum*, Japanese quail, Experimental infection.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 01	Páginas
Figure 01 - Frequency absolute isolates of <i>S. Pullorum</i> in Japanese Quails swabs after collection on days 03, 06, 09, 16 and 30 postinocuation.	43
Figure 02 - Frequency absolute of isolation of <i>S. Pullorum</i> in Japanese quail divided into Group A and Group B.	44
Figure 03 - Average number of colony forming units (CFU) of <i>S. Pullorum</i> in Japanese Quails swabs after collection on days 03, 06, 09, 16 and 23 post-inoculation.	45
Figure 04 - Frequency absolute isolation of <i>S. Pullorum</i> in Japanese quail divided into Group A and Group B.	45
Figure 05 - Frequency absolute isolation of <i>S. Pullorum</i> in samples of eggs in Japanese quails divided into Group A and Group B.	46

LISTA DE TABELAS

Revisão de Literatura	Páginas
Tabela 01. Efetivo de rebanho de codornas nas diferentes regiões do Brasil.	15
Capítulo 02	
Figure 01 – Count of Colony Forming Units (CFU) transformed in Log 10, samples of organs and the corresponding days.	56
Figure 02 – Gross lesions in organs collected in their days.	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DPI – Dias Pós-Inoculação

EUA - Estados Unidos da América

g - Grama

h - Horas

H₂S - Ácido sulfídrico

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

LABEO - Laboratório de Estudos Ornitológicos da FAVET/UECE

LIA - Agar Lisina-Ferro

mg - Miligrama

mL - Mililitro

OMS - Organização Mundial de Saúde

pH - potencial hidrogeniônico

SE – *Salmonella* Enteritidis

SG – *Salmonella* Gallinarum

SIM - Sulfeto, Indol e Motilidade

SP – *Salmonella* Pullorum

TSI - Tríplice Açúcar Ferro

UFC – Unidades Formadoras de Colônia

°C - Graus Celsius

µg - Micrograma

χ^2 - Qui-quadrado

% - Porcentagem

SUMÁRIO

Páginas

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 Coturnicultura	13
2.2 Salmonelose	15
2.2.1 Histórico	15
2.2.2 Etiologia.....	16
2.2.3 Epidemiologia	18
2.2.4 Patogenia	20
2.2.5 Patologia.....	22
2.2.6 Sintomatologia.....	24
2.2.7 Métodos Convencionais de Diagnóstico.....	25
2.2.8 Imunidade e Vacinação.....	26
2.2.9 Colonização Intestinal.....	27
2.2.10 Controle e Prevenção.....	27
3. JUSTIFICATIVA.....	29
4. HIPÓTESE CIENTÍFICA	30
5. OBJETIVO:	31
5.1 Objetivo Geral	31
5.2 Objetivos Específicos	31
6. CAPÍTULO 1.....	32
7. CAPÍTULO 2.....	49
8. CONCLUSÕES.....	63
9. PERSPECTIVAS.....	64
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65
11. APÊNDICE.....	76

1 INTRODUÇÃO

A coturnicultura tem evoluído bastante nos últimos anos, pois é uma excelente alternativa para a alimentação humana, podendo ser utilizada tanto para a produção de ovos quanto para a produção de carne (OLIVEIRA, 2002a). Esta expansão merece atenção dos pesquisadores da área avícola no sentido de desenvolver projetos que contribuam para o maior aprimoramento e fixação desta atividade como fonte rentável na produção avícola (FURLAN et al., 1998). Segundo CAMPOS (2000) com o aumento da produtividade a produção avícola se torna de alto risco por depender de um equilíbrio biológico entre agentes agressores e a resistência do organismo da ave e isso necessita de uma avaliação das condições higiênico-sanitárias nos subprodutos da coturnicultura. Os ovos e seus subprodutos são importantes fontes alimentares, sendo sua popularidade justificada pela sua fácil obtenção, baixo custo e alto teor protéico (NASCIMENTO et al., 1996).

Segundo MCCULLOUGH e EISELE (1951), a salmonelose avícola classifica-se em: pulorose, causada pela *Salmonella Pullorum*; tifo Aviário, causado pela *Salmonella Gallinarum*; e as infecções paratifóides, causadas pelas espécies não adaptadas as aves, mas que podem tê-las como hospedeiro intermediário. Nas aves industriais a *Salmonella Pullorum* pode persistir por meses nos órgãos internos das aves, direcionando a infecção para o trato reprodutivo e por transmissão vertical infectando os ovos e sua progênie (SHIVAPRASAD, 2000). Esta contaminação resulta da capacidade do agente de colonizar os tecidos do trato reprodutivo das aves (GAST e BEARD, 1990). A *Salmonella* em aves, após infecção experimental, por via oral, produz ovos contaminados em poucas semanas. (GAST e HOLT, 2001).

A pulorose pode causar graves lesões nos órgãos internos de codornas, principalmente os do trato reprodutivo e intestinal, ocasionando esplenomegalia, pontos necróticos nos pulmões e descoloração no fígado (BUCHHOLZ e FAIRBROTHER, 1992), porém o mecanismo pelo qual a *Salmonella Pullorum* persiste na ave ainda é pouco compreendido (WIGLEY, 2005). Desta forma, este

estudo teve como objetivo conhecer a transmissão e contaminação da *Salmonella Pullorum* em codornas japonesas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Coturnicultura

A criação de codornas foi introduzida no Brasil no início da década de 60, visando principalmente à produção e comercialização de ovos "in natura" da ave *Coturnix japonica*. OLIVEIRA (2001) relatou que o interesse por esta espécie surgiu por volta dos anos 70, tendo sido muito divulgada através de canções populares que serviu de grande impulso para a propagação da espécie.

Entre as diversas atividades do setor avícola, a coturnicultura vem se destacando no mercado agropecuário brasileiro como excelente atividade produtiva, por requerer baixos custos com investimento inicial e mão-de-obra, utilizando pequenas áreas e proporcionando rápido retorno de capital.

Submetidas à seleção e melhoramento genético durante séculos por japoneses, a codorna utilizada no Brasil (*Coturnix japonica*) para produção de ovos, possui altos índices de produtividade (80-95%), produzindo em média, cerca de trezentos ovos por ciclo produtivo (12 meses).

Segundo OLIVEIRA et al. (2002b), as principais características da codorna japonesa são: ciclo reprodutivo curto com postura regular, boa fertilidade e precocidade sexual (Fêmeas aos 42 dias e machos aos 55-60 dias), o que torna a produção de ovos o setor mais representativo da atividade. Algumas pesquisas realizadas na década de 70 relatavam que os ovos da codorna japonesa apresentavam uma maior concentração de colesterol por grama de gema que os ovos de galinha, entretanto, BRESSAN e ROSA (2002) afirmam em estudos mais recentes e com dados obtidos através de técnicas analíticas atuais, que o conteúdo de colesterol dos ovos de codorna (1090mg de colesterol/100g de ovo) é similar aos dos ovos de galinha (1000mg de colesterol/100g de ovo). A popularização do consumo dos ovos desta ave tem proporcionado à coturnicultura, um crescimento de 8% ao ano nesta última década.

OLIVEIRA (2002a) constatou que para superar as crises econômicas, o setor se diversificou através de:

- Produção em grande escala e presença regular no mercado;
- Oferta de produtos de boa qualidade, bem embalados, descascados, em conserva e de baixo preço.

- Segurança sanitária dos ovos e respeito à legislação.

Em decorrência desses fatos, houve uma redução do número de pequenos criadores verticalizados, surgindo criadores especializados em cada fase da criação. Entretanto, BERTECHINI (2002), afirma que a coturnicultura, mesmo apresentando uma grande evolução industrial e se tornando atividade de grandes criadores, proporciona aos pequenos produtores facilidades na comercialização direta de seus produtos, sem a presença de intermediários, o que melhora substancialmente sua lucratividade.

Com o aumento do mercado consumidor de ovos, aumentou também o interesse das grandes empresas avícolas pela coturnicultura. Para tornar a produção de ovos mais eficiente e de melhor qualidade, estas empresas possuem modernas instalações e equipamentos que facilitam o manejo dessas aves. Os galpões tradicionais, com gaiolas em sistema de baterias e as piramidais, são de fácil montagem e baixo custo sendo, atualmente, utilizados por pequenos e médios produtores. Esses galpões estão sendo substituídos, pelos grandes produtores, por galpões automatizados onde a ração é fornecida automaticamente, assim como a coleta dos ovos, tornando a produção mais eficiente e reduzindo gastos com mão-de-obra.

A produção de ovos de codornas no Brasil é feita através do uso de linhagens de alta produtividade, mantendo assim uma oferta suficiente desse produto no mercado. FUJIKURA (2002) estimou que o consumo per capita de ovos de codorna do brasileiro é de apenas 9,5 ovos, concluindo que é um valor baixo quando comparado ao consumo de ovos de galinha, que está estimado em cerca de 100 ovos per capita. O autor lembra ainda que, o ovo de codorna é um produto que apesar de popular, ainda não foi bem explorado a sua potencialidade e que, portanto, existe um mercado a ser expandido.

A região Nordeste está em terceiro lugar no rebanho de codornas no país no ano de 2001 (Tabela 01) e o Estado do Ceará ocupa a sétima colocação, junto com a Bahia em número de codornas alojadas, possuindo uma população de 250 mil aves distribuídas entre pequenos e médios criadores (FUJIKURA, 2002), o que comprova a necessidade de um maior envolvimento entre profissionais da área e produtores, para que este quadro se modifique e haja uma melhor exploração do mercado produtor cearense

Tabela 01. Efetivo de rebanho de codornas nas diferentes regiões do Brasil

Região	Anos						
	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001
Norte	844	629	603	726	808	914	1.148
Nordeste	3.114	4.907	4.563	5.285	6.370	8.265	9.502
Sudeste	33.773	29.931	38.411	40.260	40.311	63.263	68.475
Sul	3.642	7.823	8.230	7.350	11.017	10.877	10.204
Centro-Oeste	1.383	3.386	4.706	5.086	4.684	3.852	4.005
Brasil	42.758	46.678	56.514	58.710	63.192	87.171	93.334

Pesquisa Agropecuária brasileira (IBGE, 2001)

2.2 SALMONELOSE

2.2.1 Histórico

O tifo, enfermidade humana, já era conhecido antes da medicina histórica, mas somente no século XIX, com a descoberta do *Bacterium typhi* por Eberth e Gaffky foi que se fez luz sobre sua verdadeira etiologia, anteriormente, amplamente controvertida. Em 1880, Eberth isolou a bactéria do baço e linfonodos de pessoas com tifo, e Gaffky em 1884 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 como agente do paratifo suíno, denominando de *Bacterium suipestifer*, hoje, conhecida como *Salmonella cholerae-suis*, que na época, erroneamente, foi classificada como o agente etiológico da peste suína. Em homenagem ao Dr. Salmon, Lignières, em 1900, denominou o gênero *Salmonella*. Na Alemanha, em 1888, foi isolada *Bacterium enteritidis* de um surto de toxinfecção alimentar onde 58 pessoas foram afetadas devido à ingestão de carne bovina contaminada (BARROW, 1995). Depois de 1900, Schottmüller designou como paratifo as enfermidades abdominais do homem similares ao tifo.

Em aves, a primeira descrição documentada de salmonelose foi feita 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 (*S. Pullorum* e *S. Gallinarum*) com especificidade para as aves industriais 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 gênero, em destaque com maior incidência as *Salmonella enterica* sorovares Typhimurium (ST) e Enteritidis (SE), espécies particularmente responsáveis pelas intoxicações alimentares no homem. A *Salmonella* foi identificada como uma importante causa de doenças há 100 anos atrás e continua sendo objeto de extensivos estudos (LAX et al., 1995).

No início do século XX, a caracterização das bactérias do gênero *Salmonella* ainda era confusa, mas a partir de 1925, com a utilização das provas sorológicas, foram descritos vários sorotipos de *Salmonella*, aproximadamente 900, os quais foram classificados através da terminologia de White, que deu origem ao esquema de Kaufmann-White, o qual foi reconhecido a partir de 1932 (CORRÊA e CORRÊA, 1992). Nos séculos 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 salmonelose em seres humanos passaram de uma infecção sistêmica para uma gastroenterite de origem alimentar provocada por outros sorotipos e marcada 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 à fagotipos específicos de SE. Estas informações foram divulgadas com grande alarde pelos veículos de comunicação, causando elevados prejuízos aos produtores de ovos (SILVA e DUARTE, 2002). A SE foi, inicialmente, introduzida em granjas avícolas através de ratos, considerados reservatórios naturais desta bactéria. Esta bactéria foi isolada de roedores presentes em áreas urbanas em 1930, no entanto, somente na década de 80 a SE disseminou-se em grandes proporções nos plantéis avícolas (BÄUMLER et al., 2000). Uma provável razão para este fato seria a infecção de lotes de aves reprodutoras, que através da via vertical transmitiu a *Salmonella* para a progênie (LISTER, 1988).

2.2.2 Etiologia

As salmonelas são bactérias da família *Enterobacteriaceae* que incluem mais de 2500 sorotipos, entre os quais 1367 pertencem à subespécie *enterica* (CAMPOS, 2002), estão amplamente difundidas na natureza sendo 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 salmonelas específicas das aves (*Salmonella enterica* sorovar Pullorum, *S. enterica* sorovar Gallinarum). São bastonetes curtos, gram negativos, aeróbios e anaeróbios facultativos de fácil crescimento em meios comuns (TORTORA, 2000), relativamente resistentes ao calor e às substâncias

químicas, porém não sobrevivem à temperatura de 55 °C em 1 h ou em 60 °C por 15 a 20 minutos (GAMA, 2001). As salmonelas são bactérias mesófilas, com temperatura de crescimento ótimo entre 35 °C e 37 °C possuem forma de bacilos pequenos medindo 0,7 a 1,5 µm de largura por 2,0 a 5,0 µm de comprimento. 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). Para demonstrar a importância deste fato, pode-se exemplificar o caso da inspeção federal do Canadá que exige temperaturas para conservação de carcaças entre 2 e 3° C, miúdos 1° C a 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, como pH, atividade da água (Aa) e potencial de oxidação-redução (Eh) 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 salmonelas são destruídas lentamente (COSTA, 1996).

A divisão do gênero *Salmonella* é caracterizada através dos tipos sorológicos e esta divisão toma por base a especificidade imunológica dos chamados antígenos somáticos (O), antígeno capsular (Vi) e antígenos flagelares (H). Os antígenos “O” são designados por números arábicos e caracterizam os sorogrupos da *Salmonella*, por isso o mesmo antígeno “O” é comum a vários sorotipos. Esse antígeno localiza-se na fração lipolissacarídica da membrana externa da bactéria. Os antígenos “H” são de natureza protéica e, espécie-específica, sendo 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 salmonelas não apresentam flagelos e são, portanto, imóveis, enquanto outras podem ter flagelos em apenas uma fase (monofásica). Entretanto, a maioria das salmonelas é bifásica, isto é, apresenta flagelos da fase 1 e de fase 2 simultaneamente (CAMPOS, 2002). Esse fenômeno é conhecido como variação de fase.

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).

Os antígenos “Vi” e “O” são termoresistentes, não sendo destruídos pelo aquecimento a 100° C por duas horas. Os antígenos “H” são termolábeis. Para a determinação do sorotipo de *Salmonella*, os sorotipos “H” necessitam ser eliminados pelo aquecimento (FRANCO e LANDGRAF, 1996).

Atualmente, a Organização Mundial de Saúde (OMS), através do Centro de Referência e Pesquisa de *Salmonella*, recomenda uma nomenclatura que reflete os recentes avanços na taxonomia do gênero, consistindo de duas espécies, *Salmonella enterica* classificada em seis subespécies (*enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *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).

As salmoneloses provocam enfermidades que afetam a indústria avícola: pulorose, causada por *S. enterica* sorovar Pullorum (SP); tifo aviário, causado pela *S. enterica* sorovar Gallinarum (SG) e o paratifo aviário, causado por qualquer *Salmonella* que não seja um dos agentes da pulorose ou do tifo aviário. Dentre as paratifóides, a *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium, Agona e Enteritidis, ocasionam salmonelose 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 de doenças com sintomas ao qual pode levar a severa febre entérica por meio de alimentos contaminados.

2.2.3 Epidemiologia

A *Salmonella* é muito difundida geograficamente no mundo todo, principalmente em regiões onde existe uma alta densidade avícola. A salmonelose pode afetar diversos animais com destaque as aves e mamíferos. Tanto as salmonelas 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 de várias formas e, devido a isto, sua epidemiologia é bastante complexa (HINTON, 1988), sendo difícil determinar como um lote foi infectado ou como ocorre a disseminação bacteriana no plantel. Entre estes mecanismos de transmissão podemos citar: aquisição de aves contaminadas, seres humanos, equipamentos, água, aves silvestres, roedores (SILVA e DUARTE, 2002). Como também animais domésticos e insetos, como cita JOVER (1968), que após isolar SE de moscas, pulgas e baratas, coletadas em um sistema intensivo de criação, relatou a sobrevivência desta bactéria através do ciclo vital desses insetos (BERCHIERI JR. e BARROW, 1995).

Estudos revelam que os microrganismos Gram-negativos são os mais frequentes 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 na casuística 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 as condições dos cães 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: SP, SG e SE, mesmo assim, as matérias primas de origem animal têm sido retiradas das formulações de rações como forma de controle de *Salmonella* ou as mesmas têm sofrido processos de peletização e tratamento químico, mas que não garantem a eliminação de agentes patogênicos. 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 da *Salmonella* geralmente é a via oral, entretanto a infecção através da via respiratória 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.

Segundo SNOEYENBOS (1991), BARROW e LOVELL (1991), a SG, SP e SE podem ser transmitidas verticalmente por localização no aparelho reprodutivo.

A SE pode infectar um lote de aves e invadir lotes vizinhos sem apresentar nenhum sintoma da doença. Esta 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). BAÚ et al. (2001), analisando amostras de produtos procedentes de frangos encontraram prevalência de 10,48% de amostras contaminadas por *Salmonella* e após caracterização, observaram que 77% destas amostras estavam contaminadas por SE. Este alto índice confirma uma tendência que vem ocorrendo mundialmente, desde o fim da década passada (RODRIGUES et al., 1990).

NASCIMENTO et al. (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. Segundo SPRINGER e POURCIAU (1978) essa contaminação pode ocorrer até 53 dias pós-infecção, em codornas Bob White. Esses autores realizaram um dos primeiros estudos de salmonelose em codornas e após inoculação de várias cepas de salmonelas paratíficas, coletaram suabes cloacais e identificaram a eliminação do patógeno, porém avaliaram somente a mortalidade destas aves e o tempo de eliminação da bactéria através das fezes.

A contaminação dos ovos por *Salmonella* pode ocorrer através da via vertical – via do ovo (METHNER et al., 1995) e/ou através de infecção horizontal, ocorrência frequente 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 frequente (BAILEY et al., 1994; CASON et al., 1994), ocorrendo à contaminação externa da casca e consequentemente penetração da bactéria através dos poros dos ovos.

A contaminação vertical pode se dar diretamente na gema ou no albúmen através dos órgãos reprodutivos antes da formação da casca (SHIVAPRASAD et al., 1990). KELLER et al. (1997), citam que tanto a SE como a ST possuem um potencial igual para colonizar o tecido do trato reprodutivo e os ovos durante a formação no oviduto antes da postura.

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

Sorovares altamente invasivos também podem infectar o trato genital e a infecção do ovário da galinha conduz à contaminação dos ovos que no caso da SP, pode persistir por meses (BARROW, 1999). A contaminação dos ovos por SP também foi relatada através da contaminação da casca, porém citada como de menor importância (WILLIAMS et al., 1968).

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 de 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., 1994).

2.2.4 Patogenia

A via de infecção normalmente é a oral. Os organismos invadem rapidamente os tecidos dos hospedeiros, através do tecido linfóide, incluindo as placas de Peyer e, no caso das galinhas, as amígdalas cecais e possivelmente também os enterócitos da mucosa intestinal (POPIEL e TUMBULL, 1985; BARROW, 1999). Estudos *in vitro* mostram 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 endocitose. A bactéria atinge a corrente sangüínea provavelmente de modo intracelular, sendo removida pelo baço, fígado e medula (BARROW, 1999). A invasão pode ocorrer também através das células M (CAMPOS, 2002) e a *S. Typhi* parece utilizar apenas a célula M.

Nessa fase acontece a multiplicação bacteriana em uma taxa que reflete a virulência da linhagem e o fundo genético do hospedeiro. A SG e SP em galinhas podem 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 SE pode colonizar os folículos pré-ovulatórios 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.

TORTORA (2000) cita que a *S. Typhi* penetra através da via digestória e durante o período de incubação multiplica-se no tecido linfóide da submucosa intestinal (placas de Peyer) e nos linfonodos regionais. Esta multiplicação ocorre no interior de macrófagos e plasmócitos, sendo provável que, tais focos de proliferação intracelular do bacilo atinjam a corrente sangüínea, via linfático eferente e dutos torácicos. Na primeira semana da doença há bacteremia e através do sangue há propagação da *Salmonella* ao fígado, baço e medula óssea, onde ocorre proliferação, reinvasão do sangue e liberação de endotoxina (toxemia). Na segunda semana a hemocultura tende a tornar-se negativa devido ao aparecimento de anticorpos opsonizantes (anti-O) atingindo o período de convalescença e o doente pode adquirir a condição de portador, devido à infecção crônica da vesícula biliar (coprocultura positiva).

2.2.5 Patologia

A *Salmonella* tem como órgão de predileção o intestino, onde se instala e se reproduz, conforme as espécies afetadas e o tipo de agente. Quando o agente etiológico ingressa através da corrente sangüínea, pode ocorrer à forma septicêmica, quando são observadas 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 aves 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 congestos, pericardite com aderências, peritonite acompanhada, ocasionalmente, por focos necróticos e exsudato caseoso nos cecos (SILVA, 1991).

A infecção pode resultar em várias complicações, incluindo gastroenterites, peritonites, hemorragias na camada serosa, no pericárdio e peritônio, estando os órgãos contidos na cavidade abdominal, fígado, baço e intestinos recobertos por uma capa fina de fibrina. A mucosa intestinal apresenta-se congesta e inflamada, podendo ser observados focos de necrose e degeneração do fígado. Em animais adultos, além de ocorrerem ulcerações na mucosa intestinal e nos órgãos genitais das galinhas, há inflamação do oviduto e ovário com presença de vitelo deformado e anguloso e as articulações podem apresentar deformações (JOVER, 1968).

A pulorose está fortemente relacionada com a idade, nível de contaminação, linhagem da ave e o manejo. A forma aguda e superaguda ocorrem em pintos de poucos dias de idade, surgindo após a eclosão podendo evoluir rapidamente e causar alta mortalidade na segunda semana de vida, após esse período a mortalidade pode cessar e as aves podem recuperar-se posteriormente (ROCA, 1991). Em alguns casos a mortalidade pode ser em média de 25 a 30 %, podendo variar dependendo do sistema imune das aves e das condições de manejo. As aves com mais idades passam a ter a pulorose na forma crônica, que reflete na postura de galinhas e nos animais jovens ocorre um desenvolvimento corporal lento e irregular.

Não se observam alterações macroscópicas na forma superaguda, porém na forma aguda há aumento do volume e congestão do fígado, baço e rins. Em pintos, o saco da gema é mal absorvido e pode apresentar um conteúdo de consistência cremosa ou caseosa, nódulos branco-amarelados podem ocorrer no trato digestivo, músculo cardíaco, pulmão e pâncreas. O pericárdio se torna espesso e contém exsudado amarelado ou fibrinoso. Os cecos poderão conter material caseoso em seu interior, os órgãos internos podem estar congestos, pode haver presença de líquido viscoso no peritônio, espessamento da parede intestinal e exsudado na câmara anterior do olho (BERCHIERI JR., 2000).

Em aves adultas, podem ser observadas alterações dos folículos ovarianos, como regressão, sendo mais comum o aparecimento de folículos císticos, hemorrágicos, atrofiados e de contorno irregular com material caseoso ou necrosado no seu interior. Peritonite fibrinosa, peri-hepatite e pericardite também podem ser observadas e os machos podem apresentar pontos ou nódulos esbranquiçados nos testículos.

Entre as alterações microscópicas, podemos citar na forma superaguda uma congestão vascular em vários órgãos como fígado, baço e rins. Na forma aguda e subaguda há pontos necróticos no fígado, congestão renal e nas aves jovens há necrose extensa da mucosa e submucosa dos cecos com presença de debris celulares necrosados, misturado com fibrina e heterófilos (BERCHIERI JR., 2000) no lúmen.

O tifo aviário causado pela SG é uma enfermidade aguda com um breve período de incubação e em relação ao percentual de mortalidade existe grande variabilidade. ROCA (1991), citam que há relatos de percentual de mortalidade em cerca de 100 %. Em um lote, podem-se observar aves com o quadro clínico da doença e aves que mostram um aspecto normal de saúde. Esta enfermidade apresenta características de septicemia e toxemia. Há congestão dos órgãos internos e destruição das hemácias pelo sistema retículo-endotelial com consequente anemia, patologia também observada por DESHMUKH et al. (2005), ao realizarem uma infecção experimental de SG associada com a micotoxina fumosina B1 em codornas japonesas. Em outra pesquisa estes mesmos autores verificaram alta mortalidade nos grupos infectados com micotoxinas associadas à *Salmonella*, além de altas taxas de anemia no grupo infectado somente com SG (DESHMUKH et al., 2005).

Segundo BERCHIERI JR., (2000) também poderá ocorrer esplenomegalia e hepatomegalia nos quadros agudos. O fígado torna-se friável com coloração atípica (esverdeado) com pontos necróticos (esbranquiçados) e hemorrágicos. Há pontos necróticos também no coração e no baço e este último possui ainda pontos de hemorragia. Podem ser observados, como na pulorose, processos inflamatórios com formação de nódulos em diversos órgãos e o ovário pode aparecer atrofiado ou com os folículos hemorrágicos.

O paratifo aviário quando apresenta um quadro severo, as aves desenvolvem septicemia aguda com rápida morte, sem presença de alterações macroscópicas. Quando o curso da doença se prolonga há enterite severa com necrose focal da mucosa do intestino delgado. Há congestão dos rins, baço, fígado e tubo digestivo e em pintainhos pode haver má absorção do tubo digestivo. Em aves adultas há atrofia do ovário e presença de folículos alterados, hemorrágicos e caseosos.

A infecção do trato digestivo das aves por salmonelas paratifóides é mais eficaz e persistente no ceco, reto e inglúvio (HARGIS et al., 1995).

2.2.6 Sintomatologia

A salmonelose tem como característica de modo geral a sonolência, fraqueza, anorexia, diminuição da curva de crescimento e amontoamento. Ovos de reprodutoras quando infectadas 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, neste momento, 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 acometendo principalmente às 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 ruim, a respiração passa a ser dificultosa. Os animais que sobreviverem à enfermidade podem vir a se recuperar, porém poderão ser portadores e eliminarem a bactéria em seus ovos durante a postura (BERCHIERI JR., 2000). A pulorose é mais comum em aves jovens, porém pode acometer também aves adultas e sua sintomatologia nem sempre é evidente. Entre os sinais podemos observar a curva de postura inferior ao padrão da linhagem, queda no consumo da ração, eriçamento das penas, crista pálida e retraída, diminuição da eclodibilidade e da fertilidade. As aves poderão apresentar diarreia (branco-amarelada a amarelo-esverdeada), depressão e desidratação (BERCHIERI JR., 2000).

Já o tifo aviário é mais observado em aves adultas, havendo redução do consumo de ração, prostração e diarreia com coloração amarela a esverdeada. O curso pode ser de 05 a 07 dias podendo se prolongar e a mortalidade não ocorre de uma só vez (BERCHIERI JR., 2000).

As infecções paratífóides geralmente causam problemas em aves jovens e os sintomas são confundidos com os de outras doenças, as aves permanecem paradas com a cabeça baixa e olhos fechados, eriçamento das penas e asas caídas, apresentando-se sonolentas. Há amontoamento próximo à fonte de calor, perda de apetite e aumento do consumo de água, diarreia aquosa profusa e emplastramento da cloaca. (BERCHIERI JR. e BARROW, 1995). As aves adultas apresentam inapetência queda na postura e diarreia. O paratifo tende a ocorrer após situação de estresse, como na muda forçada (BERCHIERI JR., 2000).

A invasão de SE dentro de vários órgãos de galinhas e redução da produção de ovos em poedeiras é relatada por GAST e BEARD, 1990.

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).

2.2.7 Métodos Convencionais de Diagnóstico

O diagnóstico pode servir como forma de reduzir as causas da salmonelose em humanos e animais. Um diagnóstico definitivo e eficaz para pulorose e tifo aviário, assim como para outras salmoneloses, está baseado no isolamento e identificação da *Salmonella* sendo complementado pelo histórico, sinais clínicos, lesões e dados de mortalidade (MACHADO, 2000).

Para o diagnóstico clínico se faz necessário uma anamnese bem feita acompanhada dos achados clínicos e de necropsia, porém é difícil se analisado apenas os sinais, 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 anatomopatológicos, discutidos anteriormente, como uma arma para direcionar de forma objetiva os exames laboratoriais, pois somente estes poderão fornecer, com maior exatidão, o diagnóstico final (BERCHIERI JR., 2000).

Para diagnóstico por isolamento bacteriano de aves com sinais clínicos da doença ou suspeitas sorológicas, é comum a utilização de suabes de órgãos ou de fragmentos colhidos com material estéril. Na monitoria de lotes, são mais usadas as coletas através de suabes de cloaca, suabes de arrasto, cama, fezes frescas, conteúdo de comedouros e água, e no caso de poedeiras comerciais e reprodutoras, 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, sendo que para o isolamento de *Salmonella* existem diversos fatores que podem afetar esta escolha (ALBUQUERQUE et al., 2000).

Entre os exames mais utilizados podemos citar os testes sorológicos indiretos (ELISA, Hemoaglutinação rápida em placas) e os cultivos bacteriológicos com a utilização de meios como: Caldo Tetrationsato; Ágar Verde Brilhante; Ágar de MacConkey; Ágar Salmonella-Shigella, entre outros).

O ELISA é baseado na detecção de IgG e apresenta certas vantagens quando comparado aos testes sorológicos tradicionais. É mais sensível que o teste de soroaglutinação em placa (COOPER et al., 1989; NICHOLAS et al., 1991).

Segundo OLIVEIRA (1984), para o diagnóstico de portadores da pulorose, usa-se o teste de Hemoaglutinação que é realizado no próprio aviário, usando antígeno de laboratório idôneo, acompanhado por controles positivos e negativos na hora da prova. Para o teste da hemoaglutinação as aves deverão estar em jejum por algumas horas, o soro e o antígeno devem estar na mesma temperatura e a leitura do resultado é realizada um minuto após se homogeneizar 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.

BERCHIERI JR. (2000), cita que os órgãos de predileção para isolamento da *Salmonella* em meios de cultivo 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). De acordo com ROCA et al. (1991), na forma aguda septicêmica dos pintainhos, a SP pode ser isolada a partir de qualquer órgão parenquimatoso.

A pesquisa de *Salmonella* em materiais que podem estar veiculando a bactéria, como farinhas de origem animal e ração, inicia-se com uma etapa anterior ao cultivo em caldo enriquecido, sendo as amostras semeadas em caldo de pré-enriquecimento (água peptonada tamponada, solução de Ringer ¼, caldo lactosado) (BERCHIERI JR., 2000).

2.2.8 Imunidade e Vacinação

A imunidade das aves vacinadas, quando desafiadas com cepa de campo, impede a adesão da *Salmonella* ao intestino das aves, o que ocorreria, através das fimbrias, dessa forma a bactéria se multiplicaria e seria excretada através das fezes em elevada quantidade o que aumentaria o risco de contaminação de todo o lote. As aves quando vacinadas, adequadamente podem suportar uma infecção e combater a bactéria mais rapidamente e efetivamente do que aves não imunizadas.

Na ocorrência do desafio de campo por *Salmonella*, a imunidade vacinal impede que as cepas de campo possam aderir ao intestino das aves como fariam, através das fimbrias, então estas se multiplicariam em grandes números e seriam secretadas, pelas fezes, em grandes quantidades, aumentando o risco de infectar o resto do lote. Aves apropriadamente vacinadas podem suportar uma infecção e combater a bactéria mais rapidamente e efetivamente do que as aves não imunes.

Há 10 anos, a aplicação de gene manipulado no estudo da biologia da *Salmonella* tem produzido significativo progresso no desenvolvimento de vacinas contra *Salmonella* (LAX et al., 1995).

As vacinas mortas e vacinas vivas atenuadas estão sendo usadas em animais domésticos, mas a avaliação da eficácia ainda não está sendo clara. As vacinas mortas contra *Salmonella* têm sido longamente pesquisadas para a proteção contra as salmoneloses em experimento animal, entretanto o nível e duração da proteção são baixos (LAX et al., 1995).

O uso de vacinas vivas atenuadas é um meio eficiente de aumentar a resistência contra a infecção por SG quando outros métodos de controle não são possíveis. WITVLIET et al. citado por BARROW (1999) afirmam que vacinas contra SG poderiam ser eficazes contra SE.

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 melhorar a segurança alimentar em produtos avícolas.

2.2.9 Colonização Intestinal

Para o início da colonização é indispensável que ocorra a associação física entre a bactéria e o epitélio intestinal. (FULLER, 1973). A ligação das células microbianas através das adesinas de superfície é um fenômeno imprescindível para ocorrer às infecções e suas patologias (KELLY e YOUNSON, 2000).

Para que aconteça a colonização intestinal a adesão física é um mecanismo importante (SOEJARDI et al., 1982), há pesquisas que indicam as fimbrias como promotoras da colonização de *Salmonella* Infantis (BARROW et al., 1988) e ST (LOCKMAN e CURTIS, 1992) no intestino.

Diferentes sorotipos de *Salmonella* colonizam o trato digestivo do frango com mais eficiência do que outros (AABO et al., 2002). Como, por exemplo, a *Salmonella* Montevideo que persiste no trato gastroentérico dos frangos é eliminada nas fezes por um período maior que a ST. Em uma infecção assintomática a SP, SG e *Salmonella* Cholerae suis colonizam muito pouco o trato alimentar de frangos, provavelmente porque estas bactérias tenham condições nutricionais específicas (TURNER et al., 1998). Diferentemente desses sorotipos, a SE fagotipo 4 é bastante prejudicial ao trato intestinal, pois é bastante invasiva em aves jovens (HINTON et al., 1990).

2.2.10 Controle e Prevenção

Com o passar dos anos, os métodos para o controle de infecção por *Salmonella* sp. foram estudados em profundidade (BARROW e LOVELL, 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 Salmonellas nos animais vivos. Este esforço é continuado durante toda a cadeia de produção até chegar à carne para consumo, os ovos e os subprodutos, pode 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. Neste 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, deste modo, se minimizará as perdas ocasionadas por essas bactérias.

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 ideal 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 intermediário como ratos, pássaros e insetos, também são motivos de investigação, HENZLER e OPITZ (1992), isolaram *Salmonella* Enteritidis de 24 % de ratos capturados e somente 7,5 % do ambiente.

Para uma atuação efetiva de controle os antimicrobianos estão bastante difundidos na avicultura. Entre estes a Sulfonamidas e Nitrofuranos podem atuar contra a *Salmonella*, estes reduzem a mortalidade, mas não evitam que as aves deixem de ser portadoras. Esses antibióticos podem interferir com a resposta sorológica, portanto são contra-indicados por pelo menos 6 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.

3 JUSTIFICATIVA

Apesar da coturnicultura ser uma área de produção na avicultura alternativa industrial em crescente expansão, ainda não há publicações de alto impacto com estudos mais aprofundados nesta área. Desta maneira, faz-se necessário a elaboração de pesquisas mais apuradas, principalmente no âmbito da qualidade microbiológica dos alimentos.

No setor de sanidade avícola a salmonelose é um dos principais patógenos entéricos, causando grandes prejuízos econômicos, além de ser uma das principais causas das toxinfecções alimentares em humanos, resultando em grandes problemas para a saúde pública.

O conhecimento da transmissão horizontal e vertical da salmonelose e sua patogenicidade em codorna são de extrema importância para o combate desta enfermidade nas diversas áreas da produção avícola e da segurança alimentar.

4 HIPÓTESE CIENTÍFICA

Na produção industrial de codornas muitos são os fatores para desenvolver uma boa produção, sendo um dos mais importantes à manutenção de uma boa sanidade das aves. Um dos principais patógenos prejudicial ao bem-estar das aves é a *Salmonella* sp., bactéria que pode contaminar os órgãos internos e causar perdas na produção. As codornas podem eliminar estas bactérias através das fezes e ovos, contaminando o ambiente e os produtos da coturnicultura, porém, não há um total esclarecimento científico da patogenicidade e da frequência da transmissão desta bactéria. Assim uma melhor compreensão desta infecção é importante para formular programas de prevenção para a salmonelose em codornas.

5 OBJETIVO

5.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar a transmissão e infecção de codornas japonesas infectadas por *S. Pullorum*.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Definir o tempo de eliminação do patógeno nos suabes cloacais e nos ovos.
- Determinar a contaminação em diversos órgãos e a frequência de contaminação nos órgãos do trato gastroentérico, fígado e trato reprodutivo.
- Analisar as alterações anatomopatológicas das aves infectadas.

6 CAPÍTULO 1

Avaliação da disseminação da *Salmonella* Pullorum em Codornas Japonesas

Evaluation of the dissemination of *Salmonella* Pullorum in Japanese Quails

Periódico: Canadian Veterinary Journal

Resumo

Este trabalho teve como objetivo avaliar a contaminação de *Salmonella Pullorum* em codornas japonesas e verificar a transmissão para os ovos. Para tanto foram utilizadas 60 aves, divididas em três grupos. O grupo A e o B foram inoculados com uma concentração de $1,5 \times 10^2$ UFC e $7,5 \times 10^9$ UFC de *Salmonella Pullorum* e o grupo C com uma solução estéril. Após 03, 06, 09, 16 e 23 dias da inoculação foram coletados suabes cloacais e ovos e também foi realizada a contagem das Unidades Formadoras de Colônias (precisa explicar melhor). Não houve mortalidade, porém houve alto nível de eliminação e contaminação nos grupos A e B. Nos 03 e 06 dpi o grupo B apresentou uma maior eliminação da bactéria do que o grupo A. A recuperação da *Salmonella* dos dois grupos foi elevada nos 03, 06 e 09 dpi diminuindo progressivamente. Esses resultados indicam uma alta eliminação da bactéria e alta transmissão para os ovos.

Palavras-chave: Disseminação, *Salmonella Pullorum*, Codornas Japonesas.

Abstract

This study aimed to evaluate the infection of *Salmonella Pullorum* in Japanese quail and to check infection of eggs. For that 60 birds were used. Group A was inoculated with a concentration of 1.5×10^2 in group B with 7.5×10^9 and in group C a solution sterile. After 03, 06, 09, 16 and 23 days post-inoculation were collected cloacal swabs and eggs was also carried out counting the colony forming units. This work was no mortality, but there was high level of infection and disposal in both groups. The 03 and 06 dpi in group B had a greater elimination of bacteria than group A. The transmission to the eggs was high in 03, 06 and 09 dpi decreasing steadily. These results indicate a high infection and elimination of bacteria and its dissemination to their eggs, but showing a resistance to this pathogen.

Key-words: Dissemination, *Salmonella Pullorum*, Japanese Quail

1. INTRODUCTION

The quail raising has evolved greatly in recent years, it is an excellent alternative as a source of food for human consumption. Lately, there has been a great increase not only the consumption of quail eggs but also meat (1). This expansion deserves the attention of researchers in poultry in order to develop projects in various aspects of production and management, nutrition and health (2).

According to Campos (3), increasing productivity poultry production becomes high risk by relying on a biological balance between aggressive agents and the resistance of the organism of the bird. For the better development of quail raising should avoid the risk of bacterial infection in poultry as well as the eggs produced. The main contaminants of the egg to *Salmonella enterica* serovar Pullorum is a pathogen of great importance and causes pullorum disease, severe systemic disease in fowl, which causes high economic losses around the world, due to mortality, morbidity and reduction in egg production. According to Shivaprasad (4) several other species of birds are susceptible to pullorum disease such as quail, pheasants, ducks, among others. However Gama (5) reported that the quail has a high resistance to diseases common in the poultry industry, including the salmonella infection. Salmonella has the ability to infect the laying hens and persist for several months in the bird's organism, infecting the reproductive tract and thus causing the vertical transmission, contaminating the eggs and their offspring (6). According to the presented, this study aims to evaluate the elimination of *S. Pullorum* in Japanese quail and examine the capacity of transmission to the eggs.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 Birds used in the experiment

We used 60 quails (*Coturnix japonica*) with 160 days of age and 70% of production housed in the shed of experimental infection of LABEO - (Ornithological Laboratory Studies).

We used two batteries of 16 cages (20 x 15 x 15 cm) per battery being housed 4 birds/cage. The birds received diet and natural mineral water *ad libitum* throughout the experiment. This experiment is in agreement with Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation of State University of Ceará (n° 08627875-4).

2.2. Preparation of samples

2.2.1 Preparation, purification and characterization of bacteria.

We used a strain *Salmonella Pullorum* (AT-1304) lyophilized and kept at a temperature of 20 ° C below zero, provided by the Instituto Oswaldo Cruz. This was sown in 0.85% saline solution to transfer to a plate containing nutrient agar for conservation, for 18h at 37°C. After that, a single colony was collected and transferred to a test tube containing 10 mL of Tryptic soy broth overnight at 37 ° C, this culture was diluted in series in 8 tubes. Was streaked 0.1 mL of this solution on plates containing agar brilliant green-(AVB) white novobiocin (NOV) to the concentration of 20 µg/mL (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). These plates were incubated in bacteriological incubator at 37°C overnight, after this period of the colony forming units (CFU) were counted and the concentrations of each tube were determined (7).

2.3 Control of bacterial birds

Three weeks prior to inoculation were performed the rapid whole-blood (WB) test in all 60 birds. After that 21 individual cloacal swabs were collected in randomly selected birds, for the bacteriological examination. Then were transported in sterile test tubes and sent to LABEO.

2.4 Experimental Test

2.4.1 Infection

For the experimental infection in each bird received orally 0.5 mL containing the concentration of 7×10^8 for birds in group A and 1.5×10^2 for the birds of group B. For this procedure using a 500- μ L micropipette adjusted to a urethral probe.

2.5 Collection of samples

2.5.2 Cloacal swab

Individual cloacal swab were collected from all birds on days 3, 6, 9, 16 and 23 after infection, totaling 300 samples. This swab was stored in sterile test tubes and transported to the achievement of microbiological procedures.

2.5.3 Samples of eggs

The collection of eggs was performed on days 03, 06, 09, 16 and 23 post-infection. These eggs were collected aseptically with sterile gloves, and that ten whole eggs corresponded to a sample. Comprising 30 samples throughout the experiment.

2.6. Microbiological procedure

2.6.1 Cloacal swab

The procedure adopted was based on the bacteriological work of Pinheiro et al. (8). After harvest, in test tubes sterile swab was passed into the 9 mL of selenite-cystine broth (Merck 107717). The broths were incubated at 37 °C overnight, passed for Brilliant Green agar with novobiocin at a concentration of 20 mg / mL (AVB-Nov) and again passed for bacteriological incubator. Biochemical tests were used with the agars: triple sugar iron agar (TSI - ® Merck), inclined lysine-iron (lia - himedia ®) and agar SIM (sulfide, indole and motility - ® Oxoid) and confirmed by serological tests with polyvalent serum against O and H *Salmonella* antigens.

2.6.2 Samples of eggs

Each sample of eggs was formed by a pool of 10 whole eggs, they were crushed in sterile becker and then collected 1 mL. This aliquot was passed to the selenite-cystine broth (Oxoid) and carried out the microbiological procedures as described above.

2.7. Counting of colony forming units.

From each plate AVB-NOV, was counted the number of colony forming units (CFU). The number of each plate was converted to $\log_{10}x+1$.

2.8 Statistical Analysis

The data were analyzed by software Statistix 8.0 (9). The data will initially be submitted to the Kolmogorov-Smirnov and Shapiro-Wilk, for confirmation of normality of distribution, and the Bartlett test to verify the homogeneity of variance between treatments. The results were submitted to analysis of variance using the general linear model (GML).

The results for the colony forming units of (UFC) were transformed into $\log_{10}x + 1$ and the means were compared by non-parametric test of Kwuska-Wallis. The data of frequency of isolation for *Salmonella* on swabs were compared by Chi-square, and samples of eggs by the Fisher exact test. All data were subjected to a significance level of 5%.

3. RESULTS

There was no isolation of *S. Pullorum* in any bird before the experiment, as there was no mortality during the experiment. However, the frequency of samples identified *S. Pullorum* of the swabs was high at 03 dpi and this day the identified was statistically higher in group B compared to group A (Figure 01). On the other days (06, 09, 16 and 30 dpi) no statistical difference between the groups.

The Group A showed statistically significant difference in isolation in 06, 09, and 16 dpi with the highest number of positive samples compared to 03 and 30 dpi (Figure 02). However, in group B there was no statistical difference between days post-inoculation.

We also assessed the level of elimination of *S. Pullorum* by counting the colony forming units (CFU) of cloacal swabs (Figure 03). There were differences between groups at 03 dpi and 09 dpi, in which the number of CFU / mL was significantly higher in group B (Figure 03). The largest number of CFU of cloacal swabs was at 03dpi in group (B), with a decrease on 06 and 09 dpi (statistically equal), further reducing in 16 and 23 dpi (statistically equal) (Figure 04). Of the 30 egg samples analyzed,

twenty-two were positive for *S. Pullorum* until 16 dpi. There was no statistical difference between groups, because all samples were positive in 03 and 06 dpi. The 09 dpi there was 50% of positive samples and 23 dpi (Figure 05) there was no identification. Similarly, the variation in the level of transmission observed by counting of CFU / mL in eggs was similar to the isolation of the samples.

4. DISCUSSION

There was no mortality during the study, in contrast to the reported by Basnet et al. (10) that after inoculated broilers at 16 days of age with *S. Gallinarum*, observed 30% mortality and Chacana et al (11) who obtained 100% mortality in laying hens of 28 and 52 weeks. Other researchers Buchholz et al. (12) reported high mortality of bob white quail (*Colinus virginianus*) 10 days of age infected with *S. Pullorum*, but these researchers did not mention the infection in adult quail. These results differ from the results of this study suggest that a supposed resistance of the adult quail for the *S. Pullorum*, because there was no mortality (5.13).

The Group B showed a high number of CFU at 03 dpi as opposed to group A, but group A showed increasing on identification until 09 dpi. Chacana et al. (11) inoculated 2×10^5 CFU / mL of *S. Gallinarum* and also found a high isolation (100% of samples of cloacal swabs) in the first days post-infection (02 dpi). Thus, as hens as quails, high doses of inoculation of *Salmonella* sp. resulted in rapid elimination of bacteria.

The group that received the lowest inoculation showed a gradual increase in the elimination of the pathogen, peaking at 09 dpi. According to Avila et al. (14) after a small dose of infection, the bird can, after a suitable period, provide a more competitive microbiota. Time that the microbiota of the gastrointestinal tract of the bird could be competing with *Salmonella* sp.

The ability to shedding the bacteria is as important as counting the CFU to determine the level of shedding of bacteria in Japanese quail. The Group B showed a greater number of CFU / ml than group A in the first days of isolation. A similar result was found by Holt et al. (15) and Andrade et al.

(16), who found high counts of CFU / mL (10^6) 10 days after inoculation of *Salmonella* enteritidis in poultry, which this excretion decreased over time. This decrease was attributed to the bird's ability to produce active immunity to the bacteria because the ability of *S. Enteritidis* to colonize the gastrointestinal tract is related to innate immunity of the host and the genetic load of the species (17,18). These birds infected with *Salmonella* also transmitted to the eggs. The transmission may have occurred both in the formation of the egg (ovary and oviduct) (19), as in the passage of the egg through the cloaca of the bird that was eliminating *Salmonella* (20,21). Through the cloacal swabs identified an increased elimination of *S. Pullorum* at 03 dpi until 09 dpi in both groups. These results coincide with the transmission to the eggs, which were higher in those days. According to Keller et al. (22), birds with cloacal tissues with high infection may have contaminated eggs, but if there is a low rate of infection of the tissue samples will be eggs with low contamination. Eggs with shell dirty with feces positive for *Salmonella* may have contaminated the inner content because the penetration of bacteria through the pores of the egg, before the formation of cuticular protein layer, which prevents bacterial invasion of the eggs (23, 24, 25).

The infection of birds affected the production of eggs (before the inoculation was 80% and then was 50%), which is common in birds pulorose (26). This agree with Berchieri et al. (27) that after infection de *S. Pullorum* in adult laying hens, observed reduction in posture, but the infection was low in these birds, unlike observed in this experiment.

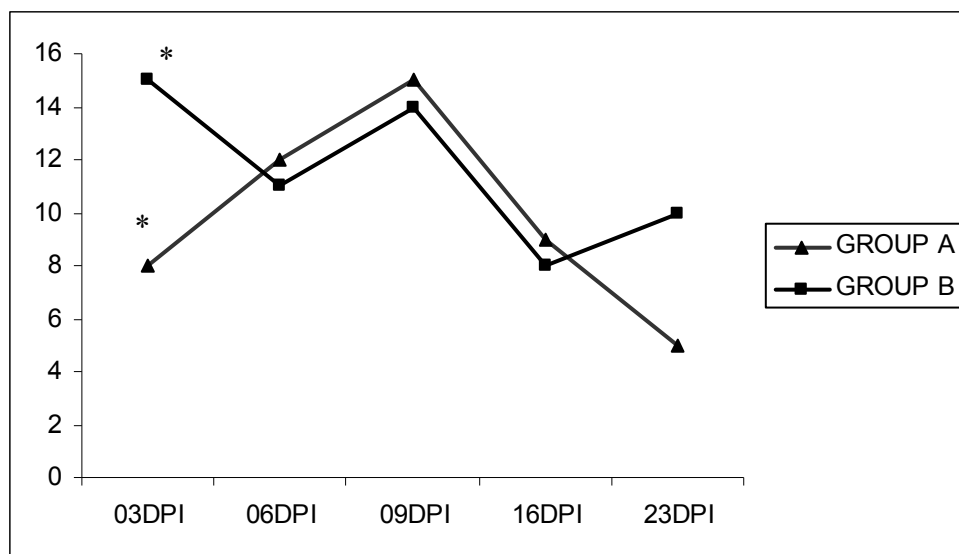
The infection of poultry produced high frequency of contaminated eggs (100%) to 09 dpi, which differs from that of Gast et al. (28) that after high dose inoculation of *S. Enteritidis* in laying hens, produced only 4.92% of whole eggs contaminated. A similar result was reported by Berchieri et al. (25) that using *S. Pullorum* obtained only 10 of 108 contaminated eggs collected.

Not only the absolute frequency of infection was also a high level of infection in eggs with an average of 200 CFU / mL in both groups, also showing divergent results of the literature in laying

hens. As reported by Reu et al. (23) who say that the level of infection of the egg is low, with an average of 20 CFU / egg.

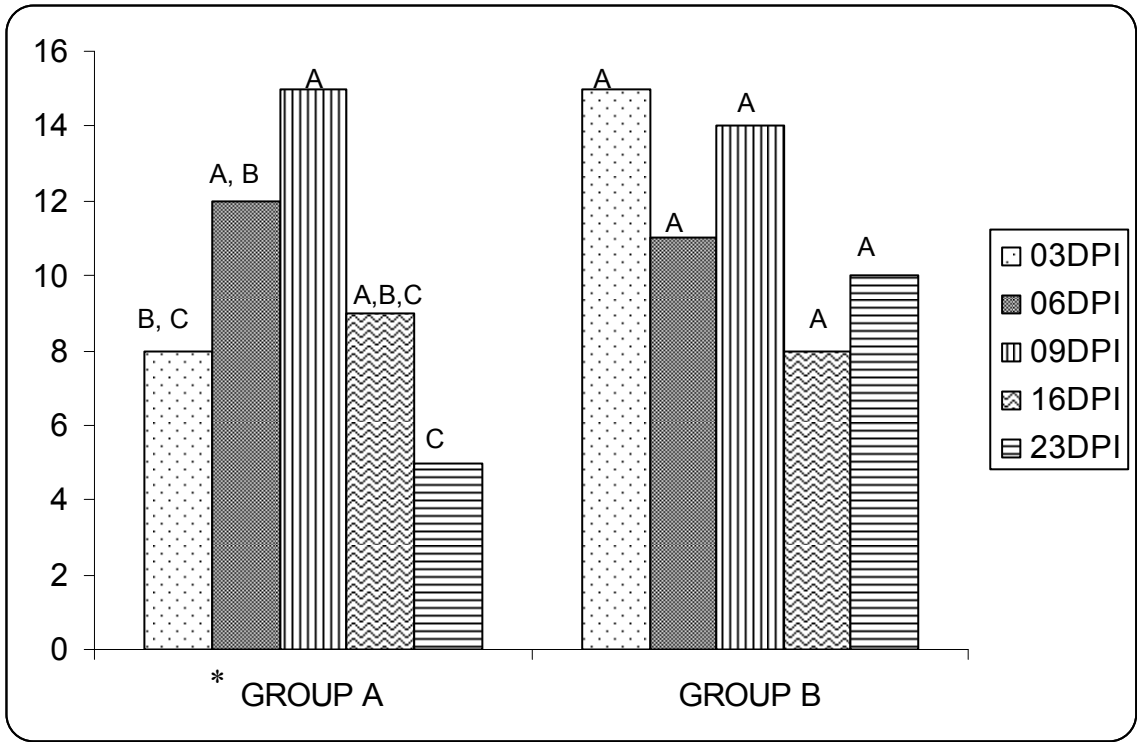
The data presented demonstrate that the *S. Pullorum* cause low mortality in adult Japanese quail, however there is a high elimination of bacteria in feces and therefore a constant transmission to the egg. Thus, should be made a rigid program control and detection of *S. Pullorum* in quails to prevent infection of products raising quail.

Figure 01 - Frequency absolute isolates of *S. Pullorum* in Japanese Quails swabs after collection on days 03, 06, 09, 16 and 30 postinoculation.



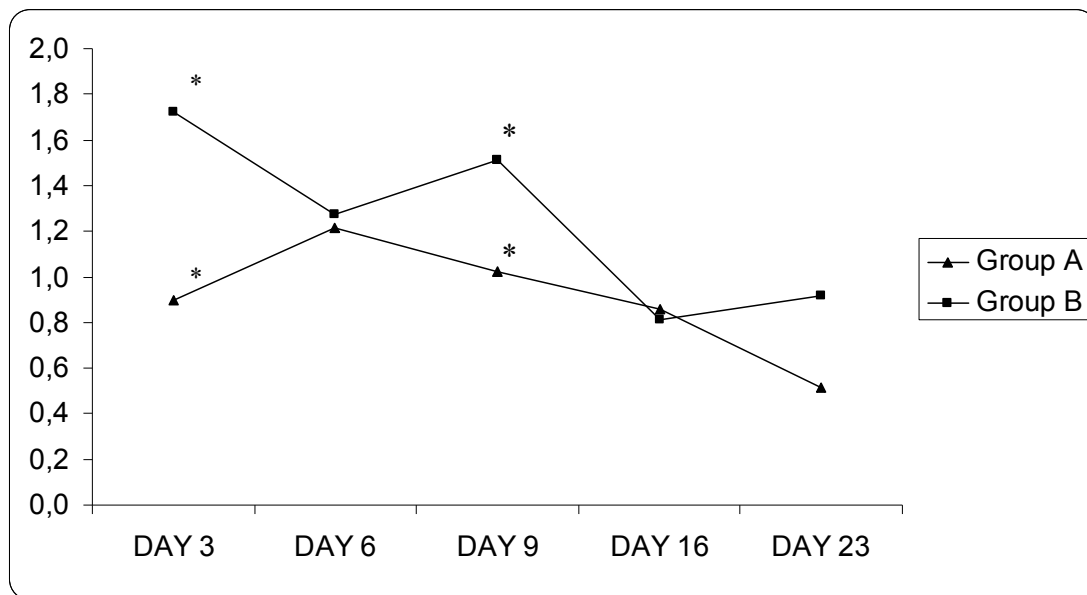
($p < 0,05$) * - Statistically different.

Figure 02 - Frequency absolute of isolation of *S. Pullorum* in Japanese quail divided into Group A and Group B.



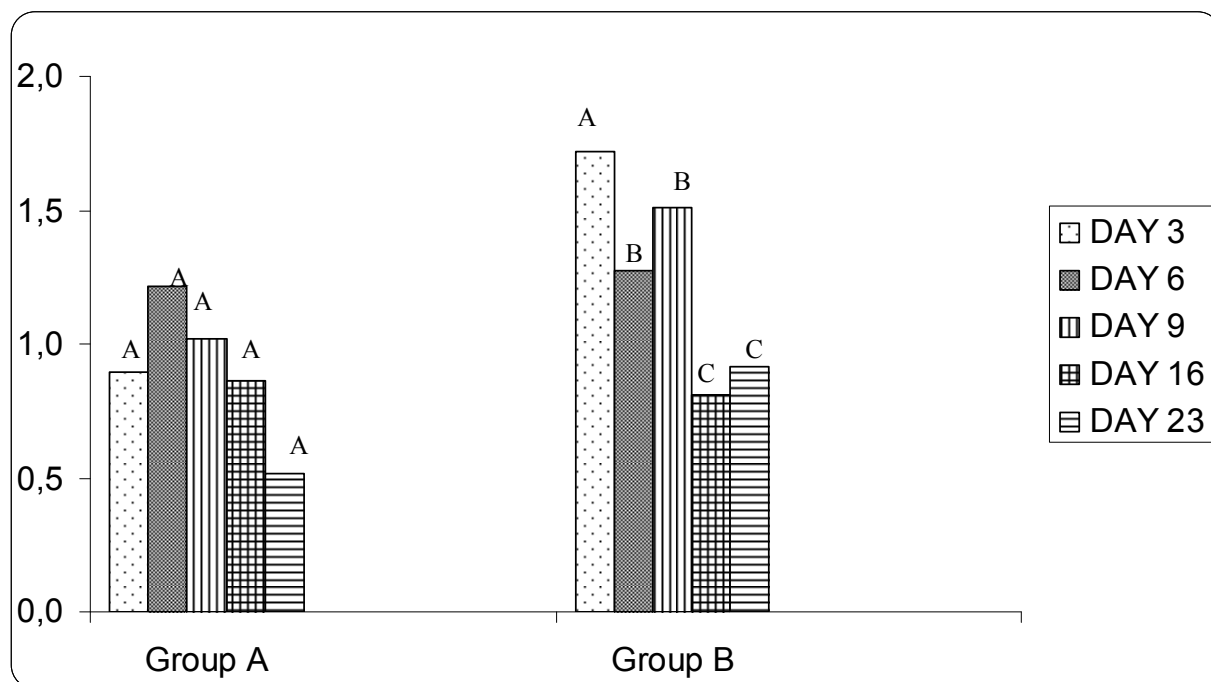
(p<0,05) * - Different letters represent different data in the same group

Figure 03 - Average number of colony forming units (CFU) of *S. Pullorum* in Japanese Quails swabs after collection on days 03, 06, 09, 16 and 23 post-inoculation.



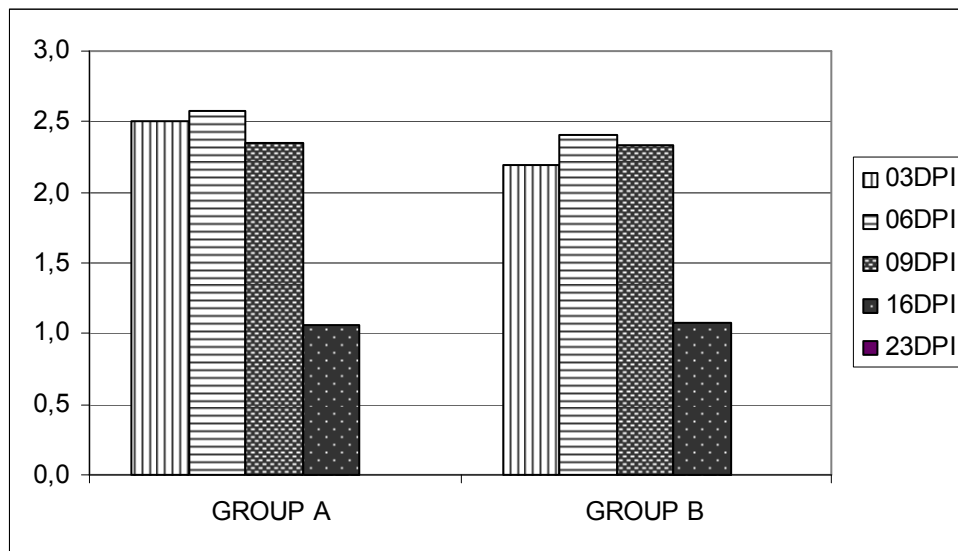
(p<0,05) * - statistical difference on the day of collection

Figure 04 - Average number of colony forming units (CFU) of *S. Pullorum* in Japanese quail divided into Group A and Group B.



(p<0,05) * - statistical difference on the same group

Figure 05 - Frequency absolute isolation of *S. Pullorum* in samples of eggs in Japanese quails divided into Group A and Group B.



($p < 0,05$)

5. REFERENCES

- 1- Oliveira NTE. Exigências de proteína bruta e energia metabolizável para codornas japonesas machos criados para a produção de carne. Arq Bras Med Vet Zootec. 2002;54:196-203.
- 2- Minvielle F. The future of Japanese quail for research and production. World's Poult Sci J. 2004;60:500-507.
- 3- Campos EJ. Avicultura: razões, fatos e divergências, 1th ed. Belo Horizonte: FEP-MUZ, 2000:244-272.
- 4- Shivaprasad HL. Fowl typhoid and pullorum disease. Rev Sci Tech. 2000;19:405–424.

5- Gama NMSQ. Biosecurity in quail farm [CD-ROM]. Lavras, Minas Gerais: I Simp Intern Coturnicultura, 2002.

6- Shivaprasad HL. Fowl typhoid Diseases of Poultry: World Trade and Public Health Implications Scientific and Technical Review, 1th ed. Paris, Office International des Epizooties, 2000:405–424.

7- Tortora GJ, Funk BR, Case CL. Microbiologia, 6th ed. Porto Alegre: Artmed, 2000:154-180.

8- Pinheiro LAS, Oliveira GH, Berchieri Jr A. Experimental *Salmonella enterica* serovar Pullorum Infection in two commercial varieties of laying hens. Avian Pathol. 2001;30:129–133.

9- Statistix, 2003. Statistix for Windows Manual. Copyright © 1985-2003. Analytical Software. Version 8.0.

10- Basnet HB, Kwon H-J, Cho AS-H, et al. Reproduction of Fowl Typhoid by Respiratory Challenge with *Salmonella Gallinarum*. Avian Dis. 2008;52:156–159.

11- Chacana PA, Terzolo HR. Protection Conferred by a Live *Salmonella Enteritidis* Vaccine Against Fowl Typhoid in Laying Hens. Avian Dis 2006;50:280–283.

12- Buchholz PS, Fairbrother A. Pathogenicity of *Salmonella* Pullorum in Northern Bobwhite Quail and Mallard Ducks. Avian Dis 1992;36:304-312.

- 13- Singh RV, Narayan R. Quail Production in Tropics [CD-ROM]. Minas Gerais, Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2000.
- 14- Avila LA, Nascimento FVP, Salle CTP, Moraes HLS. Effects of Probiotics and Maternal Vaccination on Salmonella Enteritidis Infection in Broiler Chicks. Avian Dis 2006;50:608–612.
- 15- Holt PS, Vaughn LE, Moore RW, Gast RK. Comparison of Salmonella enterica Serovar Enteritidis Levels in Crops of Fed or Fasted Infected Hens AVIAN DIS 2006;50:425–429.
- 16- Andrade MA, Mesquita AJ, Stringhini JH, et al. Excreção fecal de *Salmonella* Enteritidis em duas linhagens de frangos de corte. Ciênc Anim Bras 2007;8:757-765.
- 17- Barrow PA, Lovell MA. Experimental infection of egg-laying hens with Salmonella enteritidis phage type 4. Avian Pathol. 1991;20:335–348.
- 18- Kingsley RA, Baumler AJ. Host adaptation and the emergence of infectious diseases: the *Salmonella* paradigm. Mol Microbiol 2000;36:1006-1014.
- 19- Cornelius P. *Salmonella* Infections in the Domestic Fowl. In: Wray C, Wray A, eds. *Salmonella* in Domestic Animals. 1st ed. British Library, London, 2000:107-132.
- 20- Borland ED. *Salmonella* infection in poultry. Vet Rec. 1975;97:406–408.
- 21- Timoney Jf, Shivaprasad HI, Baker Rc Rowe B. Egg transmission after infection of hens with *Salmonella enteritidis* phage type 4. Vet Rec 1989;125: 600–601.

- 22- Keller LH, Benson CE, Krotec K, Eckroade RJ. *Salmonella enteritidis* colonization of the reproductive tract and forming and freshly laid eggs of chickens. *Infect Immun* 1995;07:2443-2449.
- 23- Reu K, Messens W, Heyndrickx M, Rodenburg TB Uyttendaele M Herman L. Reviews: Bacterial infection of table eggs. *World Poult Sci J* 2008;64:5-19.
- 24- Board RG. The course of microbial infection of the hen's eggs. *J Appl Microbiol.* 1966;29:319–341.
- 25- Forsythe RH, Ross WJ, Ayres JC. *Salmonella* recovery following gastrointestinal and ovarian inoculation in the domestic fowl. *Poult Sci.* 1967; 46: 849–855.
- 26- Shivaprasad HL.. Pullorum Disease and Fowl Typhoid. In: BARNES, HJ, Gross WB eds. *Disease of Poultry.* 11th ed. vol. 1. London: Mosby-Wolf Publication Ltd., 2000:568-582.
- 27- Berchieri AJr, Murphy CK, Marston K, Barrow PA. Observations on the persistence and vertical transmission of *Salmonella enterica* serovars Pullorum and Gallinarum in chickens: effect of bacterial and host genetic background, *Avian Pathol.* 2001;30:221– 231.
- 28- Gast RK, Holt PS (2001). Assessing the Frequency and Consequences of *Salmonella enteritidis* Deposition on the Egg Yolk Membrane. *Poult. Sci.* 80:997–1002.

7 CAPÍTULO 2

Avaliação da infecção de *Salmonella Pullorum* em Codornas japonesas (*Coturnix japonica*)

Evaluation of the infection of *Salmonella Pullorum* in Japanese Quails (*Coturnix japonica*)

Periódico: African Journal Microbiology

Resumo

Este trabalho foi realizado para verificar a infecção da *Salmonella Pullorum* em codornas japonesas infectadas experimentalmente. Para tanto 60 aves foram utilizadas. No grupo A inoculou-se uma solução com *S. Pullorum* na concentração de $1,5 \times 10^2$, no grupo B com $7,5 \times 10^9$ e no grupo C uma solução estéril. Após 03, 09, 16 e 30 dias pós-inoculação (dpi) foram coletados cecos com intestino, ovário com oviduto e fígado das aves tanto para o cultivo bacteriano, como para contagem das unidades formadoras colônias (UFC). Entre os grupos observou-se igualdade estatística, porém numericamente o grupo B apresentou maior isolamento nos 03 e 09 dpi. Até o final do experimento (16 e 30 dpi) as aves continuaram eliminando o patógeno. A contagem da UFC variou entre 2,53 a 2,3 em todos os dias de coleta e em todos os órgãos, entretanto o fígado apresentou um maior nível de infecção. Nas alterações macroscópicas houve várias alterações patológicas, ocorrendo esteatoses e pontos hemorrágicos no fígado, atresia folicular e gases nos cecos, entretanto a partir do 09 dpi houve um decréscimo absoluto nas alterações encontradas. Este estudo mostrou que a pulorose afeta os órgãos internos das codornas, porém em menor nível que em aves industriais.

Palavras-chave: Infecção, *Salmonella Pullorum*, Codornas japonesas.

ABSTRACT

This study was conducted to investigate the infection of *Salmonella Pullorum* in Japanese quails infected experimentally. For that 60 birds were used. Group A was inoculated with a solution *S. Pullorum* concentration of $1,5 \times 10^2$ in group B with $7,5 \times 10^9$ and in group C sterile solution. After 03, 09, 16 and 30 days post-inoculation (dpi) were collected intestinal with caeca, ovary with oviduct and liver of birds for the bacterial culture, and to count the colony forming units (CFU). Among the groups showed statistically equal but numerically the group B showed greater isolation in 03 and 09 dpi. By the end of the experiment (16 and 30 dpi) birds stopped shedding the pathogen. The count of CFU ranged from 2.53 to 2.3 on all days of collection and in all organs, however the liver showed a higher level of contamination. In the macroscopic changes were several pathological changes occurring fatty disease and hemorrhagic spots in the liver, follicular atresia and gases in the cecum, however from 09 dpi there was an absolute decrease in the alterations. This study showed that the pullorum disease affects the internal organs of the quail, but at a lower level in poultry products.

Key-words: Contamination, *Salmonella Pullorum*, Japanese quails

INTRODUCTION

The raising quail has evolved greatly in recent years, it is an excellent alternative as a source of food for human consume. Lately there has been a great increase not only the consume of quail eggs but also meat (Oliveira, 2002). This expansion deserves the attention of researchers in poultry in order to develop projects in various aspects of production and management, nutrition and protection against diseases (Minvielle, 2004).

According to Campos (2000), with increased productivity of the poultry industry becomes high risk, it depends on a biological balance between aggressive agents and resistance of the organism of the bird. Thus, for the better development of this activity should avoid the risk of bacterial infection in poultry.

The main contaminants of poultry to *Salmonella enterica* serovar Pullorum (SP) is a pathogen of great importance as it causes pullorum disease. An intense systemic disease in poultry industry and causing economic losses around the world, through mortality, morbidity and reduction in egg production. According Shivaprasad (2000), several other species of birds are also susceptible to pullorum disease such as quail, pheasants and ducks.

These birds may have changes in liver with white spots and petechial hemorrhages (Salem et al., 1992). Other researchers suggest that these changes are the result of a mechanism of pathogenicity of *S. Pullorum*, which are similar to other serovars of salmonella because they have the same virulence plasmid (Barrow, 1999). Although this mechanism is well known, the relationship between the pathogen and the bird is still poorly understood (Shivaprasad, 1997).

Thus, this study aims to evaluate the infection of the SP in the organs of Japanese quails, as well as, the pathological changes caused by this bacterium.

MATERIAL AND METHODS

Birds used in the experiment

We used 60 quails (*Coturnix japonica*) with 160 days of age and 70% of production housed in the shed of experimental infection of LABEO - (Ornithological Laboratory Studies).

We used two batteries of 16 cages (20 x 15 x 15 cm) per battery being housed 4 birds/cage. The birds received diet and natural mineral water *ad libitum* throughout the experiment. This experiment is in agreement with Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation of State University of Ceará (n° 08627875-4).

Preparation of samples

Preparation, purification and characterization of bacteria.

We used a strain *Salmonella* Pullorum (AT-1304) lyophilized and kept at a temperature of 20 °C below zero, provided by the Instituto Oswaldo Cruz. This was sown in 0.85% saline solution to transfer to a plate containing nutrient agar for conservation, for 18h at 37 °C. After that, a single colony was collected and transferred to a test tube containing 10 mL of Tryptic soy broth overnight at 37 °C, this culture was diluted in series in 8 tubes. Was streaked 0.1 mL of this solution on plates containing agar brilliant green-(AVB) white novobiocin (NOV) to the concentration of 20 µg/mL (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). These plates were incubated in bacteriological incubator at 37 °C overnight, after this period of the colony forming units (CFU) were counted and the concentrations of each tube were determined (TORTORA et al., 2000).

Control of bacterial birds

Three weeks prior to inoculation were performed the rapid whole-blood (WB) test in all 60 birds. After that 21 individual cloacal swabs were collected in randomly selected birds, for the bacteriological examination. Then were transported in sterile test tubes and sent to LABEO.

Experimental Test

Infection

For the experimental infection in each bird received orally 0.5 mL containing the concentration of 7×10^8 for birds in group A and 1.5×10^2 for the birds of group B. For this procedure using a 500- μ L micropipette adjusted to a urethral probe.

Collection of samples

Organs

Were sacrificed two birds in each group on days 03, 09, 16 and 30 post-infection (DPI). These birds were sacrificed by cervical dislocation and necropsied. During the study were evaluated the pathological changes. The parameters considered were the shape, color, size, texture, odor and the presence or absence of visible lesions. After, they were photographed and collected samples of each bird. 6 samples were collected liver, 6 samples of the reproductive system (ovary and oviduct) and 6 more caeca with intestines, corresponding to 24 samples in total.

The organs were removed aseptically and placed in individual sterile plastic bags, then they were soaked to the achievement of microbiological tests.

Microbiological procedure

Organs

Each organ was collected one gram and passed on a this alíquota to 9 ml of Selenite-Cystine broth (Oxoid) and carried out the microbiological procedures. The broths were incubated at 37 ° C for

24 hours, after then it was plated on to Brilliant Green Agar with Novobiocin concentration of 20 mg / mL (AVB-Nov) and again transferred to a bacteriological incubator.

The plates were incubated at 37°C for 24 h and up to five suspect *Salmonella* colonies were picked from each plate to triple sugar iron (tsi - Merck), agar-agar inclined lysine iron (read - Himede) agar and SIM (sulfide, indole and motility - ® Oxoid). Following overnight incubation at 37°C, presumptive *Salmonella* isolates confirmed serologically with antiserum somatic "O" and flagellar "H".

Counting of colony forming units.

From each plate AVB-NOV, was counted the number of colony forming units (CFU). The number of each plate was converted to $\log_{10}X+1$.

Statistical Analysis

The data were analyzed by software Statistix 8.0 (2003). The data will initially be submitted to the Kolmogorov-Smirnov and Shapiro-Wilk, for confirmation of normality of distribution, and the Bartlett test to verify the homogeneity of variance between treatments. The results were submitted to analysis of variance using the general linear model (GML).

The results for the colony forming units of (UFC) were transformed into $\log_{10}x +1$ and the means were compared by non-parametric test of Kruskal-Wallis. The samples of organs were analyzed by the Fisher exact test. All data were subjected to a significance level of 5%.

Table 01 – Count of Colony Forming Units (CFU) transformed in Log 10, samples of organs and the corresponding days.

03 DPI *				09 DPI			
Nº positive/Nº isolated	LIVER Log 10 (CFU/g)	OVÁRY + OVIDUCT Log 10 (CFU /g)	CAECUM + INTESTINE Log 10 (CFU /g)	Nº positive/Nº isolated	LIVER Log 10 (CFU /g)	OVÁRY + OVIDUCT Log 10 (CFU/g)	CAECUM + INTESTINE Log 10 (CFU/g)
GROUP A	2,46	2,38	-		1,70	2,51	2,33
(3/6)	2,36	-	-	(4/6)	2,33	-	-
GROUP B	2,18	2,50	2,41		1,84	2,52	2,52
(5/6)	2,53	-	2,37	(6/6)	2,21	1,89	2,44
16 DPI				30 DPI			
	LIVER	OVÁRY + OVIDUCT	CAECUM + INTESTINE		LIVER	OVÁRY + OVIDUCT	CAECCUM + INTESTINE
GROUP A	2,03	2,17	-		2,31	-	-
(3/6)	-	2,30	-	(1/6)	-	-	-
GROUP B	-	2,42	-		-	2,31	-
(1/6)	-	-	-	(1/6)	-	-	-

RESULTS AND DISCUSSION

The isolation birds was 100% in the first collection day in the liver. Noting the high infection of bacteria with rapid contagion, a result also reported by Pinheiro et al. (2001), which after infection of *S. Pullorum* in poultry infection observed, in the first week of collection, especially in organs like the liver and spleen. Deshmukh et al. (2005a) also isolated up to 14 days post-infection in samples of liver and spleen, but these researchers infected *S. Gallinarum* in bob-white quail, reaching a isolation of 100% of the birds.

Among the groups showed statistically equal, though numerically the group B was superior in the 03 and 09 post-infection (Table 01) found a similar result by Avila et al. (2006), that after inoculation of *S. Enteritidis* in laying hens isolated all the bacteria in their samples of liver. However in two other groups with lower doses of inoculation the isolation was lower in the sample of liver. These results suggest that a systemic infection in the bird depends on the dose used in an experimental infection.

Experimental infection determined a carrier state of the birds, because by the end of the study was isolated the bacterium from samples, even with a decrease in isolation, after 16 and 30 dpi (Table 01). Wigley et al. (2005) also observed a decrease in the isolation of *S. Pullorum*, in liver and oviduct of laying hens, after 9 weeks of experimental infection. These authors also isolated the pathogen until 22 weeks post-infection, suggesting the carrier status of salmonellosis by birds with high risk of infection of eggs.

The count of colony forming units (CFU) was also performed to verify the level of infection in the organs. Among the samples collected, the liver, the reproductive tract (ovary + oviduct) and the digestive tract (intestine + cecum) showed low average bacterial count (Table 01). The mean CFU in other studies of experimental oral infection in laying hens varied from 3 to 5 CFU / g (Berchieri et al., 2001) in the first week, but this study the infection ranged from 2.53 to 1.7 in all collection days and in all organs. These results indicate that the high infection occurs in serovars like *S. Pullorum* and *S. Gallinarum*, but pullorum disease infection is lower in Japanese quail.

In other studies in hens, there was no difference in bacterial isolation, in the four days post-infection even using different serovars and infection for intravenous route (Gantois et al., 2008). However, in Japanese quail, the level of CFU was constant throughout the work by changing only the number of isolates (Table 1). Berchieri et al. (2001) also reisol *S. Pullorum* in samples of the caecum

and liver, after high dose of oral infection in hens. Results similar was reported in this study, because it showed a infection and isolation greater in liver than in the cecum, this result suggests that the microorganism of the gastrointestinal tract competed with the salmonella and decreases the infection in this organ. (Nuotio et al., 1992). Second, Avila et al. (2006) after a lower dose of infection, the bird can, after a suitable period, provide a more competitive microorganism. Time that the microorganism of the intestinal the bird could be competing with *Salmonella* sp ..

Pinheiro et al. (2001) also reported a greater isolation in the liver, followed by ovary and oviduct, after inoculation with two lines of laying hens they reported a result similar to that found in this work.

However, from 09 dpi there was a decrease in absolute isolation and level of infection of poultry (Table 01). Deshmukh et al. (2005b) reported that from 10 dpi quails show a substantial increase in the number of heterophils in the blood. Because heterophils are the first line of defense against bacteria and it was from this stage that there was a decrease in bacterial infection to the end of the experiment.

These infected organs showed pathological changes. The most common changes were the presence of gases in the caecum and intestines, liver steatosis and hemorrhage. The cecum and liver were the most affected organs, resulting in 100% of any present macroscopic lesion. Barcelos (2005) also showed high infection (33%) in the livers of birds in slaughterhouses, and white spots and the light areas the main changes to the sentencing of chickens.

These lesions occurred in large numbers in the first day of collection (3 dpi) (Table 02). During the experiment there was a decrease in the pathologic findings in necropsy, occurring fewer lesions in the liver of birds. A similar result also reported by Deshmukh et al. (2005a) that after infection of *S. Gallinarum* in Japanese quail found a peak of lesions on day 6 post-infection.

The data presented demonstrate that the *S. Pullorum* can infect the internal organs of the quail, but in lower level that the commercial laying hens. However, after a certain period, the birds reach a state carrier the pullorum disease. Thus it is extremely important the microbiological tests constant in poultry companies to maintain a high level in raising quail.

Table 02 – Gross lesions in organs collected in their days.

	Liver	Ovary + Oviduct	Caecum + Intestine
	Steatosis (3/6)		
03 dpi	White Spots (3/6) Enlargement(2/6)	Follicular Atresia (4/6)	Gases (5/6)
	Hemorrhage (1/6)		
	Steatosis (3/6)		
09 dpi	White Spots (3/6) Enlargement (4/6)	Follicular Atresia (2/6)	Gases (5/6)
	Hemorrhage (2/6)		
16 dpi	Steatosis (1/6)	—	Gases (5/6)
30 dpi	White Spots (2/6) Hemorrhage (1/6)	—	Gases (1/6)

REFERENCES

- Avila LA, Nascimento FVP, Salle CTP, Moraes HLS (2006). Effects of Probiotics and Maternal Vaccination on Salmonella Enteritidis Infection in Broiler Chicks. *Avian Dis.* 50:608–612.
- Barcelos AS (2005). Avaliação macroscópica, histopatológica e bacteriológica de fígados de frangos (*Gallus gallus*) condenados no abate pela inspeção sanitária. Phd dissertation, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brasil.
- Barrow PA (1999). Salmonella in poultry – problems and new thoughts on the possibilities of control. *Br. Poult. Sci. J.* 1:9–16.
- Berchieri AJr, Murphy CK, Marston K, Barrow PA (2001). Observations on the persistence and vertical transmission of Salmonella enterica serovars Pullorum and Gallinarum in chickens: effect of bacterial and host genetic background. *Avian Pathol.* 30:221– 231.
- Campos EJ (2000). Avicultura: razões, fatos e divergências, In: Campos (eds), Brazil FEP-MUZ, pp 244-272.
- Deshmukh S, Asrani RK, Ledoux DR, Jindal N, Bermudez AJ, Rottinghaus GE, Sharma M, Singh SP (2005a). Individual and Combined Effects of Fusarium moniliforme Culture Material, Containing Known Levels of Fumonisin B1, and Salmonella Gallinarum Infection on Liver of Japanese Quail. *Avian Dis.* 49:592–600.
- Deshmukh S, Asrani RK, Jindal N, Ledoux DR, Rottinghaus GE, Sharma M, Singh SP (2005b). Effects of Fusarium moniliforme Culture Material Containing Known Levels of Fumonisin B1 on

Progress of *Salmonella Gallinarum* Infection in Japanese Quail: Clinical Signs and Hematologic Studies. *Avian Dis.* 49:274–280.

Gantois I, Eeckhaut V, Pasmans F, Haesebrouck F, Ducatelle R, Van Immerseel F (2008). A comparative study on the pathogenesis of egg infection by different serotypes of *Salmonella*. *Avian Pathol.* 37:399-406.

Minvielle F (2004). The future of Japanese quail for research and production. *World's Poult. Sci. J.* 60:500-507.

Nuotio L; Schneitz C; Halonen U, Nurmi E (1992). Use of competitive exclusion to protect newly-hatched chicks against intestinal colonisation and invasion by *Salmonella enteritidis* PT4. *Br. Poult. Sci. J.* 33:775 - 779

Oliveira NTE (2002). Exigências de proteína bruta e energia metabolizável para codornas japonesas machos criados para a produção de carne. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 54:196-203.

Pinheiro LAS, Oliveira GH, Berchieri Jr A (2001). Experimental *Salmonella enterica* serovar Pullorum Infection in two commercial varieties of laying hens. *Avian Pathol.* 30:129– 133.

Salem M, Odor EM, Pope C (1992). Pullorum disease in Delaware roasters. *Avian Dis.* 36:1076–1080.

Shivaprasad HL. (1997). Pullorum disease and fowl typhoid. In: Calnek BW (Ed.), *Diseases of Poultry*, Iowa Ames: State University Press, pp 82 – 96.

Shivaprasad HL (2000). Fowl typhoid and pullorum disease. *Rev. Sci. Tech.* 19:405–424.

Statistix, (2003). Statistix for Windows Manual. Copyright © 1985-2003. Analytical Software. Version 8.0.

Tortora GJ, Funk BR, Case CL. Bactérias. In: TORTORA, G.J. *Microbiologia*. Porto Alegre: Artmed, 2000. p. 295-319.

Wigley P, Hulme SD, Powers C, Beal RK, Berchieri Jr. A, Smith A, Barrow P. (2005). Infection of the Reproductive Tract and Eggs with *Salmonella enterica* Serovar Pullorum in the Chicken Is Associated with Suppression of Cellular Immunity at Sexual Maturity. *Infect. Immun.* 73:2986–2990.

8 CONCLUSÕES

As codornas japonesas apresentaram certa resistência a pulorose, tanto pela ausência de mortalidade como pelo quadro assintomático apresentado. Todavia, ocorreu uma alta eliminação do patógeno nas fezes e nos ovos, como também um alto nível de infecção nos órgãos internos, principalmente, nos primeiros dias pós-infecção. Apesar da SP ter infectado rapidamente a ave, houve uma diminuição dos isolamentos no decorrer do experimento, tanto nos órgãos internos como nos suabes e ovos.

9 PERSPECTIVAS

Nossos resultados deixam informações para um aprimoramento da defesa sanitária na coturnicultura, pois tenta esclarecer a transmissão e infecção da pulorose em codornas japonesas. Porém são necessários estudos mais aprofundados desta enfermidade em codornas, principalmente, na área de imunologia e patogenia para assim obter uma maior compreensão do desenvolvimento claro da pulorose nestas aves. Desta forma, criar uma conscientização dos profissionais da área avícola e em especial os da cortunicultura, para um melhor desenvolvimento sanitário desta atividade.

10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AABO, S. et al. Quantitative comparison of intestinal invasion of zoonotic serotypes of *Salmonella enterica* in poultry. *Avian Pathology*, v. 31, n. 1, p. 41 - 47, 2002.

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.

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

BAILEY, J.S.; COX N.A.; BERANG, M.E. Hatchery - Acquired *Salmonella* in Broiler Chicks. *Poultry Science*, v. 73, n. 7, p. 1153-1157, 1994.

BARROW, P.A. *Salmonella* control-past, present and future. *Avian Pathology*, v. 22, n. 4, p. 651-669, 1995.

BARROW, P.A. *Salmonella* em Avicultura – Problemas e Novas Idéias Sobre Possibilidades de Controle. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*, Campinas, v.1, p. 09-16, 1999.

BARROW, P.A.; LOVELL, M.A. Experimental Infection of Egg-Laying Hens with *S. enteritidis* Phage Type 4. *Avian Pathology*, Londres, v. 20, n. 2, p. 3353-348, 1991.

BARROW, P.A.; SIMPSON, J.M.; MARGARET, A.L. Intestinal colonisation in the chicken by food-poisoning salmonella serotypes; Microbial characteristics associated with faecal excretion. *Avian Pathology*, v. 17, n. 3, p. 571-588, 1988.

BAÚ, et al. Prevalência de Salmonella em Produtos de Frangos e Ovos de Galinha Comercializados em Pelotas, RS, Brasil. *Ciência Rural*, v. 31, n. 2, p. 303-307, 2001.

BÄUMLER A.J.; HARGIS B.M.; TSOLIS R.M. Tracing the origins of Salmonella outbreaks, *Poultry Science*, 2000, v. 287, n. 5450, p. 50-52, 2000:

BERCHIERI JR., A. Salmoneloses Aviárias. In: *Doenças das Aves*, Facta, Campinas – SP, p. 185-196, 2000.

BERCHIERI JR., A. et al.. Infecção por Salmonela em farinhas de origem animal utilizadas no preparo de ração. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, Rio de Janeiro, v. 41, n. 3, p. 83-88, 1984.

BERCHIERI JR., A.; BARROW, P.A. Patologias e métodos diagnósticos de SE em aves. In.: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, Curitiba. *Anais... Campinas: FACTA*, p. 1-5,1995.

BERTECHINI, A.G. 2002, AviSite reportagens especiais. Disponível em: <http://www.avisite.com.br/reportagem/simp_coturnicultura/default.asp> Acesso em: 24 de março de 2007.

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

BRESSAN, M.C.; ROSA, F.C. Processamento e industrialização de ovos de codorna. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE COTURNICULTURA, 01, *Anais... Lavras*: UFLA, Lavras, p. 85-96, 2002.

BUCHHOLZ, P.S.; FAIRBROTHER A. Pathogenicity of *Salmonella* Pullorum in Northern Bobwhite Quail and Mallard Ducks. *Avian Diseases*, v. 36,n. 2, p. 304-312, 1992.

CAMPOS, E.J. *Avicultura: razões, fatos e divergências*, In: Campos (eds), Brazil FEP-MUZ, p. 244-272, 2000.

CAMPOS, L.C. *Salmonella*. In. TRABULSKI, L.R.; et al.. 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, n. 3, p. 583-588, 1994.

COOPER GL, NICHOLAS RA, RACEWELL CD. Serological and bacteriological investigations of chickens from flocks naturally infected with *Salmonella enteritidis*. *The Veterinary Record*, v. 125, n. 23, p. 567 – 572, 1989.

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.

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*. Dissertação

(Mestrado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Universidade Estadual Paulista (UNESP), Jaboticabal, São Paulo, p. 82, 1996.

COX, N. A.; et al. Presence and impact of Salmonellae infection in the commercial integred broiler hatchery. *Poultry Science*, v. 69, n. 9, p.1606 – 1609, 1990.

DESHMUKH A.R.K. et al. Effects of Fusarium moniliforme Culture Material Containing Known Levels of Fumonisin B1 on Progress of Salmonella Gallinarum Infection in Japanese Quail: Clinical Signs and Hematologic Studies. *Avian Diseases*, v. 49, n. 2, p. 274-280, 2005.

DESHMUKH G.S. et al. Individual and Combined Effects of Fusarium moniliforme Culture Material. *Avian Diseases*, v. 49, n. 4, p. 592-600, 2005.

FRANCO, B.D.G.M; LANDGRAF M. T. D. *Microbiologia dos Alimentos*. São Paulo, Ed. Atheneu, p. 27-171, 1996.

FUJIKURA, W.S. Situação e perspectivas da coturnicultura no Brasil. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE COTURNICULTURA, 01, *Anais...* Lavras: UFLA, Lavras, p. 01-10, 2002.

FULLER, R. Ecological studies on the lactobacillus flora associated with the crop epithellium of the fowl. *Journal of Applied Bacteriology*, v. 36, n 1, p. 131-139, 1973.

FURLAN, A.C.; ANDREOTTI, M.O.; MURAKAMI; A.E.Valores energéticos de alguns alimentos para codornas japonesas (*Cotunix cotunix japonica*). *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 27, n. 6, p.114-118, 1998.

GAMA, N.M.S.Q. Pesquisa de coliformes cotais e coliformes fecais analisados em ovos comerciais no laboratório de patologia avícola de Descalvado. *Arquivo do Instituto Biológico*, v. 68, n. 1, p. 19-22, 2001.

GAST, R.K.; BEARD, C.W. Production of *Salmonella enteritidis* contaminated eggs by experimentally infected hens. *Avian Diseases*, v. 34, n. 2, 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, n. 7, p. 997-1002, 2001.

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

GIRÃO, F.G.F. et al. Isolamento de *Salmonella* em matérias primas, rações e materiais colhidos de aves com problemas sanitários. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 37, n. 3, p.249-256, 1985.

HARGIS, B.M. et al. Evaluation of the chicken crop as a source of *Salmonella* infection for broiler carcasses. *Poultry Science*, v. 74, n. 9, p. 1548-1552, 1995.

HENZLER, D.J.; OPITZ, H.M. The Role of mice in the epizootiology of *Salmonella enteritidis* infestation on chicken layer farms. *Avian Diseases*, v. 36, n. 3, p. 625-631, 1992.

HINTON, M. *Salmonella* infection in chicks following the consumption of artificially contaminated feed. *Epidemiology and Infection*, v. 100, n. 2, p. 247-256, 1988.

HINTON, M.; THRELFALL, E.J.; ROWE, B. The invasive potential of *Salmonella enteritidis* phage types for young chickens. *Letters in Applied Microbiology*, v. 10, n. 6, p. 231 - 239, 1990.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE, Pesquisa Agropecuária brasileira, In:< <http://ibge.br/pesquisaagropecuariabrasileira>, (2001)

JOHNSON, S. et al. Results of salmonella isolation from poultry products, poultry, poultry environment, and other characteristics. *Avian Diseases*, v.47, n. 1, p.17-24, 1992.

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

KELLER, L.H. et al. Invasion of Chicken Reproductive Tissues and Forming Eggs Is Not Unique to *Salmonella enteritides*. *Avian Diseases*, v. 41, n. 3, p. 535-539, 1997.

KELLY, C.G.; YOUNSON, J. S. Anti-adhesive strategies in the prevention of infectious disease at mcosal surfaces. *Expert Opinion Investigational Drugs*, v. 9, n. 8, p. 1711 - 1821, 2000.

LAX, A.J. et al. Current Perspectives in Salmonellosis. *British Veterinary Journal*, v. 151, n. 4, p. 351-377, 1995.

LISTER, S.A. *Salmonella enteritidis* in broilers and broiler breedrs. *The Veterinary Record*, v. 123, n. 13, p. 350-351, 1988.

LOCKMAN, H.A.; CURTIS, R. Isolation and characterisation of conditional adherent and non-type 1 fimbriated *Salmonella typhimurium* mutants. *Molecular Microbiology* , v. 6, n. 7, p. 933 – 945, 1992.

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 Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2000.

McCULLOUGH N.; EISELE C.W. Experimental human salmonellosis. IV. Pathogenicity of strains of *Salmonella pullorum* obtained from spray-dried whole egg. *Journal of Infection Diseases*, v. 89, n. 3, p. 259-265, nov./dez. 1951.

METHNER, V.; AL – SHABIBI, S.; MEYER, H. Infection model for hatching chicks infected with *Salmonella enteritidis*. *Journal of Veterinary Medicine, Series B.*, v. 42, n. 8, p.471-480, 1995.

MIYAMOTO, T. et al. *Salmonella enteritides* Infection of Eggs from Hens Inoculated by Vaginal, Cloacal, and Itravenous Routes. *Avian Diseases* , v.41, n. 2, p. 296-303, 1997.

MULDER, R.W.A.W. Prevencion y Control de los Microorganismos Patogénicos en la Industria Avícola. In: SYMPOSIUM DE LA SECCIÓN ESPAÑOLA DE LA WPSA, 32., 1995. Barcelona. *Anais...*Barcelona: Fira Barcelona , 1995. p 137 – 144.

NAKAMURA, M. et al. The effect of the flow of air on horizontal transmission of *Salmonella enteritidis* in chickens. *Avian Diseases*, v. 41, n. 2, p. 354-360, 1997.

NASCIMENTO, V.P. et al. Qualidade microbiológica dos produtos avícolas. In: SIMPÓSIO GOIÂNIO DE AVICULTURA, 2., 1996, Goiânia. *Anais...*Goiânia: Escola de Veterinária da UFG 1996. p. 13-17.

NICHOLAS, R.A.; CULLEN, G.A.; DUFF, P. Detection of Salmonella. *The Veterinary Record*, v. 126, n. 6, p. 147, 1991.

OLIVEIRA, E.G. Pontos críticos no manejo e nutrição de codornas. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO E NUTRIÇÃO DE AVES E SUÍNOS E TECNOLOGIA DA PRODUÇÃO DE RAÇÕES, 1., 2001, Campinas. *Anais...* Campinas: CBNA, 2001. p. 71-96.

OLIVEIRA, N.T.E. Exigências de proteína bruta e energia metabolizável para codornas japonesas machos criados para a produção de carne. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 54, n. 2, p. 196-203, 2002a.

OLIVEIRA, N.T.E et al. Exigências de proteína bruta e energia metabolizável para codornas japonesas criadas para produção de carne. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 31, n. 2, p. 675-686, 2002b.

OLIVEIRA, S. J. Salmonella. In: Guerreiro et al. (Org.). *Bacteriologia Especial*. 1 ed. Porto Alegre: Sulina, 1984, v. 14, p. 162-177.

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.

POPIEL, I.; TUMBULL, P.C.B. Passage of *Salmonella enteritidis* and *Salmonella thompson* through chick ileocaecal mucosa. *Infection and Immunity*, v. 47, n. 3, p. 786-792, 1985.

RIBEIRO, M.G. et al. Infecção do trato urinário em cão por *Salmonella enterica* sorotipo Enteritidis. *Clínica Veterinária*, v. 8, n. 43, p. 30-37, 2003.

ROCA, F.L. *Enfermedades bacterianas por germen grampositivos y esporulados: Tuberculosis: Higiene y patología aviares*. 1 ed. Barcelona : Tecnograf, 1991, p. 421.

RODRIGUES, D.C.; TAUXE, R.V.; ROWE, B. International increase in *Salmonella enteritidis*: A new pandemic? *Epidemiology and Infection*, v. 105, n. 1, 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*, Campinas – SP: FACTA, 2000. p. 01 – 12,

SATO, Y. et al. Status of *Salmonella gallinarum-pullorum* infections in poultry in Zambia. *Avian Diseases*, v. 41, n. 2, p. 490-495, 1997.

SCHARR, H. Controle de *Salmonella* na União Européia. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2003, n.21, Campinas: FACTA, 2003. p. 358 - 368.

SEO, K.H. et al., Elimination of Early *Salmonella enteritidis* Infection After Treatment with Competitive-Exclusion Culture and Enrofloxacin in Experimentally Infected Chicks. *Poultry Science*, v. 79, n. 10, p. 1408-1413, 2000.

SHIVAPRASAD, H.L. Fowl typhoid and pullorum disease. *Revue Scientifique et Technique*, v.19, n. 2, p. 405-424, 2000.

SHIVAPRASAD, H. L. et al. Pathogenesis of *Salmonella enteritidis* Infection in Laying Chickens. I. Studies on Egg Transmission, Clinical signs, Fecal Shedding, and Serologic Responses. *Avian Diseases*, v. 34, n. 3, p. 548-557, 1990.

SILVA, E.N. Salmonelose: problemas atuais de patologia aviária e saúde pública. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, n.9, 1991, Campinas. *Anais... Campinas: FACTA*, 1991. p. 37-47.

SILVA, E.N.; DUARTE, A. *Salmonella enteritidis* em Aves: Retrospectiva da Situação Atual. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, n.20, 2002, Campinas. *Anais... Campinas: FACTA*, 2002. p. 215-232.

SNOEYENBOS, G.H.. Pullorum Disease. In: CALNEK, B.W. *Diseases of Poultry*. Iowa: Iowa State University Press, 1991. p. 73-86.

SOEJARDI, A.S. et al. Adherence of salmonellae and native gut microflora to the gastrointestinal mucosa of chicks. *Avian Disease*, v. 26, n. 3, p. 576-584, 1982.

SPRINGER, W.T.; POURCIAU, S.S. Frequency And Duration Of Paratyphoid Organism Shedding by Experimentally Infected Bobwhite Quail (*Colinus Virginianus*). *Journal of Wildlife Diseases*, v. 14, n. 2, abril 1978.

TANNOCK, G. W.; SMITH, J.M.B. A *Salmonella* carrier state involving the upper respiratory tract of mice. *Journal of Infectious Diseases*, v. 123, n. 4, p. 502-506, 1971.

THIAGARAJAN, D.; SAEED, A.M.; ASEM, E.K. Mechanism of transovarian transmission of *Salmonella enteritidis* in laying hens. *Poultry Science*, v. 73, n. 1, p.89-98, 1994.

TIETJEN, M.; FUNG, D.Y.C. Salmonellae and food safety. *Critical Review of Microbiology*, v. 21, n. 1, p. 53-83, 1995.

TORTORA, G.J.; FUNK, B.R.; CASE C.L. Bactérias. In: TORTORA, G.J. *Microbiologia*. Porto Alegre: Artmed, 2000. p. 295-319.

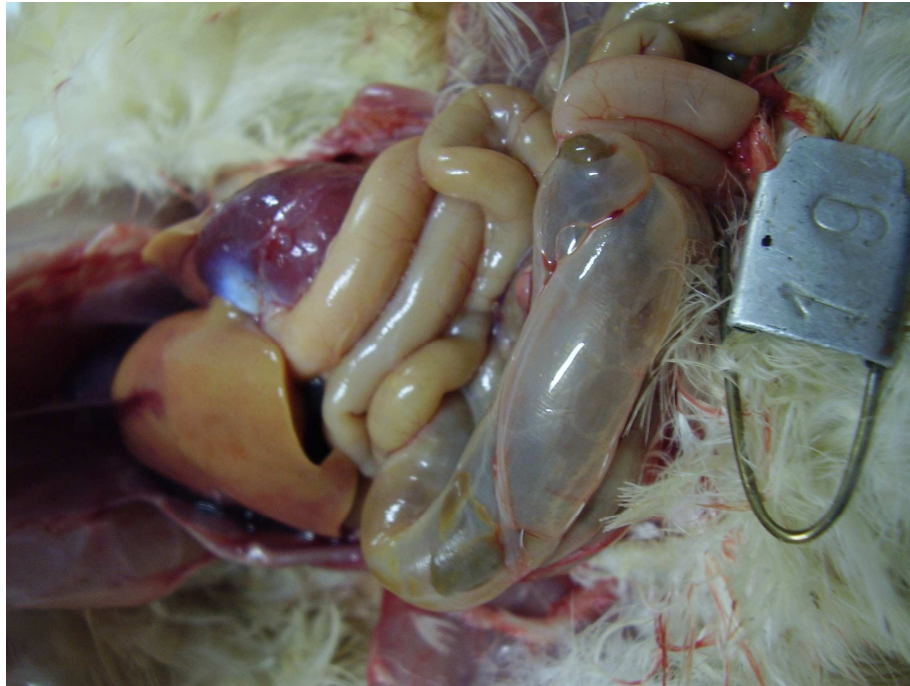
TURNER A.K. et al. Identification of *Salmonella* Typhimurium genes required for colonization of the chicken alimentary tract and for virulence in newly hatched chicks. *Infection and Immunity*, v. 66, n. 5, p. 2099 - 2106, 1998.

WIGLEY, P. et al. Infection of the Reproductive Tract and Eggs with *Salmonella enterica* Serovar Pullorum in the Chicken Is Associated with Suppression of Cellular Immunity at Sexual Maturity. *Infection and Immunity*, v. 73, n. 5, p. 2986-2990, 2005.

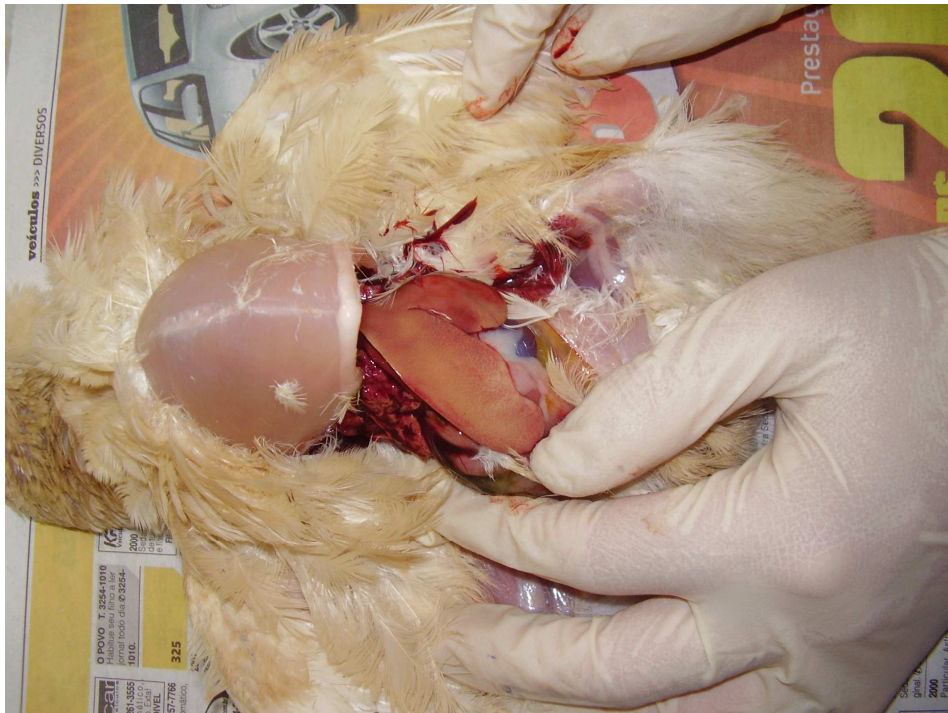
WILLIAMS, J.E.; DILLARD L.H.; HALL G.O. The penetration patterns of *Salmonella typhimurium* through the outer structures of chicken eggs. *Avian Diseases*, v. 12, n. 3, p. 445-466, 1968.

11. APÊNDICE A

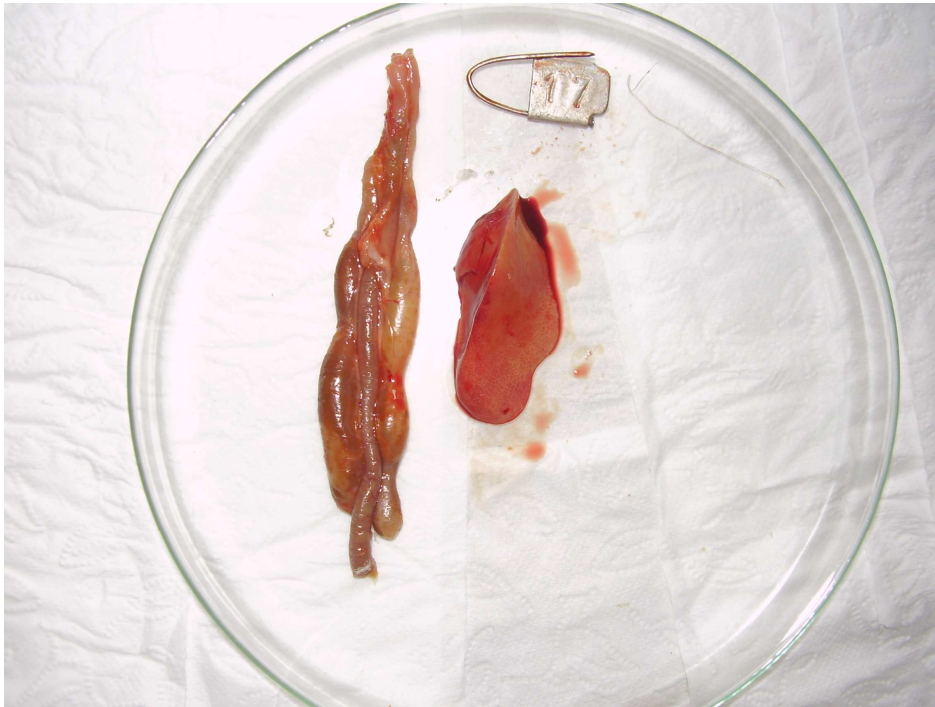
Necropsia de ave do Grupo A



Necropsia de ave do Grupo B



Fígado e intestino + cecos de ave do Grupo A



Fígado e intestino + cecos de ave do Grupo B

