

**DETECÇÃO DE *Salmonella* Enteritidis EM OVOS DE CODORNAS JAPONESAS
(*Coturnix coturnix japonica* - TEMMINCK E SCHLEGEL, 1849) SUBMETIDAS A
ESTRESSE CÍCLICO PELO CALOR***

Edson Ryuiti Katayama¹

Taís Cremasco Donato²

Francine Vercese²

Edivaldo Antonio Garcia³

Adriano Sakai Okamoto³

Raphael Lucio Andreatti Filho³

RESUMO

Ovos consumidos crus ou em alimentos sem tratamento adequado foram identificados como responsáveis por surtos de infecção humana causada por *Salmonella* spp. A qualidade da casca dos ovos exerce influência na entrada da bactéria presente na superfície da casca para o interior dos ovos. Ovos com baixos valores de gravidade específica são mais susceptíveis a penetração por *Salmonella*. Poedeiras sob condições de estresse térmico podem apresentar diminuição do consumo de ração e da gravidade específica dos ovos. Desta forma, objetivou-se avaliar a contaminação por *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorotipo Enteritidis (SE) em ovos de codornas japonesas submetidas a estresse cíclico pelo calor. Foram utilizados ovos provenientes de 144 codornas japonesas submetidas a dois tratamentos assim dispostos: T1 – aves em temperatura ambiente constante de 21°C e T2 – aves em temperatura ambiente cíclica e crescente, partindo dos 21°C até atingir 33°C, e no final deste período os ovos foram coletados. Nos períodos de zero, 24, 96 e 168 horas após a imersão dos ovos em caldo contendo SE, os ovos foram examinados para verificar a quantidade de SE na casca e no conteúdo interno. Durante o armazenamento a 25°C, a quantidade de SE na casca foi decrescente. Nos períodos de 96 e 168 horas de armazenamento, somente no T2, com temperatura final de 33°C, detectou-se SE no conteúdo interno dos ovos, demonstrando que ovos provenientes de codornas mantidas em condições de estresse térmico pelo calor oferecem maiores riscos à saúde pública.

Palavras-chave: *Salmonella* Enteritidis, saúde pública, ovos de codorna, microbiologia de alimentos.

* Fonte financiadora: CNPq.

¹ Médico Veterinário da Brasil Foods S.A., Rodovia BR 060 Km 394, s/n, Rio Verde, GO, 75.901-970, erkatayama@gmail.com.

² Alunos de Pós Graduação da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Univ. Estadual Paulista – UNESP/Botucatu, tais.donato@yahoo.com.br. • Correspondência: Taís Cremasco Donato. Hospital Veterinário, s/n, Laboratório de Ornitopatologia – Prédio da Patologia, Distrito de Rubião Junior – Botucatu – São Paulo, 18618-970. (14) 3880-2073 ou (14) 8142-3063. tais.donato@yahoo.com.br ou erkatayama@gmail.com.

³ Docentes da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Univ. Estadual Paulista - UNESP, Distrito de Rubião Júnior, s/n°, Botucatu, SP, 18.618-970, andreatti@fmvz.unesp.br.

DETECTION OF *Salmonella* Enteritidis IN EGGS OF JAPANESE QUAIL (*Coturnix coturnix japonica* - TEMMINCK E SCHLEGEL, 1849) SUBMITTED TO CYCLIC HEAT STRESS

ABSTRACT

Eggs or foods eaten raw without using adequate treatment were identified as responsible for outbreaks of human infection by *Salmonella* spp. The quality of shell eggs influences the entry of *Salmonella* spp. present on the surface of the shell to the inside of the eggs. Eggs with low specific gravity values are more susceptible to penetration by *Salmonella*. Layers under conditions of heat stress may have reduced feed intake and specific gravity of eggs. Thus, the objective was to evaluate the contamination of *Salmonella* enterica serotype Enteritidis (SE) in eggs of Japanese quail subjected to cyclic heat stress. Were used 144 eggs from Japanese quail subjected to two treatments as it follows: T1 - quail at room temperature of 21 ° C and T2 - birds and increasing cyclic temperature, starting from 21 ° C until it reaches 33 ° C, and end of this period the eggs were collected. During periods of zero, 24, 96 and 168 hours after immersion of eggs in broth containing SE, the eggs were examined to check the amount of SE in shell and internal contents. The amount of SE in shell during storage at 25 ° C was decreasing. In periods of 96 and 168 hours of storage, only at T2 (33 ° C) was detected SE in the internal content of the eggs in the experimental conditions, demonstrating that the eggs of quail kept under conditions of heat stress presents greater risks for public health.

Keywords: *Salmonella* Enteritidis, public health, quail eggs, food microbiology.

DETECCIÓN DE *Salmonella* Enteritidis EN HUEVOS DE CODORNIZ JAPONESA (*Coturnix coturnix japonica* - TEMMINCK E SCHLEGEL, 1849) SOMETIDAS A ESTRÉS CÍCLICO POR CALOR

RESUMEN

Los alimentos que contienen huevos sin un tratamiento adecuado fueron identificados como los principales responsables de brotes de infección causada por bacterias del género *Salmonella* en humanos. La calidad de la cáscara tiene influencia directa en la migración de bacterias presentes en la superficie hacia el interior del huevo. Así, los huevos con densidad específica baja son más susceptibles a la penetración por *Salmonella*. Las ponedoras en condiciones de estrés por calor pueden reducir el consumo de alimento y por lo tanto producir huevos con baja gravedad específica. El objetivo de este trabajo fue evaluar la contaminación por *Salmonella* enterica subespecie enterica serotipo Enteritidis (SE) en los huevos de codorniz japonesa sometida a estrés cíclico por calor. Se utilizaron 144 huevos de codorniz japonesa sometidos a los siguientes tratamientos: T1 - aves en temperatura ambiente constante de 21 ° C y T2 - aves sometidas a incremento cíclico de temperatura , de 21 ° C hasta 33° C. Los huevos fueron recolectados al final de este período. Cero, 24, 96 y 168 horas después de inmersión en un caldo con SE, los huevos fueron examinados para verificar la cantidad de SE en la cáscara y en su interior. La cantidad de SE en la cáscara durante el almacenamiento a 25 ° C fue disminuyendo. Después de 96 y 168 horas de almacenamiento, los huevos del T2 con temperatura final de 33° C presentaron SE únicamente en su interior, lo que muestra que los huevos de codorniz mantenidos en condiciones de estrés térmico por calor representan mayor riesgo para la salud pública

Palabras clave: *Salmonella* Enteritidis, salud pública, huevos de codorniz, microbiología de los alimentos.

INTRODUÇÃO

As salmoneloses aviárias são doenças provocadas por bactérias do gênero *Salmonella* e a infecção humana geralmente ocorre pela ingestão de alimentos contaminados, especialmente por *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorotipo Enteritidis (SE) (1). Ovos consumidos crus ou em alimentos sem tratamento adequado foram identificados como os principais responsáveis por surtos de infecção humana por *Salmonella* spp. (2).

A contaminação bacteriana de ovos pode ocorrer antes, via ovariana ou na passagem do ovo pelo oviduto; ou após a postura, por deficiências na higiene, presença de rachaduras ou defeitos na casca (3, 4).

O resfriamento rápido do ovo após a postura é o principal fator que predispõe a contaminação interna, pois o ovo ao sair pela cloaca está a 42°C (mesma temperatura interna da ave), porém, em contato com o ambiente há uma diminuição da sua temperatura interna, o que provoca a formação de uma pressão negativa em seu interior e permite a entrada de *Salmonella* Enteritidis presente em sua superfície (5).

A cutícula, casca, membranas internas e albúmen são estruturas presentes nos ovos que protegem a gema de contaminação microbiana (6). As membranas da casca retêm o fluido do albúmen e agem como um filtro, promovendo resistência à invasão bacteriana. Em ovos de codornas japonesas, esta membrana é mais resistente, quando comparada com ovos de galinhas poedeiras (7). Entretanto, o uso de um inóculo com alta concentração bacteriana e a permanência dos ovos em temperaturas de 37°C pode facilitar a penetração bacteriana, mesmo com uma membrana interna resistente (8).

Dependendo da qualidade da casca, condições de higiene, tempo e temperatura de estocagem, bactérias como *Salmonella* spp. presentes na superfície da casca de ovos podem penetrar em seu interior (3, 9-11). Podem inclusive invadir o conteúdo de ovos de casca íntegra (12). Outros fatores também interferem nesta invasão, como o esfriamento natural do ovo após a postura, umidade do ar e tratamentos da superfície da casca (13).

A qualidade e espessura da casca estão relacionadas intimamente com a gravidade específica dos ovos. Segundo Hamilton (14), a gravidade específica aumenta à medida que a espessura da casca aumenta, ou seja, os valores estão diretamente relacionados. Ovos com gravidade específica elevada apresentaram um menor índice de contaminação quando comparados com ovos de gravidade específica menor. Portanto, ovos com baixos valores de gravidade específica são mais susceptíveis a penetração por *Salmonella* spp. (13). A relação entre a gravidade específica, espessura e percentual de casca com resistência à quebra foi avaliada por Vercese (15) que demonstraram uma redução de resistência de casca a quebra em temperaturas acima de 21°C, sendo que a partir de 27°C a espessura da casca foi reduzida e com 30°C houve uma diminuição da gravidade específica.

Dados semelhantes foram observados por Franco-Jimenez et al. (16), que trabalharam com linhagens genéticas de poedeiras comerciais e as submetem ao estresse por calor a 35°C, por duas semanas. Houve redução em 3% ou mais na produção de ovos, consumo de ração, espessura da casca e gravidade específica quando comparados com aves mantidas em temperatura ambiente (22°C).

Mashaly et al. (17) submetem aves poedeiras de 31 semanas a três tratamentos em câmara bioclimática, com temperaturas cíclicas e sob condições de estresse térmico constante de 35°C e 50% de umidade relativa. Como resposta, os autores verificaram que o ganho de peso das aves e o consumo de ração foram significativamente reduzidos nas condições de estresse, bem como o peso dos ovos, espessura e peso de casca, e a gravidade específica.

Em condições de estresse térmico, há uma diminuição no consumo de ração, pois o alimento aumenta o metabolismo e, conseqüentemente, a quantidade de calor corporal, porém, a diminuição na ingestão de nutrientes afeta diretamente a produtividade (18). Durante

períodos de altas temperaturas, galinhas poedeiras também são afetadas por alterações no equilíbrio ácido-básico, que desencadeiam um desequilíbrio eletrolítico e mineral. Isto ocorre devido à maior perda de CO₂ causada pelo aumento da frequência respiratória. A alcalose reduz a concentração de cálcio livre no sangue e aumenta a proporção de cálcio ligado à proteína ou complexado com ácidos orgânicos, podendo resultar em ovos de casca fina (19).

A temperatura ambiente ideal (termoneutra) para codornas na fase de postura está entre 18 e 22°C (20). A zona de termoneutralidade está relacionada com o ambiente térmico ideal, no qual a amplitude é bem estreita. Nesta, o animal alcança seu potencial máximo e a temperatura corporal é mantida com mínima utilização de mecanismos termorreguladores (21).

Desta forma, o presente estudo avaliou a contaminação pós-postura por *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorotipo Enteritidis em ovos, contaminados experimentalmente, de codornas japonesas (*Coturnix coturnix japonica*) alojadas em diferentes temperaturas ambientais (termoneutra e estresse térmico pelo calor) e armazenados por diversos períodos em temperatura ambiente de 25 C.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 72 ovos em período inferior a 24 horas após a postura, provenientes de codornas japonesas (*Coturnix coturnix japonica*) com 36 semanas de idade. As aves foram alojadas em duas salas, com três gaiolas cada, com câmara bioclimática. O aquecimento das salas foi realizado com o auxílio de aquecedores elétricos acoplados a um termostato e o resfriamento pela utilização de aparelhos de ar condicionado, dotados de controle automático de temperatura. O programa de luz adotado foi de 17 horas de luz diária. Durante todo o período experimental, as aves foram submetidas a idêntico manejo alimentar, sendo fornecidas água e ração à vontade. O arraçoamento foi realizado duas vezes ao dia. As dietas foram isonutritivas, compostas por milho e farelo de soja, fornecendo 2.800 kcal de EM/kg de ração, 20% de proteína bruta, 3,2% de cálcio, 0,35% de fósforo disponível, 0,45% de metionina, 0,76% de metionina + cistina e 1,07% de lisina, de acordo com as exigências nutricionais propostas pelo NRC (1994).

Utilizou-se delineamento experimental inteiramente casualizado, constituído de dois tratamentos com três repetições contendo 24 aves cada, assim dispostos:

T1 – aves em temperatura ambiente de 21°C;

T2 – aves em temperatura ambiente cíclica e crescente.

No T2 as aves foram expostas as temperaturas testadas durante 10 horas diárias (das 8:00 as 18:00h). A temperatura inicial foi de 21°C, e esta, a cada período de 14 dias foi elevada para as seguintes temperaturas: 24°C, 27°C, 30°C, 33°C, permanecendo a 33°C por 14 dias também. No final deste período, os ovos foram coletados em uma única coleta às oito horas da manhã.

Os ovos coletados foram imersos durante três minutos em um inóculo de *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorotipo Enteritidis fagotipo 4, isolada de fígado de matrizes pesadas, mutante resistente ao ácido nalidíxico (Nal) e rifampicina (Rif), desenvolvida em meio de cultivos sucessivos em ágar verde brilhante (AVB) contendo ácido nalidíxico (100g/mL de meio) e rifampicina (100g/mL de meio).

O inóculo foi previamente incubado em caldo infusão cérebro e coração (ICC) a 40°C durante 12 horas e, no momento do uso, diluído 100 vezes em água peptonada tamponada (APT), contendo 10⁶ unidades formadoras de colônia por mL (UFC/mL). A concentração de SE no inóculo foi determinada por meio de diluições decimais seriadas em água peptonada tamponada (APT), com posterior plaqueamento em ágar verde brilhante (AVB) contendo ácido nalidíxico e rifampicina.

Os ovos foram mantidos em SE sob temperatura ambiente de 25°C e no momento zero, 24, 96 e 168 horas após imersão foram examinados para verificar a quantidade de SE na casca e conteúdo interno.

Para avaliação da contaminação da casca, um *pool* de três ovos foi colocado durante três minutos em bolsas plásticas contendo 75 mL de APT e, diluições decimais seriadas em APT foram plaqueadas em duplicata de AVB acrescido de Nal e Rif. Posteriormente, imergiram-se os ovos em solução de etanol a 70%, durante três minutos. Após secagem, estes foram quebrados assepticamente e 10mL do conteúdo interno foram misturados a 90mL de APT, repetindo-se este procedimento na quantificação de SE das cascas. Concomitantemente, 24 ovos excedentes foram examinados com o intuito de verificar contaminação prévia por *Salmonella* spp. (22).

RESULTADOS

As médias de temperatura ambiente máxima foram obtidas durante as 10 horas de exposição às temperaturas testadas e as médias de temperatura mínima foram obtidas durante a madrugada, quando o sistema de aquecimento encontrava-se desligado. Observa-se que média de variação entre as temperaturas máxima e mínima durante o período experimental, para as temperaturas testadas, foi de 3,93°C. Para a variável umidade relativa houve média de 72,4%, com variação de 12,38%.

Para a sala mantida em ambiente termoneutro, a temperatura foi de 21°C ± 2°C, com média de 53,64% para a umidade relativa durante todo o período experimental.

A quantidade de SE encontrada na casca e no interior dos ovos de codornas estão apresentadas nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1. Detecção de SE (médias das 3 repetições em UFC/mL) nas cascas de ovos de codornas submetidas a temperaturas ambiente de 21 e 33°C, após zero, 24, 96 e 168 horas de armazenamento.

Tratamentos	Local	Períodos de armazenamento			
		0h	24h	96h	168h
T1: 21°C	Casca	2,0x10 ⁴ Aa	5,0x10 ² Bb	4,6x10 ¹ Bc	< 10 ⁰ Ad
T2: 33°C	Casca	2,0x10 ⁴ Aa	3,8x10 ³ Ab	5,0x10 ² Ac	< 10 ⁰ Ad

Letras maiúsculas distintas entre os tratamentos, dentro de cada período de armazenamento avaliado (coluna), e letras minúsculas distintas entre os períodos de armazenamento, dentro de cada tratamento avaliado (linha), diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

Tabela 2. Detecção de SE (médias das 3 repetições em UFC/mL) no conteúdo interno de ovos de codornas submetidas a temperaturas ambiente de 21 e 33°C, após zero, 24, 96 e 168 horas de armazenamento.

Tratamentos	Local	Períodos de armazenamento			
		0h	24h	96h	168h
T1: 21°C	Interno	< 10 ⁰ Aa	< 10 ⁰ Aa	< 10 ⁰ Ba	< 10 ⁰ Aa
T2: 33°C	Interno	< 10 ⁰ Ab	< 10 ⁰ Ab	4,3x10 ¹ Aa	1,0x10 ¹ Aa

Letras maiúsculas distintas entre os tratamentos, dentro de cada período de armazenamento avaliado (coluna), e letras minúsculas distintas entre os períodos de armazenamento, dentro de cada tratamento avaliado (linha), diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

DISCUSSÃO

A quantidade de SE na casca durante o armazenamento a 25°C foi decrescente em ambos os tratamentos, sendo que após 168 horas, não foi mais detectada SE na casca em nenhum dos tratamentos, contrariando os resultados observados em alguns estudos com ovos de galinhas poedeiras, onde se detectou quantidades significativas de SE durante todo o período de análise (2, 3, 11, 22).

Nos períodos de 96 e 168 horas de armazenamento, somente em ovos oriundos de aves submetidas à temperatura de 33°C, observou-se SE em seu conteúdo interno, nas condições experimentais deste trabalho, indicando que a alta temperatura ambiental que as aves foram expostas provocou modificações na casca, permitindo a entrada de SE no interior dos ovos após um período de 24 horas à 96 horas de armazenamento. Estes resultados concordam com o observado por Oliveira e Silva (23) em ovos de galinhas poedeiras, que trabalhando isoladamente com gema, constataram a contaminação desta por SE, proveniente da casca, a partir de 24 horas após contaminação artificial.

Dados semelhantes também foram observados por Franco-Jimenez et al. (16), em galinhas poedeiras comerciais submetidas ao estresse por calor durante duas semanas, onde ocorreu redução no consumo de ração, espessura da casca e gravidade específica.

Portanto a diminuição da gravidade específica do ovo, presença de rachaduras ou defeitos nas cascas podem facilitar a contaminação do conteúdo interno dos ovos.

CONCLUSÕES

Condições de estresse cíclico pelo calor afetam negativamente a qualidade dos ovos, o que poderá facilitar a contaminação bacteriana do seu conteúdo interno. Portanto, a adoção de tecnologias que controlem a temperatura ambiente, principalmente em regiões de clima quente, além de melhorar o bem-estar animal, melhora a qualidade dos ovos e a segurança do alimento, fatores importantes para a manutenção da escala de produção, exportação e conquista de novos mercados.

COMITE DE ÉTICA E BIOSSEGURANÇA

Todos os procedimentos realizados encontram-se de acordo com as normas e princípios éticos de experimentação animal, estabelecidos pela Câmara de Ética em Experimentação Animal da FMVZ/UNESP, sendo o experimento aprovado pela mesma (Protocolo nº 164/2008-CEUA) em 26 de agosto de 2008.

REFERÊNCIAS

1. Andreatti Filho RL. Paratifo aviário. In: Saúde aviária e doenças. São Paulo: Roca; 2007. p.96-106.
2. Gast RK, Beard CW. Detection and enumeration of *Salmonella* Enteritidis in fresh and stored eggs laid by experimentally infected hens. *J Food Prot.* 1992;55:152-6.
3. Humphrey TJ, Whitehead AH, Gawler AHL, Henley A, Rowe B. Numbers of *Salmonella* Enteritidis in the contents of naturally contaminated hens' eggs. *Epidemiol Infect.* 1991;106:489-96.
4. Mayes FJ, Takaballi MA. A microbial contamination of the hen's egg: a review. *J Food Prot.* 1983;46:1092-8.
5. Cox NA, Berrang ME, Cason JA. *Salmonella* penetration of egg shells and proliferation in broiler hatching eggs – a review. *Poult Sci.* 2000;79:1571-4.
6. Tranter HS, Board RG. The antimicrobial defense of avian eggs: biological perspective and chemical basis. *J Appl Biochem.* 1982;4:295-338.
7. Burley RW, Vadehra DV. *The avian egg: chemistry and biology.* New York: John Wiley and Sons; 1989.
8. Williams JE, Dillard LH, Hall GO. The penetration patterns of *S. typhimurium* through the outer structures of chicken eggs. *Avian Dis.* 1968;12:445-66.
9. Humphrey TJ. Growth of salmonellas in intact shell eggs: influence of storage temperature. *Vet Rec.* 1990;126:292.
10. Padron MN. *Salmonella typhimurium* penetration through the eggshell of hatching eggs. *Avian Dis.* 1990;34:463-5.
11. Schoeni JL, Glass KA, Mcdermott JL, Wong ACL. Growth and penetration of *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Heidelberg and *Salmonella* Typhimurium in eggs. *Int J Food Microbiol.* 1995;24:385-96.
12. Berrang ME, Cox NA, Frank JF, Buhr RJ. Bacterial penetration of the eggshell and shell membranes of the chicken hatching egg: a review. *J Appl Poult Res.* 1999;8:499-504.
13. Sauter EA, Petersen CF. The effect of egg shell quality on penetration by various *Salmonellae*. *Poult Sci.* 1974;53:2159-62.
14. Hamilton RMG. Methods and factors that affect measurement of egg shell quality. *Poult Sci.* 1982;61:2002-39.
15. Vercese F. Efeito da temperatura sobre o desempenho e a qualidade dos ovos de codornas japonesas [dissertação]. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista; 2009.

16. Franco-Jimenez DJ, Scheideler SE, Kittok RJ, Brown-Brandil TM, Robeson LR, Taira H, et al. Differential effects of heat stress in three strains of laying hens. *J Appl Poult Res.* 2007;16:628-34.
17. Mashaly MM, Hendrics GL, Kalama MA, Gehad AE, Abbas AO, Patterson PH. Effect of heat stress on production parameters and immune response of commercial laying hens. *Poult Sci.* 2004;83:889-94.
18. Teeter RG. Otimização da produtividade em frangos de corte durante o estresse calórico. In: *Anais do 1º Simpósio Técnico Planalquímica*; 1989, São Paulo. São Paulo: Planalquímica; 1989. p.17-40.
19. Furlan RL. Produtividade vs. Comportamento animal. In: *Anais do 7º Congresso de produção, comercialização e consumo de ovos*; 2009, São Pedro. São Pedro: APA; 2009. p.124-41.
20. Murakami AE, Ariki J. Produção de codornas japonesas. Jaboticabal: FUNEP;1998.
21. Silva IJO, Nãs IA, Buckln RA. Evaluation of egg production housing in hot 50 climate. Atlanta: ASAE; 1994. Paper ASAE, 94.4567.
22. Barros MR, Andreatti Filho RL, Lima ET, Sampaio HM, Crocci AJ. Survival of *Salmonella* Enteritidis in eggs artificially contaminated, after disinfection and stored at different temperatures. *Rev Bras Cienc Avic.* 2001;3:219-223.
23. Oliveira DD, Silva EN. *Salmonella* em ovos comerciais: ocorrência, condições de armazenamento e desinfecção da casca. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2000;52:655-61.

Recebido em: 06/12/11

Aceito em: 28/05/12