

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**TEMPO DE PENETRAÇÃO DA *Salmonella* Heidelberg  
ATRAVÉS DA CASCA DE OVOS COMERCIAIS  
BRANCOS E VERMELHOS**

**Fernanda Raghianti  
Médica Veterinária**

**UBERLÂNDIA – MG  
Junho de 2006**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**TEMPO DE PENETRAÇÃO DA *Salmonella* Heidelberg  
ATRAVÉS DA CASCA DE OVOS COMERCIAIS  
BRANCOS E VERMELHOS**

**Fernanda Raghianti**

**Orientador: Prof. Dr. Paulo Lourenço da Silva**

**Dissertação apresentada à Faculdade de  
Medicina Veterinária – UFU, como parte das  
exigências para a obtenção do título de Mestre  
em Ciências Veterinárias (Produção Animal).**

**UBERLÂNDIA - MG**

**Junho de 2006**

## DEDICATÓRIA

*A Deus, pela minha existência, porque nada nos é possível se não for de Sua Vontade, e pela permissão de realizar este grande sonho.*

*Ao Matheus, como esposo, companheiro e amigo; que com muita paciência, dedicação e amor, se faz presente em todos os momentos de minha vida.*

*A meus pais, sempre presentes, sempre incentivando, orientando e apoiando com carinho e dedicação a minha caminhada.*

## AGRADECIMENTOS

**Ao Prof. Dr. Paulo Lourenço da Silva**, professor, amigo e grande incentivador, pela paciência, pela orientação incansável e pelos valiosos ensinamentos científicos recebidos, que tentarei com certeza multiplicar.

**À Profa. Dra. Daise Aparecida Rossi**, pela acolhida na pós-graduação, pelo exemplo de dedicação à vida universitária, pela presença fundamental no desenvolvimento do trabalho e pela sua grande amizade.

**À Ticiane e à Gisele**, amigas, companheiras e presentes em todos os momentos, pela inestimável ajuda durante a realização deste trabalho e pelas horas alegres que passamos juntas.

A todos os funcionários e demais colegas por toda ajuda prestada ao longo desta jornada.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

**SUMÁRIO**

	<b>PÁGINA</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>v</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>vi</b>
<b>LISTA DE GRÁFICOS.....</b>	<b>vii</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>viii</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>ix</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>x</b>
<b>I. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>II. REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>3</b>
<b>III. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>9</b>
<b>III.a Condução do experimento.....</b>	<b>10</b>
<b>III.b. Análises Microbiológicas.....</b>	<b>12</b>
<b>III.c. Análise dos resultados.....</b>	<b>13</b>
<b>IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>13</b>
<b>V. CONCLUSÕES.....</b>	<b>19</b>
<b>VI. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>19</b>

## LISTA DE TABELAS

## PÁGINA

<b>TABELA 1:</b> Contagem de <i>Salmonella</i> Heidelberg (UFC mL <sup>-1</sup> e log UFC mL <sup>-1</sup> em caldo BHI <sup>(1)</sup> incubado a 37°C por até 10 horas.....	14
<b>TABELA 2.</b> Presença de <i>Salmonella</i> Heidelberg no interior de ovos comerciais brancos e vermelhos artificialmente inoculados mantidos a temperatura ambiente controlada de 25°C a 30°C por até 24 horas.....	15
<b>TABELA 3.</b> Presença de <i>Salmonella</i> Heidelberg no interior de ovos comerciais brancos artificialmente inoculados mantidos a temperatura ambiente controlada de 25°C a 30°C por até 240 minutos.....	16
<b>TABELA 4.</b> Presença de <i>Salmonella</i> Heidelberg no interior de ovos comerciais vermelhos artificialmente inoculados, mantidos a temperatura ambiente controlada de 25°C a 30°C por até 240 minutos.....	16

**LISTA DE FIGURAS**

	<b>PÁGINA</b>
<b>FIGURA 1.</b> Fluxograma da condução do experimento.....	.....11
<b>FIGURA 2.</b> Esquematização do protocolo de análise realizado no experimento.....	.....13

**LISTA DE GRÁFICOS**

	<b>PÁGINA</b>
<b>GRÁFICO 1.</b> Curva de crescimento da <i>Salmonella</i> Heidelberg (log UFC mL <sup>-1</sup> ) em caldo BHI <sup>(1)</sup> incubado a 37°C por até 10 horas.....	14
<b>GRÁFICO 2.</b> Regressão logística para o tempo de penetração da <i>Salmonella</i> Heidelberg em ovos brancos comerciais artificialmente inoculados.....	17
<b>GRÁFICO 3.</b> Regressão logística para o tempo de penetração da <i>Salmonella</i> Heidelberg em ovos vermelhos comerciais artificialmente inoculados.....	17



**LISTA DE ABREVIATURAS**

- APT** = Água Peptonada Tamponada  
**BHI** = Caldo Infusão de Cérebro e Coração  
**BS** = Ágar Bismuto Sulfito  
**LIA** = Ágar Lisina Ferro  
**RV** = Caldo Rappaport - Vassiliadis  
**SSMA** = Secretaria de Saúde e Meio Ambiente  
**TSI** = Ágar Tríplice Açúcar Ferro  
**TT** = Caldo Tetrionato  
**UFC. mL<sup>-1</sup>** = Unidades Formadoras de Colônias por mililitro  
**UFC. g<sup>-1</sup>** = Unidades Formadoras de Colônias por grama  
**VM** = Vermelho de Metila  
**VP** = Voges - Proskauer  
**XLD** = Ágar Xilose Lisina Desoxicolato

## TEMPO DE PENETRAÇÃO DA *Salmonella* Heidelberg ATRAVÉS DA CASCA DE OVOS COMERCIAIS BRANCOS E VERMELHOS

### RESUMO

Este estudo objetivou determinar o tempo mínimo após contato de ovos comerciais brancos e vermelhos com material contaminado com *Salmonella* Heidelberg e sua penetração para o interior dos ovos. Ovos brancos e vermelhos recém coletados de galinhas poedeiras com idade entre 45–50 semanas, provenientes de uma granja comercial em Uberlândia–MG foram contaminados artificialmente pelo contato com maravalha umedecida com inóculo líquido em fase estacionária de crescimento ( $10^3$ - $10^4$  UFC.g<sup>-1</sup> de *Salmonella* Heidelberg). Para o estudo em cada tipo de ovo, os ovos foram subdivididos nos seguintes grupos: controle negativo (sem contaminação artificial), controle positivo (analisados externamente após contaminação e internamente após o período máximo de manutenção do grupo teste) e grupo teste, sendo realizadas quatro repetições. Os ovos do grupo teste foram mantidos à temperatura ambiente controlada variando de 25°C a 30°C e seus conteúdos foram analisados após 60, 90, 120, 150, 180, 210 e 240 minutos, quanto à presença de *Salmonella* em 25g de amostra. Cada unidade amostral foi composta por cinco ovos. O protocolo de análise utilizado foi o tradicional com pré-enriquecimento, enriquecimento seletivo, plaqueamento em ágar seletivo, provas bioquímicas e sorológicas. Os resultados obtidos foram submetidos à regressão logística que indicou que a presença de *Salmonella* Heidelberg no interior dos ovos vermelhos acontece após 168 minutos de contato e nos ovos brancos após 141 minutos de contato.

**Palavras-chave:** *Salmonella* Heidelberg, ovos comerciais, galinhas, tempo de penetração.

## TIME OF PENETRATION OF *Salmonella* Heidelberg THROUGH EGG SHELL OF COMMERCIAL WHITE AND RED EGGS

### ABSTRACT

This study aimed to determine the minimum time after the contact of commercial white and red eggs with material contaminated by *Salmonella* Heidelberg and its penetration to the inner side of the eggs. White and red eggs recently collected from among layer hens aged between 45–50 weeks, proceeding from a commercial farm in Uberlândia–MG, were artificially contaminated by contact with wettable ribbons in inoculated liquid at a stagnant phase of growth ( $10^3$ - $10^4$  UFC.g<sup>-1</sup> of *Salmonella* Heidelberg). In the study of each kind of egg, the eggs were subdivided into the following groups: the negative control (without artificial contamination), the positive control (analyzed externally after contamination and internally after the maximum period of maintenance of the test group) and the test group, four repetitions were conducted. The eggs of the test group were maintained at temperature between 25°C and 30°C and its contents were analyzed after 60, 90, 120, 150, 180, 210 and 240 minutes, as for the presence of *Salmonella* in 25g of sample. Each sample unit was compounded of five eggs. The analysis protocol used was the traditional one with pre-enrichment, selective enrichment, plated in selective agar, biochemical and serological tests. The results obtained were submitted to logistics regression that indicated that the presence of *Salmonella* Heidelberg in the inner side of the red eggs happens after 168 minutes of contact and in the white eggs after 141 minutes of contact.

**Keywords:** *Salmonella* Heidelberg, commercial eggs, hens, time of penetration.

## I. INTRODUÇÃO

A salmonelose é uma zoonose importante para a saúde pública em todo o mundo. É endêmica, possui alta morbidade, é de difícil controle e praticamente impossível de erradicação. Atualmente, o microrganismo está freqüentemente envolvido em surtos de doenças de origem alimentar em diversos países, inclusive o Brasil (LIRIO *et al.*, 1998; GERMANO, GERMANO, 2001). No homem, as salmonelas podem ser agentes de três importantes quadros clínicos: a febre tifóide, as febres entéricas e as enterocolites (TORTORA *et al.*, 2002).

As salmonelas são também responsáveis por consideráveis prejuízos econômicos para a indústria avícola. Este desafio resulta do extraordinário número de fontes de infecção, envolvendo praticamente todo o escalão filogenético dos vertebrados, muitos, fontes de proteína animal para o homem (HOFER *et al.*, 1997). As aves, quando infectadas, podem apresentar sintomas clínicos da doença ou se tornarem portadoras assintomáticas, o que dificulta o controle, exigindo monitoramento constante dos plantéis (ZANCAN *et al.*, 2000).

O ovo é, provavelmente, o alimento mais envolvido em surtos de toxinfecção alimentar em que o agente etiológico é a *Salmonella spp* (SPACKMAN, 1989; NOORDHVIZEN; FRANKENA, 1994; TAUXE, 1997). Ovos consumidos crus, ou alimentos usando ovos sem tratamento adequado, foram identificados como possíveis responsáveis por surtos de infecção humana por *Salmonella spp*. (GAST, BEARD, 1992).

A contaminação dos ovos por salmonela se dá, inicialmente e na maioria das vezes, através da casca. O tempo e a temperatura de armazenagem são fatores fundamentais para que haja a penetração da salmonela a partir da superfície da casca para as estruturas internas do ovo (SILVA, 1995). A desinfecção e o resfriamento do ovo logo após a postura são procedimentos adotados em vários países, como medidas para reduzir a contaminação e a multiplicação bacteriana (HAMMACK *et al.*, 1993). Esse fato reforça a necessidade do controle sanitário em granjas de postura comercial, como medida de prevenção de possíveis contaminações dos ovos.

Na transmissão horizontal das salmonelas, as aves se infectam pela via oral, sendo as rações as possíveis fontes de infecção devido à contaminação por *Salmonella spp* (SILVA, DUARTE, 2002). A galinha infectada, a salmonela pode contaminar os ovos pela via transovariana (transmissão vertical) e se localizar na gema, nesse caso, os processos convencionais de desinfecção dos ovos não são eficientes.

A contaminação ambiental exerce papel de importância na transmissão da *Salmonella spp* para aves e ovos. Apesar da *Salmonella* não apresentar forma de resistência, aves positivas eliminam o patógeno nas fezes, sendo que este pode permanecer por longo período de tempo em um galpão despovoado (SILVA, DUARTE, 2002). Ratos de granjas contaminadas podem se tornar portadores de salmonela e eliminar o agente pelas fezes por longo período de tempo – mais de 10 meses (ECKROADE, 1992; HENZLER, OPITZ, 1992).

A contaminação interna de ovos por *Salmonella spp* tem sido discutida mundialmente na saúde pública desde o início dos anos 80. Desde então, muitos órgãos públicos e privados de pesquisa investem na detecção e controle de infecções por esse microrganismo em granjas de aves de postura (GAST *et al.*, 2004).

O Brasil é, na atualidade, o maior produtor mundial de carne de frango. O implemento deste plantel leva à produção em larga escala para atender ao mercado internacional, do mesmo modo que representa fonte proteica de baixo custo para a população brasileira. Nesse contexto, a presença de *Salmonella spp* é uma condição constante, e que exige por parte das indústrias, adoção de procedimentos preventivos, necessitando de constantes ações para seu controle em todas as fases da produção avícola (RODRIGUES, 2005).

O tempo de penetração da *Salmonella spp* através da casca de ovos foi avaliado por alguns autores (SCHOENI *et al.*, 1995; ESPINOSA *et al.*, 1996; OLIVEIRA, SILVA, 2000; GAST *et al.*, 2005), e todos analisaram a presença da bactéria no interior dos ovos após 24 horas da contaminação, não havendo, assim, precisão do tempo em que houve a penetração da salmonela nos ovos.

Considerando a importância econômica e sanitária da *Salmonella*, e buscando subsidiar a indústria quanto a uma precisão em relação ao tempo máximo

que tratamentos devem ser executados em ovos para prevenir sua contaminação interna, este trabalho objetivou verificar o tempo de penetração da *Salmonella* Heidelberg em ovos comerciais, brancos e vermelhos, artificialmente contaminados.

## II. REVISÃO DA LITERATURA

Pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, as salmonelas são bastonetes Gram negativos, anaeróbios facultativos, não formadores de esporos (TORTORA *et al.*, 2002). São móveis por meio de flagelos peritríquios, com exceção da *Salmonella* Pullorum e *Salmonella* Galinarum, que são aflageladas (HIRCH, ZEE, 2003).

O gênero *Salmonella* compreende duas espécies, *Salmonella bongori* e *Salmonella enterica*, que são divididas em seis subespécies (*enterica*, *salamae*, *arizonae*, *díarizonae*, *houtenae* e *indica*). A maioria dos sorovares é capaz de infectar o homem e vários animais de sangue quente e frio, que são identificados na cadeia epidemiológica como doente, portador e reservatório (FRANCO, LANDGRAF, 1996).

As bactérias do gênero *Salmonella* continuam sendo uma das causas mais importantes de toxinfecções alimentares em todo o mundo. As salmonelas têm ampla distribuição na natureza, sendo o trato intestinal do homem e dos animais seu principal reservatório. Alimentos de origem animal, especialmente os derivados de aves, e alimentos que contenham ovos, como saladas e produtos de confeitaria, têm sido freqüentemente envolvidos em surtos de salmonelose em humanos (ALTEKRUSE *et al.*, 1997; ESTUPIÑAN *et al.*, 1998).

As infecções por salmonelas nas aves apresentam grande dimorfismo clínico. Os sintomas podem ser graves e implicar na eliminação dos lotes infectados - como na pulorose e no tifo aviário -, ou serem brandos, sendo somente observada a diminuição na produtividade. Entretanto, o grande problema desta zoonose reside na infecção assintomática ou inaparente, que apresenta pouca ou nenhuma manifestação clínica, denominada como infecção paratífica. Este tipo de infecção é responsável por queda da produtividade do plantel e as aves infectadas se tornam disseminadoras para outras espécies animais, excretando o microrganismo nas fezes (HOFER *et al.*, 1997).

Dentre os fatores que contribuem, destacam-se a temperatura de conservação imprópria, cocção inadequada, equipamentos contaminados e higiene pessoal deficiente (RODRIGUES, 2005), além do risco iminente de contaminação dentro das plantas industriais (laticínios, frigoríficos, granjas e incubatórios).

Estimativas brasileiras citam que 34.000 pessoas são anualmente envolvidas em surtos de infecções alimentares causadas por *Salmonella spp* (FLORES *et al.*, 2001). Com freqüência estão implicados os produtos de origem animal, como carnes bovinas, suínas e de aves (FRANCO, LANDGRAF, 1996), ovos ou produtos derivados como cremes, maionese e clara batida fresca (SPACKMAN, 1989; NOORHVIZEN, FRANKENA, 1994; TAUXE, 1997; FLORES *et al.*, 2001; KANASHIRO *et al.*, 2002). Inúmeros surtos de doenças de transmissão alimentar já foram descritos envolvendo carnes (aves, suínos e bovinos), pescados, ovos e seus produtos (maionese, sorvete), queijo, leite em pó, dentre outros (RODRIGUES, 2005).

A incidência de surtos de *Salmonella* em humanos tem aumentado em muitos países como Estados Unidos, Grã-Bretanha e outros (SPAKMAN, 1989; TAUXE, 1997). No Brasil, os surtos por salmonelose no homem têm aumentado a partir de 1993 (SILVA, 1995; TAUNAY *et al.*, 1996; LIRIO *et al.*, 1998).

*Salmonella enterica* sorovar Enteritidis é o patógeno causador da maioria das salmoneloses em humanos, em parte porque tem a habilidade de contaminar aves de forma assintomática (GUARD-PETTER, 2001), e ainda, por ser capaz de colonizar os órgãos reprodutivos das aves, com contaminação transovariana dos ovos (OKAMURA *et al.*, 2001). A via da infecção envolve a colonização, sobrevivência e multiplicação do microrganismo na granja, na ave, no ovo e, finalmente, no homem. Entretanto, com a introdução de vacinas específicas para *Salmonella* Enteritidis nas matrizes, tanto na Europa quanto nos Estados Unidos, têm-se observado aumento na prevalência de outros sorotipos (GUARD-PETTER, 2001).

Estudos epidemiológicos associam os surtos de salmonelose humana ao consumo de ovos contaminados e seus derivados (HANSENSON *et al.*, 1992), sendo estes produtos, portanto, de grande importância para a saúde pública (DUGUID; NORTH, 1991 e RODRIGUE *et al.*, 1990).

Apesar da *Salmonella* Enteritidis ainda ser o sorovar mais envolvido em doenças no homem, outros como a *Salmonella enterica* sorovar Heidelberg vêm aumentando nas últimas décadas (HOFER *et al.*, 1997; MAMINNA *et al.*, 2003). Embora a *Salmonella* Heidelberg seja comumente encontrada no ambiente das granjas, raramente são encontradas no interior dos ovos ou causando doença (GAST *et al.*, 2004). Porém, segundo Tauxe (1997), o Centro de Controle e Prevenção de Doença de Atlanta anunciou uma significativa associação entre ovos ou alimentos contendo ovos, e infecções por *Salmonella* Heidelberg em humanos, em trabalhos realizados nos Estados Unidos.

Em um levantamento feito pela Fundação Oswaldo Cruz sobre a prevalência de sorovares de *Salmonella* em aves no Brasil nos anos de 1962 a 1991, em 2123 amostras analisadas, foram identificados 90 sorovares (HOFER *et al.*, 1997). A *Salmonella* Heidelberg foi classificada como muito freqüente a partir do ano de 1982 nos plantéis avícolas de todo o país, caracterizando a importância na emergência deste sorotipo.

Segundo Hofer *et al.* (1997) e Maminna *et al.* (2003), os índices de contaminação dos alimentos por *Salmonella* Heidelberg vêm aumentando nas últimas décadas, assim como a freqüência desta bactéria em granjas (GAST *et al.*, 2004).

Entre 1994 e 1997, a *Salmonella* Heidelberg foi o décimo sorotipo mais freqüentemente identificado em humanos na Itália, e em 2002, no mesmo país, esse sorotipo foi responsável por 6,5% e 20,3% das contaminações por salmonelas em frangos e perus, respectivamente (MAMINNA *et al.*, 2003). Nos Estados Unidos, surtos de infecção por *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium e *Salmonella* Heidelberg isolados de ovários e fezes de galinhas foram responsáveis por 50% dos surtos humanos (SCHOENI *et al.*, 1995).

No Brasil, no período de 1994 a 1996, no estado do Rio Grande do Sul (RS), foram registrados 657 surtos, na Secretaria da Saúde e Meio Ambiente (SSMA), envolvendo 40.120 pessoas. Dessas, em média, 10% necessitaram de hospitalização, e a salmonela foi o segundo agente bacteriano mais encontrado, imediatamente após o *Staphylococcus aureus* (FLORES *et al.*, 2001).



Segundo Pinto (1999), em 1997, nos relatórios da Divisão de Vigilância Sanitária da SSMA/ RS, das enfermidades transmitidas por alimentos, 32,3% envolveram ovos, saladas com maionese, creme de maionese, fios de ovos ou derivados de ovos. Do total de 136 surtos, em 33,63% foi identificada a *Salmonella spp* como o agente etiológico.

Gast *et al.* (2004) observaram que galinhas experimentalmente infectadas via oral com quatro diferentes cepas de *Salmonella* Heidelberg e uma de *Salmonella* Enteritidis, tiveram seu trato intestinal, fígado, baço, ovários e ovidutos colonizados por todas as cinco cepas de ambos os sorotipos. Todas as quatro cepas de *Salmonella* Heidelberg foram encontradas no conteúdo interno dos ovos destas aves, ainda que em menor frequência que a *Salmonella* Enteritidis.

Muitos estudos relatam que a salmonela é capaz de penetrar a casca e multiplicar-se em meio aos conteúdos internos dos ovos (BOARD, 1966; SIMMONS *et al.*, 1970; SPARKS, BOARD, 1985; RIZK *et al.*, 1996). Diversos fatores estariam envolvidos na velocidade de penetração da bactéria, dentre eles a qualidade da casca (SAUTER, PETERSEN, 1974).

Assim que o ovo esfria, seus conteúdos se contraem e a pressão negativa interna puxa a salmonela presente na superfície dos ovos para o interior dos mesmos (LOCK *et al.*, 1992; BRUCE, DRYSDALE, 1994). Quando isso ocorre, fica difícil evitar a posterior invasão nos conteúdos internos dos ovos pela bactéria, bem como evitar o comprometimento do desenvolvimento do embrião (CASON *et al.*, 1993).

Em geral, a contaminação da clara é baixa por apresentar elementos naturais que dificultam o desenvolvimento bacteriano, como por exemplo a deficiência em ferro, elemento essencial para a multiplicação das bactérias, a lisozima (enzima antibacteriana), dentre outros elementos tais como a conalbumina e a ovomucina (OLIVEIRA, SILVA, 2000).

Dentre os fatores que influenciam a qualidade da casca de ovos comerciais destaca-se a idade da ave (ROQUE, SOARES, 1994; LAPAO *et al.*, 2005), tipo e formas de alimentação (FARMER *et al.*, 1983; ORBAN *et al.*, 1993; BACKHOUSE, GOUS, 2005; PAPPAS *et al.*, 2005), tempo de estocagem dos ovos (CHEN *et al.*,

2005), genética (ZHANG *et al.*, 2005; DUNN *et al.*, 2005), e o fotoperíodo (BACKHOUSE *et al.*, 2005).

A presença da salmonela na gema pode ser resultante da migração a partir da casca contaminada. Sabe-se que os poros da casca dos ovos permitem a penetração de salmonelas, e o índice de penetração está relacionado com as condições de tempo e temperatura de armazenagem e não com o número de poros (SHAH *et al.*, 1991; SILVA, 1995, KANASHIRO *et al.*, 2002).

No Brasil, a maioria dos ovos comerciais é produzida por galinhas mantidas em gaiolas. Uma pequena parte é constituída por ovos de descarte de incubação, que são produzidos por matrizes em ninhos com cama de maravalha. Parte desses ovos, oriundos de reprodutoras, apresenta defeitos na casca que facilitam a penetração da salmonela a partir da superfície para o interior dos ovos, aumentando o risco de contaminação (OLIVEIRA, SILVA, 2000).

Segundo Catalano e Knabel (1994), o resfriamento rápido e armazenagem subsequente a 4°C protegeram os ovos da penetração por salmonela. Por outro lado, Farjado *et al.* (1995) mostraram que o resfriamento rápido dos ovos é acompanhado por um aumento no número e largura de rachaduras microscópicas na casca, e que ovos refrigerados eram mais susceptíveis à penetração por *Salmonella spp.*

Board e Tranter (1995) afirmam que após a oviposição, a casca do ovo pode se contaminar ao entrar em contato com o ambiente, e que a extensão desta contaminação está diretamente relacionada com a higiene destas superfícies. Estudo realizado por Jones *et al.* (1995) em uma granja produtora de ovos comerciais, demonstrou que 72% das amostras do ambiente apresentaram contaminação por *Salmonella*, e apenas 7,8% das cascas dos ovos estavam contaminadas pela bactéria.

Schoeni *et al.* (1995) compararam o crescimento da *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium e *Salmonella* Heidelberg, inoculadas na gema e clara de ovos estocados a 4°C, 10°C e 25°C. Após inoculação de  $10^{-2}$  e  $10^{-4}$  UFC.g<sup>-1</sup> foi observado crescimento a 10°C, mas o número de microrganismos aumentou três ciclos log quando os ovos foram incubados a 25°C por 24 horas. No mesmo estudo, para verificar a capacidade de penetração da bactéria através da casca, os ovos

foram contaminados, mantidos a 35°C por 30 minutos, e armazenados a 4°C. A penetração foi observada do primeiro ao terceiro dia nos ovos contaminados com  $10^4$  UFC.g<sup>-1</sup> e, em 50-75% dos ovos contaminados com  $10^6$  UFC.g<sup>-1</sup>, a presença no interior dos ovos foi detectada no primeiro dia.

Espinosa *et al.* (1996) estudaram a penetração da *Salmonella* Enteritidis em ovos férteis e não férteis contaminados artificialmente. O estudo foi realizado aos 8, 12 e 16 dias de incubação a 37,7°C. O trabalho evidenciou que após o oitavo dia, a penetração bacteriana nos dois tipos de ovos apresentou diferença estatística significativa, indicando que o desenvolvimento embrionário retarda consideravelmente a suscetibilidade à invasão por *Salmonella*, ou seja, ovos não férteis são considerados mais aptos a serem penetrados por *Salmonella*.

Miyamoto *et al.* (1998) analisaram o efeito da idade do ovo após a postura, refrigerado ou não, sobre a penetração da *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium através da casca do ovo. Os ovos foram divididos em quatro grupos onde o período pós-postura variava de 15 minutos a 3 horas, de 3 horas e 15 minutos a 6 horas, 1 dia, e 7 dias. Os ovos foram mantidos a duas temperaturas (4°C e 25°C), e imersos em suspensões de *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium contendo  $10^3$  e  $10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup> a 25°C por 10 minutos. Após a incubação a 25°C por duas horas, a taxa de recuperação de *Salmonella* na camada interna e na casca dos ovos, com período pós-postura variando de 15 minutos a 3 horas, foi significativamente maior do que a dos outros grupos. Não houve diferença significativa entre *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium quanto à habilidade em penetrar a casca do ovo. A penetração da *Salmonella* foi diminuída significativamente por resfriamento dos ovos a 4°C por 15 minutos, antes da imersão nas suspensões.

Oliveira e Silva (2000) analisaram o efeito do tempo e da temperatura de armazenagem sobre a multiplicação de *Salmonella* Enteritidis na casca e na gema de ovos contaminados artificialmente. Os autores utilizaram ovos comerciais divididos em dois grupos, mantidos em temperatura ambiente (25°C a 28°C), e refrigerados (4°C a 8°C), examinados após 0, 24, 48, 72, 168 e 336 horas de contaminação, e os refrigerados também após 504 horas. A penetração da *Salmonella* da casca para a gema foi detectada 24 horas após a contaminação nos

ovos refrigerados, e em 48 horas nos ovos mantidos em temperatura ambiente; porém, a armazenagem em temperatura ambiente permitiu que o microrganismo chegasse à gema em maior número de vezes e com maior taxa de multiplicação.

Gast *et al.* (2005) avaliaram o tempo de penetração da *Salmonella* Enteritidis e da *Salmonella* Heidelberg para o interior de ovos artificialmente contaminados. Os resultados foram avaliados 24 horas após a contaminação e foram positivos para ambos os sorovares.

O enorme sucesso da avicultura brasileira dentro da cadeia alimentar, com índices de crescimento entre 5% e 10%, traz conseqüências sanitárias que podem dificultar a prevenção e o controle da *Salmonella spp* nos plantéis. Dentre elas, a maior pressão para a manutenção de lotes de galinhas reprodutoras positivos para *Salmonella spp* e a não eliminação dos mesmos; o maior aproveitamento dos ovos impróprios para a incubação oriundos de aves positivas para salmonela, ou ainda, a redução nas exigências sanitárias na compra de reprodutoras e sua progênie, aceitando-se lotes positivos para *Salmonella spp* (SILVA, DUARTE, 2002).

Manter as aves de postura saudáveis, proceder à desinfecção dos ovos com produtos químicos e resfriamento imediatamente após a postura são os procedimentos mais adotados como medidas para prevenir ou reduzir a contaminação e a multiplicação bacteriana em ovos (HAMMACK *et al.*, 1993). Para que a desinfecção seja eficiente, além do uso de produtos antimicrobianos efetivos, é necessário conhecer o momento em que os microrganismos atravessam a casca, para que tratamentos adequados aconteçam antes desse evento.

### III. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Biotecnologia Animal da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia. Foram utilizados 280 ovos comerciais brancos e 280 ovos comerciais vermelhos, ambos não lavados e sem nenhum processo de limpeza prévia, recém coletados (primeira coleta matinal) de galinhas com idade entre 45 e 50 semanas, provenientes de uma granja no município de Uberlândia, Minas Gerais.

O espécime bacteriano utilizado no estudo foi uma cepa padrão de *Salmonella enterica* sorovar Heidelberg, do sorogrupo B, Fator 4,5, caracterização antigênica flagelar H2 e H1 isolado em um plantel avícola situado na cidade de Uberlândia, e devidamente tipificado no laboratório nacional de referência da Fundação Osvaldo Cruz.

A contaminação experimental foi realizada de acordo com as orientações de Oliveira e Silva (2000), que recomendam o contato dos ovos com maravalha contaminada, de forma a reproduzir condições semelhantes à contaminação em que os ovos são expostos naturalmente.

Para padronizar a contaminação da maravalha foi preparado um inóculo líquido em fase estacionária de crescimento com concentração conhecida. Os procedimentos foram baseados na contagem de bactérias (UFC.mL<sup>-1</sup>) e o tempo em horas. Os resultados obtidos foram utilizados para construção de um gráfico de crescimento bacteriano e determinação da fase estacionária.

A maravalha previamente esterilizada em autoclave, foi ligeiramente umedecida com água destilada estéril, colocada em sacos plásticos e aspergidas com a cultura líquida em quantidade suficiente para atingirem 10<sup>3</sup>-10<sup>4</sup> UFC.g<sup>-1</sup> de *Salmonella* Heidelberg. Os ovos foram assepticamente depositados sobre a maravalha, e então, submetidos a leves movimentos por 10 minutos, e mantidos em temperatura ambiente controlada (25°C a 30°C), até o momento da análise.

### **III.a. Condução do experimento**

O estudo foi realizado em duas fases distintas (Figura 1) para cada tipo de ovo (vermelho e branco). Em ambas, foram realizadas quatro repetições para cada tipo de ovo e as amostras foram subdivididas nos seguintes grupos experimentais:

Grupo 1. controle negativo – sem inoculação, analisados no último período de armazenagem;

Grupo 2. controle positivo – ovos analisados após contaminação experimental (hora O);

Grupo 3. grupo teste – ovos previamente contaminados por contato com maravalha contaminada com  $10^3$ - $10^4$  UFC.g<sup>-1</sup> *Salmonella* Heidelberg, mantidos em temperatura ambiente controlada, e analisados após 2, 4, 8, 12 e 24 horas.

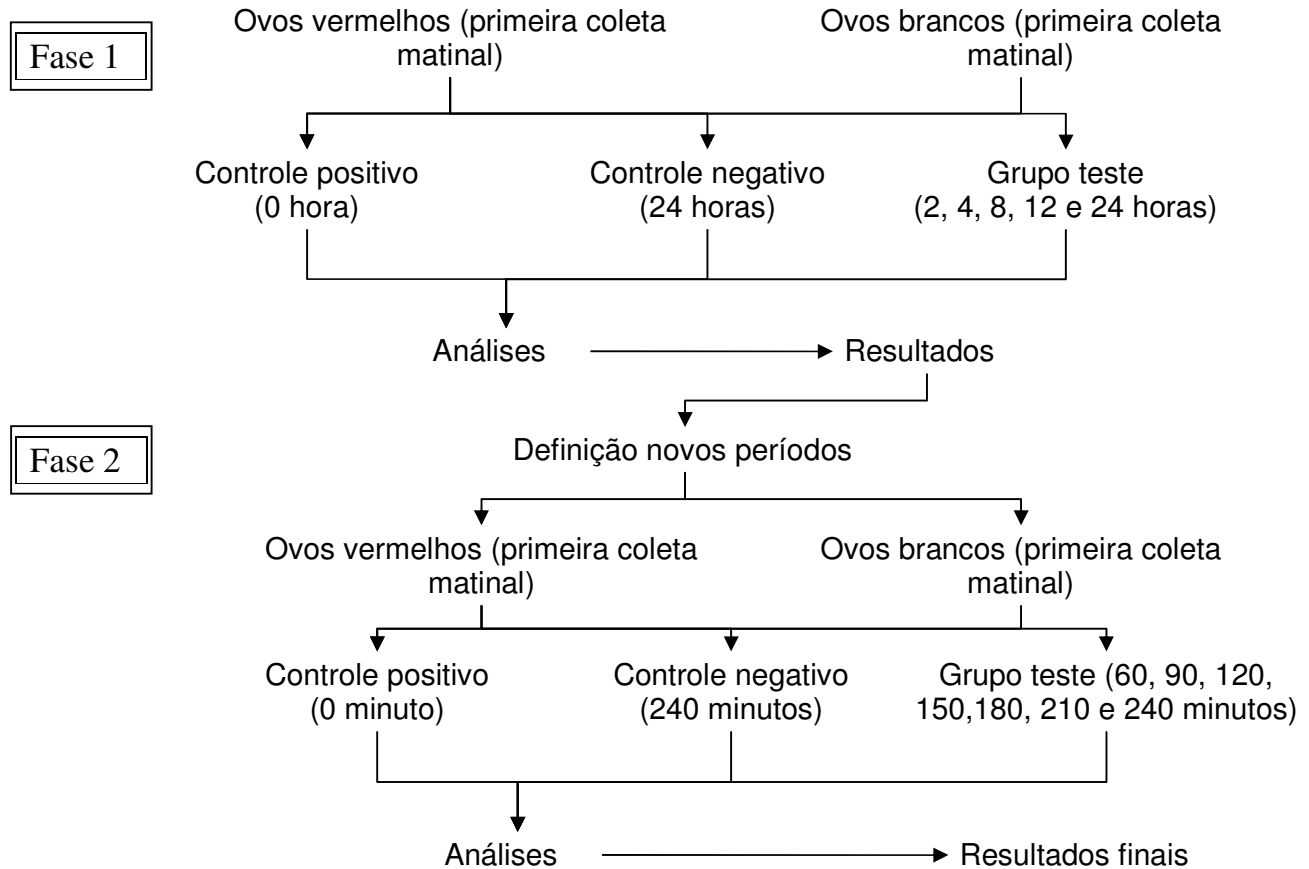


Figura 1. Fluxograma da condução do experimento.

Na fase 1, para determinar os horários de verificação da presença de *Salmonella* no interior dos ovos vermelhos e brancos, os testes foram realizados nos tempos 0, 2, 4, 8, 12 e 24 horas após o contato dos ovos com a maravalha contendo o inóculo. Uma vez determinado o momento de penetração da bactéria através da casca de ovos brancos e vermelhos, foi iniciada a fase 2. Nesta fase, foi realizada nos tempos 60, 90, 120, 150, 180, 210 e 240 minutos a verificação da presença da *Salmonella* em 25g de conteúdo interno dos ovos brancos e vermelhos, previamente contaminados.

Os resultados das análises obtidas na fase 1 foram utilizados para verificar o menor período em que o microrganismo foi observado no interior dos ovos, e este valor em horas foi subdividido na tentativa de verificar o período exato ou mais provável em que ocorria a penetração.

### **III.b. Análises microbiológicas**

As amostras utilizadas para análise foram compostas de cinco ovos de cada grupo (tratamentos). Para análise, os ovos foram previamente higienizados externamente com álcool 70°GL, quebrados assepticamente no fluxo laminar, e seus conteúdos derramados em placa de Petri estéril e homogeneizados com bastão de vidro estéril, formando um “pool” de gema e clara.

As amostras foram analisadas conforme protocolo de análise descrito por Silva *et al.* (2001), representado na Figura 2. No pré-enriquecimento, 25g do *pool* foi adicionado em 225mL de água peptonada tamponada (APT) e incubado a 35°C/24 horas. Após o pré-enriquecimento, 1 mL das culturas foram repicadas em caldo TT (tetracionato acrescido de 0,2 mL de solução de iodo) e em caldo RV (Rappaport-Vassiliadis). Os tubos de TT e RV foram incubados 35°C e 42°C, respectivamente, em estufa e banho-maria, por 24 horas.

Após incubação, as culturas foram submetidas a plaqueamento seletivo diferencial em ágar bismuto sulfito (BS) e ágar xilose lisina desoxicolato (XLD), e incubadas em posição invertida a 35°C/24 horas. As placas que apresentaram colônias típicas foram submetidas à identificação bioquímica. Foram utilizados inicialmente os meios ágar tríplice açúcar ferro (TSI) e ágar lisina ferro (LIA), incubados a 35°C/24 horas. Tubos com reação típica para *Salmonella* nestes meios foram submetidos aos testes de utilização do citrato como única fonte de carbono, produção de urease, motilidade, produção de indol e produção de ácido sulfídrico. As colônias que apresentaram resultados típicos nessas provas foram submetidas à sorologia (antígenos somáticos e flagelares polivalentes).

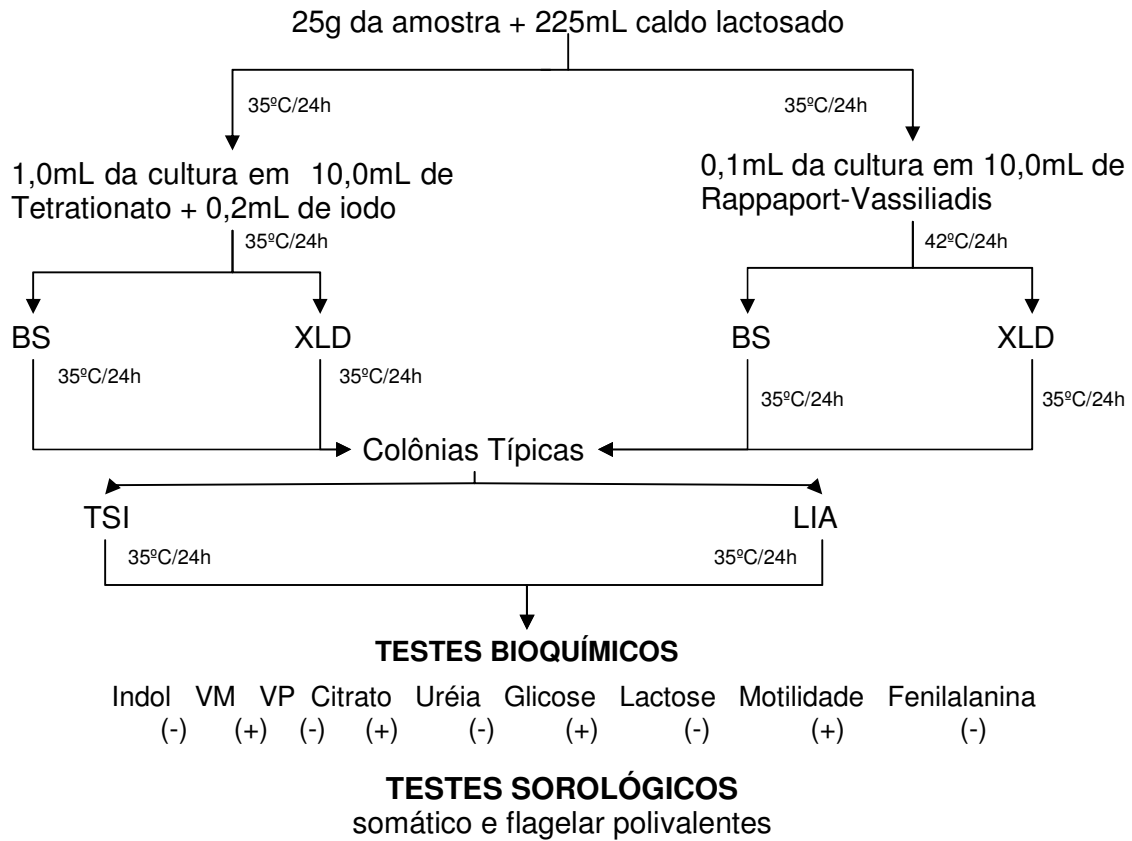


Figura 2. Esquematização do protocolo de análise realizado no experimento.

### III.c. Análise dos resultados

A avaliação estatística foi realizada por análise de regressão logística simples com a variável dependente sendo a presença da *Salmonella* Heidelberg no interior dos ovos, e a variável independente sendo os tempos avaliados após a contaminação (AYRES *et al.*, 2000).

## IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As contagens (UFC.mL<sup>-1</sup>) da cultura de *Salmonella* Heidelberg realizadas após inoculação em meio líquido por até 10 horas, e utilizada para padronização do inóculo experimental pode ser observada na Tabela 1 e Gráfico 1, respectivamente. A análise gráfica determinou a utilização de culturas de 9 horas de cultivo para uso experimental.



Para contaminar a maravalha foram realizados cálculos para que a contaminação fosse padronizada em  $10^3$ - $10^4$  UFC.g<sup>-1</sup>. A contagem média de salmonela na casca, determinada imediatamente após a contaminação experimental, foi de  $8 \times 10^4$  UFC.g<sup>-1</sup> e  $6 \times 10^4$  UFC.g<sup>-1</sup> na fase 1 e na fase 2, respectivamente.

Tabela 1. Contagem de *Salmonella* Heidelberg (UFC.mL<sup>-1</sup> e log UFC.mL<sup>-1</sup>) em caldo BHI<sup>(1)</sup> incubado a 37°C por até 10 horas.

TEMPO (horas)	UFC mL <sup>-1</sup> (2)	Log UFC mL <sup>-1</sup>
0	$2,1 \times 10^6$	6,3222
1	$7,0 \times 10^6$	6,8451
2	$2,32 \times 10^7$	7,3655
3	$9,6 \times 10^7$	7,9823
4	$3,1 \times 10^8$	8,4914
5	$9,2 \times 10^8$	8,9638
6	$4,9 \times 10^8$	8,6902
7	$2,6 \times 10^8$	8,4150
8	$2,4 \times 10^8$	8,3802
9	$5,6 \times 10^7$	7,7482
10	$2,4 \times 10^7$	7,3802

(1) BHI = caldo infusão de cérebro e coração

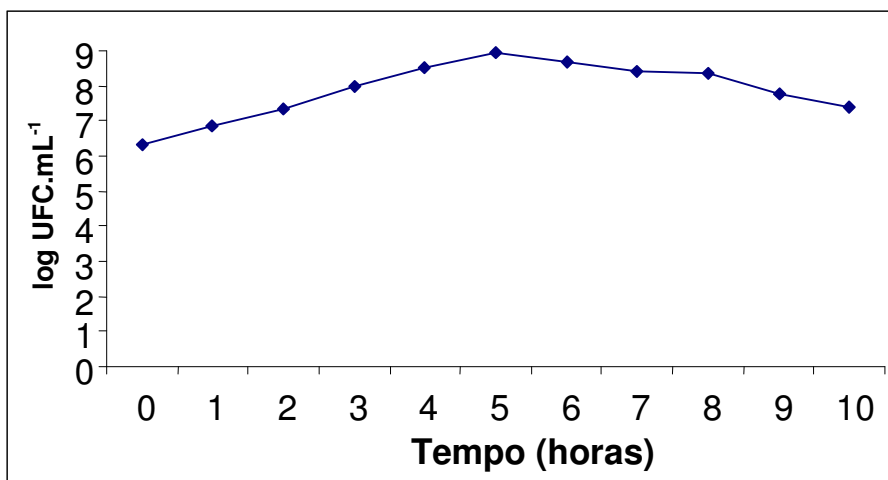


Gráfico 1. Curva de crescimento da *Salmonella* Heidelberg (log UFC.mL<sup>-1</sup>) em caldo BHI<sup>(1)</sup> incubado a 37°C por até 10 horas.

Na fase 1, a presença de *Salmonella* Heidelberg no interior dos ovos após inoculação e manutenção em temperatura ambiente controlada (25°C a 30°C) por 2, 4, 8, 10 e 24 horas nas quatro repetições está demonstrada na tabela 2. Os grupos controle negativo e controle positivo apresentaram contagens negativas e positivas, respectivamente, em todas as repetições. Nesta fase, os tempos de armazenagem foram iguais para os dois tipos de ovos.

Tabela 2. Presença de *Salmonella* Heidelberg no interior de ovos comerciais brancos e vermelhos artificialmente inoculados mantidos a temperatura ambiente controlada de 25°C a 30°C por até 24 horas.

Tempo de exposição (horas)	Repetições			
	1	2	3	4
2:00	-	-	-	-
4:00	+	+	+	+
8:00	+	+	+	+
12:00	+	+	+	+
24:00	+	+	+	+

Os resultados obtidos demonstram que a partir de quatro horas de manutenção dos ovos à temperatura ambiente controlada variando de 25°C a 30°C, a *Salmonella* Heidelberg foi detectada no interior dos mesmos. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Schoeni et al. (1995) e Oliveira e Silva (2000), que observaram que após contaminação externa, sorovares diferentes de *Salmonella* foram detectados no interior dos ovos antes de 24 horas de armazenamento.

Messens et al. (2005), em estudo realizado sobre o tempo de penetração da *Salmonella* Enteritidis através da casca de ovos, observaram que, em média, 38,7% dos ovos testados tiveram seu conteúdo interno contaminado pela salmonela e que a penetração ocorreu no terceiro dia pós-contaminação.

Este resultado (Tabela 2) foi utilizado para determinar intervalos mais precisos de tempo em que a probabilidade de penetração da *Salmonella* nos ovos pudesse ocorrer. Os períodos estabelecidos para a fase 2 foram 60, 90, 120, 150, 180, 210 e 240 minutos. Os resultados obtidos estão demonstrados nas Tabelas 3 e 4.

Tabela 3. Presença de *Salmonella* Heidelberg no interior de ovos comerciais brancos artificialmente inoculados mantidos a temperatura ambiente controlada de 25°C a 30°C por até 240 minutos.

Tempo de exposição (minutos)	Repetições			
	1	2	3	4
60	-	-	-	-
90	-	-	-	-
120	-	-	-	-
150	+	+	+	+
180	+	+	+	+
210	+	+	+	+
240	+	+	+	+

Tabela 4. Presença de *Salmonella* Heidelberg no interior de ovos comerciais vermelhos artificialmente inoculados, mantidos a temperatura ambiente controlada de 25°C a 30°C por até 240 minutos.

Tempo de exposição (minutos)	Repetições			
	1	2	3	4
60	-	-	-	-
90	-	-	-	-
120	-	-	-	-
150	-	-	-	-
180	+	+	+	+
210	+	+	+	+
240	+	+	+	+

Os resultados encontrados demonstram que a contaminação interna dos ovos brancos acontece após 120 minutos e antes de 150 minutos, e a dos ovos vermelhos depois de 150 minutos e antes de 180 minutos após a contaminação externa dos mesmos com  $10^3$ - $10^4$  UFC.g<sup>-1</sup> de *Salmonella* Heidelberg. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Miyamoto *et al.* (1998) em ovos externamente contaminados pós postura (15 minutos a 3 horas) e mantidos a 25°C,

condições semelhantes às utilizadas nesse experimento. Os autores verificaram uma significativa taxa de recuperação interna das salmonelas inoculadas após duas horas de incubação.

O tempo em minutos após contaminação e a contagem ( $\log \text{UFC.g}^{-1}$ ) de *Salmonella* Heidelberg determinada na casca dos ovos imediatamente após contaminação experimental foram analisadas por meio da regressão logística, para determinar o momento exato em que ocorre a contaminação do conteúdo interno dos ovos. Os gráficos 2 e 3 apresentam os resultados das análises estatísticas para os ovos brancos e vermelhos, respectivamente.

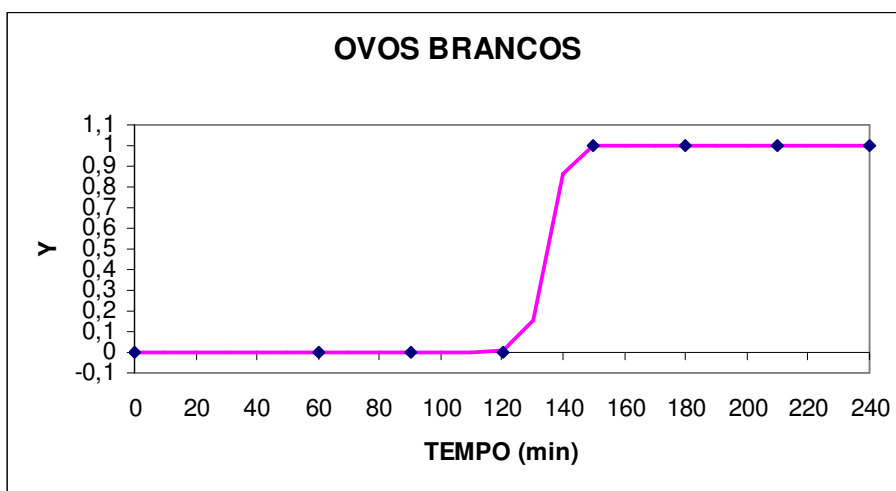


Gráfico 2. Regressão logística para o tempo de penetração da *Salmonella* Heidelberg em ovos brancos comerciais artificialmente inoculados.

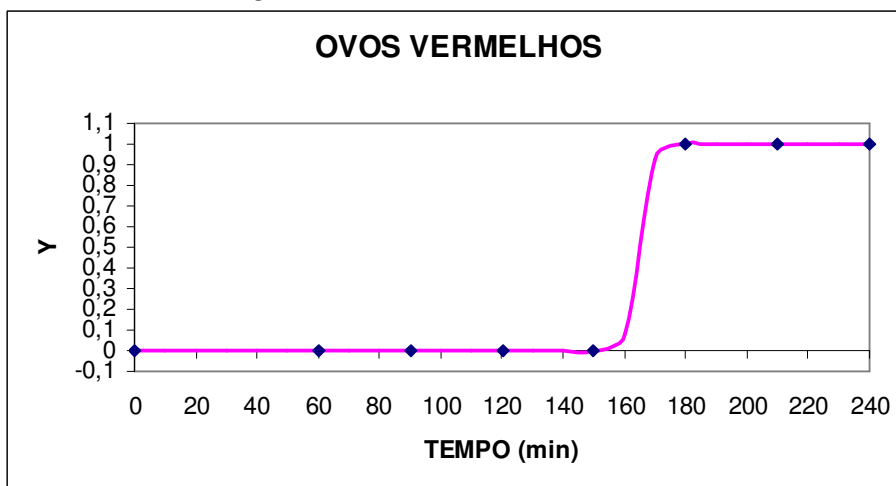


Gráfico 3. Regressão logística para o tempo de penetração da *Salmonella* Heidelberg em ovos vermelhos comerciais artificialmente inoculados.

A equação determinada para o cálculo estatístico está descrita a seguir:

$$Y = \frac{e^{(-3.96168 + (1.723475) * X)}}{1 + e^{(-3.96168 + (1.723475) * X)}}$$

A análise gráfica dos dados determinou que ovos brancos externamente expostos ao contato com  $10^3$ - $10^4$  UFC.g<sup>-1</sup> de *Salmonella* Heidelberg são contaminados internamente após 136 minutos (2h e 16 min), e os ovos vermelhos após 164 minutos (2h e 44 min) de contato.

Sabe-se que a penetração da bactéria através da casca de ovos é influenciada diretamente pela qualidade da casca, condições, tempo e temperatura de estocagem (SCHOENI *et al.*, 1995). Segundo Miyamoto *et al.* (1998), quanto maior o tempo e a temperatura de estocagem dos ovos, mais rápida é a penetração da bactéria através da casca.

A contaminação de ovos por *Salmonella* spp pode ocorrer via transovariana. Nesse caso, a contaminação está localizada na gema e os processos convencionais de desinfecção dos ovos não são eficientes. É necessário, portanto, que práticas adequadas de sanidade avícola sejam prioritárias nos plantéis. Nenhum procedimento de desinfecção realizado isoladamente é capaz de prevenir a contaminação dos ovos.

Em granjas de produção comercial, os ovos são lavados e desinfetados após sua coleta. Entretanto, não há preocupação com controle rigoroso do período compreendido entre a postura e o tratamento, que muitas vezes é superior a três horas. Os resultados obtidos indicam que tratamentos de limpeza e desinfecção que objetivem o controle da contaminação interna dos ovos brancos, devem ocorrer antes de duas horas e 16 minutos; e dos ovos vermelhos, antes de duas horas e 44 minutos.

Garantir a sanidade do plantel, realizar desinfecção do ambiente, instalações e dos próprios ovos, e ainda, resfriamento após a postura são medidas adotadas para prevenir ou reduzir a contaminação por patógenos e garantir a saúde do consumidor.

## V. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem concluir que após a contaminação da casca de ovos brancos comerciais com *Salmonella* Heidelberg, o microrganismo atinge o interior dos mesmos a partir de duas horas e 16 minutos; e nos ovos vermelhos comerciais isso ocorre a partir de duas horas e 44 minutos. As granjas de produção comercial devem estar atentas a esse tempo, adotando as medidas preventivas de descontaminação externa dos mesmos o mais rápido possível.

## VI. REFERÊNCIAS

Altekruse, S.F., Cohen, M.L., Swerdlow, D.L. Emerging foodborne diseases. **Emerging Infectious Diseases**, v.3, n.3, p.285-293, 1997.

Ayres, M.; Ayres, M.J.; Ayres, D.L.; Santos, A. S. **Aplicações estatísticas nas áreas das ciências Biológicas e médicas**. Belém: Sociedade Civil Mamirauá; Brasília: CNPq., 2000. 272p.

Backhouse D.; Gous R.M. The effect of feeding time on shell quality and oviposition time in broiler breeders. **Poultry Science**, v. 46, n. 2, p. 255-259, Abr.2005.

Backhouse D.; Lewis P.D.; Gous R.M. Constant photoperiods and eggshell quality in broiler breeder pullets. **Poultry Science**, v. 46, n. 2, p. 211-213, Abr. 2005.

Board, R.G. The course of microbial infection of the hen's egg. **Journal of Applied Bacteriology**, v.29, p.319-341, 1966.

Board, R.G.; Tranter, H.S. The microbiology of eggs. In: Stadelman W.J. and Cotterill O.J. (Ed.). **Egg Science and Technology**. London: 1995. p. 81-104.

Bruce, J.; Drysdale, E.M. Trans-shell transmission. In: **Microbiology of the Avian Egg**. R.G. Board and R. Fuller (Ed.). London: Chapman and Hall, 1994. p.63-91.

Cason, J.A.; Balley, J.S.; Cox, N.A. Location of *Salmonella* Typhimurium during incubation and hatching of inoculated eggs. **Poultry Science**, v. 72, p. 2064-2068, 1993.

Catalano, C.R.; Knabel, S.J. Destruction of *Salmonella* Enteritidis by high pH and rapid chilling during simulated commercial egg processing. **Journal of Food Protection**, v. 57, p. 592-595, 1994.

Chen, J.; Thesmar, H.S.; Kerr, W.L. Outgrowth of *Salmonella* and the physical property of albumen and vitelline membrane as influenced by egg storage conditions. **International Journal of Food Protection**, v. 68, n. 12, p. 2553-2558, Dez. 2005.

Duguid, J.P.; North, R.A.E. Eggs and *Salmonella* food-poisoning: an evaluation. **Journal of Medical Microbiology**, v. 34, p. 65-72, 1991.

Dunn, I.C.; Bain, M.; Edmond, A.; Wilson, P.W.; Joseph, N.; Solomon, S.; De Ketelaere, B.; De Baerdemaeker, J.; Schmutz, M.; Preisinger, R.; Waddington, D. Heritability and genetic correlation of measurements derived from acoustic resonance frequency analysis; a novel method of determining eggshell quality in domestic hens. **Poultry Science**, v.46, n.3, p.280-286, Jun. 2005.

Eckroade R.J. Diagnostic and Control of *Salmonella*. In: SYMPOSIUM ON THE DIAGNOSTIC AND CONTROL OF *SALMONELLA*, 1992, San Diego. Proceeding of the Symposium on the diagnostic and control of *Salmonella*. San Diego: **US Animal Health Association**, 1992. p. 14-20.

Espinosa, G.G.; Nieves, Z.G.; Isaías, G.T.; Ramírez, E.S.; Hergis, B. *Salmonella* Enteritidis penetration in fertile and infertile chicken eggs at progressive stages of incubation. **Vet. Méx.**, v.27, n.4, p.285-288, out.-dec. 1996.

Estupiñan, J., Cuéllar, M.N., D'agostinho, M., Enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) en Latinoamérica y el Caribe. In: **Congresso Latino-Americano de Microbiologia e Higiene de Alimentos**, 5, Águas de Lindóia, SP. Anais... São Paulo: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1998. v.1, p.69, 1998.154p.

Fajardo, T.A.; Anantheswaran, V.M.; Knabel, S.J. Penetration of *Salmonella* Enteritidis into eggs subjected to rapid colling. **Journal of Food Protection**, v. 58, p. 473-477, 1995.

Farmer, M.; Roland, D.A.; Eckman, M.K. 1. Calcium metabolism in broiler breeder hens. 2. The influence of the time of feeding on calcium status of the digestive system and eggshell quality in broiler breeders. **Poultry Science**, v. 62, n.3, p. 465-471, Mar. 1983.

Flores, M.L.; Silva, J.H.S; Nascimento, V.P.; Kader, I.I.T.A; Santos, L. R.; Pontes, A.P.; Salle, C.T.P.; Lopes, R.F.F. Detection of *Salmonella* in chicken eggs through the technique of PCR. **Higiene Alimentar**; v.15, n. 80, p. 63- 68, jan.-fev. 2001.

Franco, B.D.G.M.; Landgraf, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu. 1 ed. 1996. 182p.

Gast R.K.; Beard C.W. Detection and enumeration of *Salmonella* Enteritidis in fresh and stored eggs laid by experimentaly infected hens. **Journal of Food Protection**, v. 55, p. 153-156, 1992.

Gast, R.K.; Bouldin, J.G.; Holt P.S. Deposition of *Salmonella* Heidelberg inside eggs in experimental infection studies. In: SYMPOSIUM ON THE DETECTION AND CONTROL OF *SALMONELLA* ENTERITIDIS IN POULTRY, 2004, USA. Proceeding of the Symposium on the detection and control of *Salmonella* Enteritidis in poultry. USA: **US Animal Health Association**, 2004. 42 p.



Gast R.K.; Holt P.S.; Murase T. Penetration of *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Heidelberg into egg yolks in an in vitro contamination model. **Poultry Science**, v. 84, n. 4, p. 621-625, Apr. 2005.

Germano, P.M.L.; Germano M.I.S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos**. São Paulo: Varela. 1 ed. 2001. 629p.

Guard-Petter, J. The chicken, the egg and *Salmonella* Enteritidis. **Environmental Microbiology**, v.3, n.7, p.421-430, jul. 2001.

Hammack, T.S.; Sherrod, P.S.; Bruce, V.R. Growth of *Salmonella* Enteritidis in grade A eggs during prolonged storage. **Poultry Science**, v.72, p.373-377, 1993.

Hansenson, L.B.; Kaftyreva, L.; Laszlo, V.G.; Woitenkova, E.; Nesterova, M. Epidemiological and microbiological data on *Salmonella* Enteritidis. **Acta Microbiology Hung**, v. 39, p. 31-39, 1992.

Henzler D.J.; Optiz, H.M. The role of mice in the epizootiology of *Salmonella* Enteritidis infection on chicken layer farms. **Avian Diseases**, v.36, p. 625 – 631, 1992.

Hirsch, D. C.; Zee, Y. C. **Microbiologia Veterinária**. Ed. Guanabara Koogan. 1ed. 2003. 446p.

Hofer, E.; Silva Filho, S. J.; Reis, E. M. F. Prevalência de sorovares de *Salmonella* isolados de aves no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.17, n.2, p.55-62. abr.-jun. 1997.

Jones, F.T.; Rives, D.V.; Carey, J.B. *Salmonella* contamination in commercial eggs and an egg production facility. **Poultry Science**, v. 74, p. 753-757, 1995.

Kanashiro, A.M.I.; Castro, A.G.M.; Cardoso, A.L.S.P.; Tessari, E.N.C.; Jesus, C.A.M.; Ferreira, E.; Souza, E.C.A. Isolamento de *Salmonella* Enteritidis em ovos comerciais, durante rastreamento de possível fonte de infecção em humanos. **Higiene Alimentar**, v.16, n.101, p.76-79, out. 2002.

Lapao, C.; Gama, L.T.; Soares, M.C. Effects of broiler breeder age and length of egg storage on albumen characteristics and hatchability. **Poultry Science**, v.78, n.5, p.640-645, Maio, 2005.

Lírio, V.S.; Silva, E.A.; Stefoni, S. Frequência de 17 sorotipos de *Salmonella* isolados em alimentos. **Higiene Alimentar**, v.12, p.36-42, 1998.

Lock, J.L.; Dolman, J.; Board, R.G. Observations on the mode of bacterial infection of hen's eggs. **FEMS microbiology letters**, v. 100, p. 71-74, 1992.

Mammaia, C.; Talini, M.; Pontello M.; Di Noto, A.M.; Natasi, A. Clonal circulation of *Salmonella enterica* serotype Heidelberg in Italy. **Euro Surveill**, v. 11, n. 8, p.222-225, nov. 2003.

Messens, W.; Grijspeerdt, K.; Herman, L. Eggshell characteristics and penetration by *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis through the production period of a layer flock. **British Poultry Science**, v.46, n. 6, p. 694-700, December, 2005.

Miyamoto, T.; Horie, T.; Baba, E.; Sasai, K.; Fukata, T.; Arakawa, A. *Salmonella* penetration through eggshell associated with freshness of laid and refrigeration. **Journal of Food Protection**, v. 61, n. 3, p. 350-353, 1998.

Noordhizen, J.P.; Frankena, K. *Salmonella* Enteritidis: clinical epidemiological approaches for prevention and control of *Salmonella* Enteritidis in poultry production. **Journal Food Microbiology**, v.21, p.131-143, 1994.

Okamura, M.; Kamijima, Y.; Miyamoto, T.; Tani H.; Sasai, K., Babab, E. Differences among six *Salmonella* serovars in abilities to colonize reproductive organs and to contaminate eggs in laying hens. **Avian Diseases**, v.45, n.1, p.61-69, jan-mar 2001.

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

Orban J.I.; Roland D.A. Sr; Cummins K.; Lovell R.T. Influence of large doses of ascorbic acid on performance, plasma calcium, bone characteristics, and eggshell quality in broilers and Leghorn hens. **Poultry Science**, v. 72, n. 4, p. 691-700, Abril, 1993.

Pappas, A.C.; Acamovic, T.; Sparks, N.H.; Surai, P.F.; McDevitt, R.M. Effects of supplementing broiler breeder diets with organic selenium and polyunsaturated fatty acids on egg quality during storage. **Poultry Science**, v. 84, n. 6, p. 865-874, Jun., 2005.

Pinto, A.T. Ocorrência de enfermidades bacterianas transmitidas por alimentos no estado do Rio Grande do Sul. 1999. 124p. **Dissertação**. UFRGS, Porto Alegre, 1999.

Rizk, S.S.; Ayres, J.C.; Kraft, A.A. Effect of holding condition on the development of *Salmonella* in artificially inoculated hens' eggs. **Poultry Science**, v. 45, p. 825-829, 1996.

Rodrigue, D.C.; Tauxe, R.V.; Rowe, B. International increase in *Salmonella* Enteritidis: a new pandemic? **Epidemiological Infect**, v. 105, p. 21-27, 1990.

Rodrigues, D.P. Ecologia e prevalência de *Salmonella spp* em aves e material avícola no Brasil. In: CONFERÊNCIA APINCO 2005 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2005, Santos. Anais... Santos, 2005. p.223-237.

Roque, L.; Soares, MC. Effects of eggshell quality and broiler breeder age on hatchability. **Poultry Science**, v. 73, n. 12, p. 1838-1845, Dez. 1994.

Sauter, E.A.; Petersen, C.F. The effect of egg shell quality on penetration by various salmonellae. **Poultry Science**, v. 53, p. 2159-2162, 1974.

Schoeni, J.L.; Glass, K.A.; McDermott, J.L.; Wong, A.C.L. Growth and penetration of *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Heidelberg and *Salmonella* Typhimurium in eggs. **International Journal of Food Microbiology**, v. 24, p. 385-396, 1995.

Shah, D.B.; Bradshaw, J.G.; Peeler, J.T. Thermal resistance of egg-associated epidemic strains of *Salmonella* Enteritidis. **Journal of Food Science**, v.56, p.391-393, 1991.

Silva, E.N. *Salmonella* Enteritidis em aves e saúde pública. **Higiene Alimentar**, v.9,p.7-13,1995.

Silva, E.N.; Duarte A. *Salmonella* Enteritidis em Aves: Retrospectiva no Brasil. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, v. 4 n. 2, 2002.

Silva, N.; Junqueira,V.C.A.; Silveira, N.F.A. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos**. São Paulo: Varela, 2001. 41p.

Simmons, E.R.; Ayres, J.C.; Kraft, A.A. Effect of moisture and temperature on ability of *Salmonella* to infect shell eggs. **Poultry Science**, v. 49, p. 761-768, 1970.

Spackman, D. *Salmonella* in poultry in the U.K. Observations and actions. In: WESTERN POULTRY DISEASE CONFERENCE, 1989, Sacramento. Proceeding of the Western Poultry Disease Conference. Sacramento, 1989. p.207-210.

Sparks, N.H.C.; Board, R.G. Bacterial penetration of the recently oviposited shell of hens' eggs. **Australian Veterinary Journal**, v. 62, p. 169-170, 1985.

Taunay, A.E.; Fernandes, S.A.; Tavechio, A.T. The role of Public Laboratory in the problem of salmonellosis in São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v.38, p.119-127, 1996.

Tauxe, R.V. Emerging foodborne diseases: An evolving public health challenge. **Centers Disease Control Prevention**. Atlanta: Special Issue, v.3, p.12, 1997.

Tortora, G.J.; Funke, B.R.; Case, C.L. **Microbiologia**. Porto Alegre: Artmed, 2002. 827p.

Zancan, F.T.; Junior, A. B.; Fernandes, S. A.; Gama, N.M.S.Q. *Salmonella spp.* investigation in transport boxes of day-old birds. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.31, n.3, p.230-232, jul.-set. 2000.

Zhang L.C.; Ning Z.H.; Xu G.Y.; Hou Z.C., Yang N. Heritabilities and genetic and phenotypic correlations of egg quality traits in brown-egg dwarf layers. **Poultry Science**, v. 84, n. 8, p. 1209-1213, Ago. 2005.