

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
MEDICINA VETERINÁRIA
DOUTORADO EM HIGIENE
VETERINÁRIA E PROCESSAMENTO
TECNOLÓGICO DE PRODUTOS DE
ORIGEM ANIMAL

JOSÉ CARLOS ALBUQUERQUE DO PRADO
CARVALHO

AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS DA PASTEURIZAÇÃO DE
OVOS EM CASCA, CONSIDERANDO A DESTRUIÇÃO DA
Salmonella Enteritidis

UNIVERSIDADE
FEDERAL
FLUMINENSE

NITERÓI/RJ
2005

JOSÉ CARLOS ALBUQUERQUE DO PRADO CARVALHO

AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS DA PASTEURIZAÇÃO DE OVOS EM CASCA, CONSIDERANDO A DESTRUIÇÃO DA *Salmonella* Enteritidis

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção de Grau de Doutor. Área de Concentração: Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Borges Mano

Co-Orientadores: Prof. Dr. Luiz Antônio Trindade de Oliveira

Prof. Dr. Robson Maia Franco

**NITERÓI/RJ
2005**

JOSÉ CARLOS ALBUQUERQUE DO PRADO CARVALHO

AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS DA PASTEURIZAÇÃO DE OVOS EM CASCA, CONSIDERANDO A DESTRUIÇÃO DA *Salmonella* Enteritidis

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção de Grau de Doutor. Área de Concentração: Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal

Aprovada em 19 de agosto de 2005.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Sérgio Borges Mano
Universidade Federal Fluminense - UFF

Prof. Dr. Luiz Antônio Trindade de Oliveira
Universidade Federal Fluminense - UFF

Prof. Dr. Robson Maia Franco
Universidade Federal Fluminense - UFF

Profa. Dra. Mônica Queiroz de Freitas
Universidade Federal Fluminense - UFF

Profa. Dra. Maristela Lovato Flôres
Universidade Federal de Santa Maria - UFSM

Prof. Dr. Paulo César Augusto de Souza
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - UFRRJ

NITERÓI/RJ
2005

À minha esposa Renata pelo amor, carinho e incansável incentivo sem os quais não teria alcançado esta etapa da minha vida profissional.

Aos meus filhos Beatriz e Henrique pela razão e alegria da minha vida.

Aos meus pais José e Maria Auxiliadora e minha irmã Mônica por terem me proporcionado a educação que foi a base da minha formação.

Aos mais jovens da minha família como exemplo de responsabilidade, persistência, confiança, humildade e fé.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Sérgio Borges Mano, pela oportunidade, confiança, orientação, atenção e grande paciência, que foram fundamentais para o desenvolvimento deste experimento e elaboração desta tese de doutorado.

Aos Profs. Drs. Luiz Antônio Trindade de Oliveira, Robson Maia Franco e ao colega Alcinez Paes Fidelis pela amizade, carinho, companheirismo, estímulo, aconselhamento, atenção, formação, orientação, confiança e paciência, que proporcionaram o meu desenvolvimento profissional e pessoal me capacitando e viabilizando a participar do Programa de Doutorado.

À Colega Fernanda Lima Cunha pelo carinho, atenção e apoio na execução do experimento.

Às Colegas Eliane Teixeira Mársico, Valéria Moura de Oliveira e Virginia Léo de Almeida Pereira pela amizade, carinho, coleguismo, e incondicional apoio.

Ao Prof. Henrique Silva Pardi e demais colegas do MTA pelo apoio e confiança que viabilizaram a minha participação no Programa de Doutorado.

Aos Colegas Drausio Ferreira de Paiva e José Luiz Gomes de Azevedo pela atenção e apoio de muito tempo.

À Colega Claudia Emília Teixeira pelo companheirismo, apoio e paciência nos momentos de dificuldade de horário.

Ao Prof. Dr. Elmiro Rosendo do Nascimento pela atenção e esclarecimentos.

Aos colegas da Biblioteca da Faculdade de Veterinária pelo apoio e atenção.

Aos colegas Waginho e Dudu pela atenção.

À minha família e amigos pelo amor, carinho, atenção e paciência durante todo o curso e sempre.

A todos muito obrigado!!

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES, p.7

LISTA DE TABELAS, p.10

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS, p. 11

RESUMO, p.12

ABSTRACT, p.13

1 INTRODUÇÃO, p.14

2 REVISÃO DE LITERATURA, p.17

2.1 OVO, p.17

2.1.1 Composição, p.18

2.1.2 Ovulação, p.18

2.1.3 Formação do ovo, p.18

2.2 SALMONELAS, p.19

2.2.1 Gênero *Salmonella* spp., p.19

2.2.1.1 Características, p.19

2.2.1.2 Divisão em sorovares, p.20

2.2.1.3 Fagotipagem, p.20

2.2.1.4 Diferenciação das espécies e subespécies, p.20

2.2.1.5 Distribuição da *Salmonella* spp., p.21

2.2.2 Sorovar *Salmonella* Enteritidis, p.21

2.2.2.1 *Salmonella* Enteritidis nas aves, p.21

2.2.2.2 *Salmonella* Enteritidis em ovos, p.28

2.2.2.2.1 *Vias de acesso da Salmonella* Enteritidis em ovos, p.38

2.2.2.2.2 *Salmonella* Enteritidis e a resistência ao calor, p.48

2.2.2.2.3 *Deteccção da Salmonella* Enteritidis em ovos, p.51

2.2.2.3 *Salmonella* Enteritidis e a saúde das populações humanas, p.52

2.2.2.3.1 *Prevenção e controle*, p.64

2.3 PASTEURIZAÇÃO, p.89

2.3.1 Aspectos básicos, p.89

2.3.2 Pasteurização do ovo em casca, p.90

3 MATERIAL E MÉTODOS, p.96

3.1 MATERIAL, p.96
3.1.1 Matéria prima, p.96
3.1.2 Equipamentos, p.97
3.1.3 Vidrarias, p.97
3.1.4 Meios de cultura e soluções, p.97
3.1.5 Outros, p.97
3.2 MÉTODOS, p.98
3.2.1 Preparo das amostras, p.98
3.2.2 Inoculação dos ovos em casca diretamente nas gemas, p.99
3.2.3 Pasteurização dos ovos dos grupos IP e NIP, p.100
3.2.4 Abertura dos ovos para retirada de alíquotas das gemas e preparo de amostra para as análises bacteriológicas, p.101
3.2.5 Análises bacteriológicas dos homogeneizados de gemas e das culturas de <i>Salmonella</i> Enteritidis inoculadas, p.102
3.2.5.1 Contagem padrão de bactérias mesófilas aeróbias estritas e facultativas viáveis, p.102
3.2.5.2 Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp., p.103
4 RESULTADOS, p.104
4.1 CONTAGEM PADRÃO DE BACTÉRIAS MESÓFILAS AERÓBIAS ESTRITAS E FACULTATIVAS VIÁVEIS, p.104
4.2 PESQUISA DE <i>Salmonella</i> spp., p.107
4.3 AQUECIMENTO DOS OVOS, p.108
5 DISCUSSÃO, p.109
6 CONCLUSÕES, p.121
7 SUGESTÕES, p.122
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS, p.124
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS, p.125
10 APÊNDICES, p.138
11 ANEXOS, p.152

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Anexo 1. Incidência de salmoneloses tifóide e não tifóide nos EUA de 1920 até 1995. FONTE: TAUXE (1997), p.152
- Anexo 2. Infecções por *Salmonella* spp., 1981-1998. FONTE: WALFORD e NOAH (1999), p.152
- Anexo 3. Processo de pasteurização em casca – Caixas engradados de ovos classe A e AA (USDA) frescos que chegam continuamente ao equipamento de pasteurização em uma correia de transporte. FONTE: *NATIONAL PASTEURIZED EGGS* (2005), p.153
- Anexo 4. Processo de pasteurização em casca - Depois de um computador cuidadosamente pesar cada ovo uma esteira transportadora encaminha os ovos para uma série de tanques, com água aquecida, ultra-limpos. FONTE: *NATIONAL PASTEURIZED EGGS* (2005), p.153
- Anexo 5. Processo de pasteurização em casca - Computadores automaticamente ajustam o tempo do processo de pasteurização e fixam a temperatura de acordo com o tamanho dos ovos sendo processados. FONTE: *NATIONAL PASTEURIZED EGGS* (2005), p.154
- Anexo 6. Processo de pasteurização em casca - A combinação do tempo e temperatura de água aquece o ovo até a temperatura exata necessária para matar todas as bactérias (redução de 5 log) sem cozinhar o ovo. FONTE: *NATIONAL PASTEURIZED EGGS* (2005), p.154
- Anexo 7. Processo de pasteurização em casca - Após o período de resfriamento os ovos são embalados com uma cera natural aprovada pelo FDA para se prevenir contaminação de fontes externas e preservar o frescor. FONTE: *NATIONAL PASTEURIZED EGGS* (2005), p.155
- Anexo 8. Processo de pasteurização em casca - Após a pasteurização, os ovos são transportados através de um “*candler*” (uma máquina que identifica e remove ovos danificados). FONTE: *NATIONAL PASTEURIZED EGGS* (2005), p.155
- Anexo 9. Processo de pasteurização em casca - Todos os ovos são carimbados com a letra P dentro de um círculo para indicar que eles foram

pasteurizados de acordo com as especificações do FDA. FONTE: *NATIONAL PASTEURIZED EGGS* (2005), p.156

- Anexo 10. Processo de pasteurização em casca - Os ovos são embalados, rotulados e estocados sob refrigeração e uma temperatura precisa e ideal de 7,22°C. FONTE: *NATIONAL PASTEURIZED EGGS* (2005), p.156
- Apêndice 1. Visão parcial da Câmara onde se realizou o processamento das amostras, p.138
- Apêndice 2. Visão parcial da Câmara onde se realizou o processamento das amostras, p.139
- Apêndice 3. Visão parcial da Câmara onde se realizou o processamento das amostras , p.139
- Apêndice 4. Ovos identificados e organizados em quatro grupos, p.140
- Apêndice 5. Preparação da seringa de inoculação, p.140
- Apêndice 6. Desinfecção do local de perfuração, p.141
- Apêndice 7. Desinfecção da broca do “mini drill”, p.141
- Apêndice 8. Perfuração do ovo, p.142
- Apêndice 9. Inoculação do ovo, p.142
- Apêndice 10. Colocação de selante no orifício, p.143
- Apêndice 11. Ovos na cesta plástica, p.143
- Apêndice 12. Aquecimento dos ovos, p.144
- Apêndice 13. Pasteurização de ovos inoculados, p.144
- Apêndice 14. Desinfecção do ovo para abertura, p.145
- Apêndice 15. Quebra do ovo, p.145
- Apêndice 16. Retirada de alíquotas da gema, p.146
- Apêndice 17. Colocação de alíquotas da gema no envelope de *stomacher*, p.146
- Apêndice 18. Gemas homogeneizadas no *stomacher*, p.147
- Apêndice 19. Inoculação do frasco de SSPT, p.147
- Apêndice 20. Inoculação do frasco de SSP, p.148
- Apêndice 21. Meios inoculados para a contagem padrão de bactérias mesófilas e pesquisa de *Salmonella* spp., p.148

- Apêndice 22. Inoculação das placas para contagem padrão de bactérias mesófilas, p.149
- Apêndice 23. Vazagem do APC nas placas inoculadas para contagem padrão de bactérias mesófilas, p.149
- Apêndice 24. Pré-enriquecimento não seletivo na pesquisa de *Salmonella* spp., p.150
- Apêndice 25. Enriquecimento seletivo na pesquisa de *Salmonella* spp., p.150
- Apêndice 26. Plaqueamento seletivo na pesquisa de *Salmonella* spp., p.151
- Figura 1. Placas de APC do grupo **IP** após incubação a 35°C por 48 horas, p.105
- Figura 2. Placas de APC do grupo **NINP** após incubação a 35°C por 48 horas, p.105
- Figura 3. Placas de APC da cultura de *Salmonella* Enteritidis, p.106
- Figura 4. Cultura de *Salmonella* Enteritidis em Ágar XLD, p.108

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Número de unidades formadoras de colônias de bactérias mesófilas aeróbias estritas e facultivas viáveis por mL de amostra do grupo **INP**, p.106

TABELA 2 - Número de unidades formadoras de colônias de bactérias mesófilas aeróbias estritas e facultivas viáveis por 0,2 mL de cultura inoculadas nos grupos **INP** e **IP** nas oito repetições do experimento, p.107

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

<i>AIDS</i>	<i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i>
APC	Ágar Padrão para Contagem
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
°C	Graus Centígrados
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
DIPOA	Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal
DNA	<i>Desoxiribonucleic acid</i>
DTA	Doença Transmitida por Alimento
EUA	Estados Unidos da América do Norte
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
g	grama
HACCP	<i>Hazard Analysis Critical Control Point</i>
H ₂ S	Ácido sulfídrico
INP	Inoculado Não Processado
IP	Inoculado Processado
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
KCN	Cianeto de Potássio
KGy	Kilogray
log	logaritmo na base 10
LPS	Lipídio Polissacarídica
mL	mililitro
NIP	Não Inoculado Processado
NINP	Não Inoculado Não Processado
NMP	Número Mais Provável
PHLS	<i>Public Health Laboratory Service</i>
ppm	partes por milhão
PT	<i>Phage Type</i>
QAP	<i>Quality Assurance Programs</i>
SEF	<i>Salmonella Enteritidis Fimbriae</i>
SIF	Serviço de Inspeção Federal
SSP	Solução Salina Peptonada a 0,1%
SSPT	Solução Salina Peptonada a 1% Tamponada
TSI	<i>Tríplice Sugar Iron Ágar</i>
ufc	unidade formadora de colônia
USDA	<i>United States Department of Agriculture</i>
XLD	Xilose Lisina Desoxicolato

RESUMO

A maioria das infecções associadas com o consumo de ovos envolve ovos frescos ou produtos nos quais participam como matéria-prima. O objetivo do trabalho foi verificar se a metodologia previamente testada quanto a alterações das qualidades e propriedades do ovo, no que se refere aos parâmetros de tempo e temperatura, é suficiente para a destruição da *Salmonella* Enteritidis, considerada a de maior incidência como contaminante do conteúdo de ovos e responsável por vários casos isolados ou surtos de Doença Transmitida por Alimentos (DTA). Trabalhou-se com ovos comerciais com no máximo cinco dias de embalagem e com características de qualidade compatíveis com as estabelecidas pela legislação brasileira. Para cada repetição do experimento, as amostras foram organizadas em quatro grupos de 12 ovos cada e identificadas como inoculados processados, inoculados não processados, não inoculados processados e não inoculados não processados. Em cada ovo dos grupos inoculados, através de uma pequena perfuração na casca e membranas da casca, assepticamente, próximo ao centro da gema, inoculou-se o volume de 0,2 mL (10^5 a 10^7 células / 7 a 9 log de células) de uma cultura de *Salmonella* Enteritidis (ATCC 13076) com 48 horas de incubação. O tratamento térmico foi realizado em banho maria eletrônico, com agitação, regulado a 57°C. Os ovos dos grupos não inoculados processados e inoculados não processados, nessa ordem, foram aquecidos até esta temperatura em um período de 43 minutos. Quando então permaneceram por 20 minutos, sendo logo depois retirados e mantidos em temperatura ambiente por uma hora. Todos os ovos de todos os grupos foram assepticamente quebrados e deles retiradas alíquotas das gemas. No conjunto das gemas de todos os grupos de ovos, e também em uma alíquota de 0,2 mL da cultura, fez-se a contagem padrão de bactérias mesófilas aeróbias estritas e facultativas viáveis e a Pesquisa de *Salmonella* spp. segundo a legislação brasileira. A partir das gemas dos ovos dos grupos inoculado processado, não inoculado processado e não inoculado não processado não ocorreu formação de unidades formadoras de colônias nas placas de contagem, e não se recuperou a cepa de *Salmonella enteritidis* inoculada. Conclui-se que este tratamento pode ser considerado como um processamento higiênico sanitário de ovos em casca com o objetivo de torná-los inócuos ao consumidor. Sugere-se o investimento, por parte do governo, no desenvolvimento de tecnologias de pasteurização de ovos em casca em larga escala ao nível industrial.

Palavras chaves: tratamento térmico, bactérias aeróbias mesófilas, processamento higiênico sanitário

ABSTRACT

Most of the infections associated with the consumption of eggs involves fresh eggs or side products in what that they participate as raw material. The purpose of this work was verify if the methodology previously tested as to alterations of the qualities and properties of the egg, as for the parameters of time and temperature, it is enough for *Salmonella* Enteritidis's destruction, considered the one of larger incidence as contaminant of the content of eggs and responsible for several isolated cases or outbreaks of DTA. It was used commercial eggs with at most five days of packing and with compatible quality characteristics with the established ones for the Brazilian legislation. For each repetition of the experiment, the samples were organized in four groups of 12 eggs each, identified as inoculated processed, not inoculated processed, inoculated not processed, not inoculated not processed. In each egg of the groups inoculated processed and inoculated not processed, through a small perforation in the shell and membranes of the shell, aseptically, with aid of a syringe and needle sterilized, close to the center of the yolk, It was inoculated the amount of 0,2 mL(10^5 to 10^7 cells / 7 to 9 log cells) of a culture of *Salmonella* Enteritidis (ATCC 13076) with 48 hours of incubation. The thermal treatment was accomplished in electronic bath with agitation, regulated to 57°C. The eggs of the groups not inoculated processed and inoculated processed in this order, were warm up until this temperature in a period of 43 minutes. They were kept in this temperature in a period of 20 minutes, and then left at room temperature for one hour. All the eggs of all the groups were aseptically broken and yolks samples were taken. It was made the viable aerobic mesophilic bacteria counting in plates and the research of *Salmonella* spp. according to the brazilian legislation. In the group of the yolks of all of the groups of eggs, and also in an amount of 0,2 mL of the culture. From the yolks of the eggs of the groups inoculated processed, not inoculated processed and not inoculated not processed didn't happen formation of colony formation units in the counting plates, and didn't recover the stump of *Salmonella* Enteritidis inoculated. It is ended that this treatment can be considered as a hygienic sanitary processing of shell eggs with the objective to turn them innocuous to the consumer. It is suggests the investment, on the part of the government, in the development of technologies of eggs shell pasteurization in industrial scale.

Key-words: thermal treatment, aerobic mesophilic bacteria, hygienic sanitary processing

1 INTRODUÇÃO

As salmonelas são habitantes comuns nos intestinos das aves e muito se pesquisa sobre uma forma de se eliminar esta bactéria dos plantéis de aves, tanto as de corte como as poedeiras. Até o momento este objetivo não foi alcançado de forma economicamente viável.

Apesar do risco da presença de *Salmonella* spp. contaminando o conteúdo do ovo ser pequeno, existe uma possibilidade significativa desta alcançar o conteúdo deste a partir da quebra. Levando isso em consideração a legislação brasileira determina que os produtos de ovos sejam pasteurizados. Isso proporciona que seja rara a ocorrência de casos isolados ou surtos de DTA envolvendo produtos de ovos.

A maioria dos casos de DTA associados com o consumo de ovos envolve o consumo destes em natureza (em casca) ou em produtos em que participam como matéria prima/ingrediente, principalmente os caseiros. Normalmente estes produtos não sofrem nenhum tratamento visando à destruição de microrganismos patogênicos, entre os quais a *Salmonella* spp., e quando ocorre, o tratamento geralmente é insuficiente para se obter com segurança a destruição da *Salmonella* spp.

Hoje no mundo globalizado, uma das tendências é conscientização dos consumidores quanto à noção de qualidade dos alimentos. Com base nessa conscientização se desenvolveu o conceito de alimento orgânico. Sob essa ótica não seria uma surpresa as indústrias de alimentos que utilizam, de alguma forma, produtos de ovos líquidos e ou desidratados como um dos ingredientes dos seus produtos se voltarem para a utilização de ovos em casca devido à cobrança, por parte dos consumidores, por um produto caracterizado como orgânico/natural.

Sendo assim o consumo de ovos em casca deve aumentar consideravelmente tanto na forma direta quanto como matéria prima/ingrediente de

outros produtos. Em ambos os casos, o ovo e os produtos nos quais participa como um dos ingredientes, podem ser consumidos sem nenhum tratamento efetivo na destruição das salmonelas porventura presentes.

São poucas as pesquisas que envolvem a pasteurização do ovo em casca. Sendo que no Brasil nenhuma referência foi encontrada. Isto indica que na rotina de produção de ovos em casca no Brasil, nada se faz ainda para tornar estes produtos seguros quanto à presença de *Salmonella* spp.

Em todos os sentidos isto representa prejuízos incalculáveis. Ocorre aumento considerável dos gastos em saúde tanto por parte dos consumidores quanto por parte do governo, no nosso já combalido sistema. O setor produtivo também aufere parte deste prejuízo, pois os trabalhadores doentes têm sua produtividade diminuída significativamente, prejudicando os lucros da empresa. Uma parte das pessoas acometidas pela DTA causada pela *Salmonella* spp. pode se tornar portadora assintomática desta bactéria, aumentando mais ainda as possibilidades de disseminação ao levar-se em conta que estas podem ser manipuladoras de alimentos em indústrias de alimentos ou estabelecimentos comerciais que manipulam alimentos.

Frente às considerações apresentadas, utilizando uma metodologia básica de pasteurização do ovo em casca previamente testada no que se refere à manutenção das características sensoriais e funcionais normais do ovo (POMBO, 2003), o objetivo geral do trabalho foi verificar se esta metodologia, quanto aos parâmetros de tempo e temperatura, é suficiente para a destruição da *Salmonella* Enteritidis, que é considerada a de maior ocorrência como contaminante do conteúdo de ovos e responsável por vários casos isolados ou surtos de DTA. Os objetivos específicos foram: 1-verificar a ocorrência de *Salmonella* spp na gema de 96 ovos, 2-verificar a eficiência do método de inoculação da gema quanto a capacidade de colocar células de *Salmonella* Enteritidis (ATCC 13076) no conteúdo das gemas de ovos em casca, sem provocar danos que interfiram no desenvolvimento do experimento, 3-verificar a quantidade de ufc por mL na cultura de *Salmonella* Enteritidis (ATCC 13076) com 48 horas de incubação (fase estacionária) a 35°C, 4-verificar se a cultura de *Salmonella* Enteritidis (ATCC 13076) com 48 horas de incubação (fase estacionária) a 35°C é sensível a temperatura de 57°C por 20 minutos na gema de ovo, 5-determinar o tempo necessário para elevar a temperatura da gema de ovos classificados pela granja como tipo extra branco classe A (BRASIL, 1990), através

da imersão destes em água com agitação, de $24,5^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ até 57°C para viabilizar a manutenção destas à temperatura de 57°C por 20 minutos, 6-verificar se a manutenção da gema de ovos em casca, imersos em água com agitação, a temperatura de 57°C por 20 minutos provoca a destruição de todas as células de *Salmonella* Enteritidis inoculadas nelas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Esta seção irá apresentar conhecimentos científicos e estudos de diferentes autores importantes na compreensão dos aspectos envolvidos nesta tese. Inicialmente pela composição e formação do ovo. A seguir o gênero *Salmonella*, no que se refere as suas características, divisão em sorovares, fagotipagem, diferenciação das espécies e subespécies e distribuição. Em um item próprio, a *Salmonella* Enteritidis quanto a sua presença em aves, em ovos e sua relação com a saúde das populações humanas. A pasteurização será abordada nos seus aspectos gerais e sua aplicação em ovos em casca.

2.1 OVO

Segundo a Portaria nº 01, de 21 de fevereiro de 1990 (BRASIL, 1990), referente às Normas Gerais de Inspeção de Ovos e Derivados, entende-se pela designação "ovo", como o ovo de galinha em casca, sendo os demais ovos acompanhados da indicação da espécie de que procedem.

Conforme Watkins (1994), os ovos eram uma importante fonte de alimento para o homem primitivo, quando a maioria dos alimentos era obtida por cata. E, desde a antiguidade, constitui um dos alimentos mais importantes para o homem (INSTITUTOHUEVO, 2002a). Como algumas aves foram domesticadas, os ovos tornaram-se uma fonte popular de alimento e, ainda hoje, são considerados como a maior fonte de nutrientes essenciais na dieta contemporânea e, além disso, são utilizados como componente de muitos outros alimentos consumidos pela população mundial (WATKINS,1994).

2.1.1 Composição

Os ovos contêm, em relação ao peso total, cerca de duas partes de clara para uma de gema e em torno de 65% de água, 12% de proteína e 11% de gordura, fornecendo 160 kcal por 100 g (POTTER; HOTCHKISS, 1995).

O ovo é considerado um dos alimentos mais completos da natureza, tanto devido a sua variedade em nutrientes como por seu elevado grau de utilização pelo organismo humano. É rico em proteínas de elevado valor biológico, conteúdo energético, vitaminas A e B, além das vitaminas D, E e K (sendo deficiente em vitamina C), minerais como o ferro, fósforo, cobre, potássio, sódio, magnésio, manganês, selênio, iodo e zinco (sendo deficiente em cálcio) (VIEIRA, 2001; *INSTITUTOHUEVO*, 2002b). Além disso, segundo Mendes (2002), é considerado o alimento de maior valor biológico, contendo todos os aminoácidos essenciais necessários à nutrição humana, além de servir como referência para medir o valor protéico de outros alimentos.

2.1.2 Ovulação

Em todas as aves domésticas apenas o ovário e o oviduto esquerdos são normalmente funcionais. A ave sexualmente madura apresenta nos ovários folículos hierarquicamente organizados onde apenas uma pequena fração desses se desenvolverá até a ovulação. O folículo se difere do oócito (folículo imaturo) pela sua grande proporção, ocasionada pela adição do material da gema quando atinge sua maturidade e é envolvido pela membrana vitelina. Cada um dos folículos que consegue chegar à ovulação tem diferença de cerca de um dia de crescimento de outro. Uma vez a gema formada dentro do folículo, ocorre a liberação, por ação do hormônio luteinizante, rompendo uma faixa avascularizada do folículo denominada “estigma”. Então, o óvulo se desprende do ovário ocorrendo, assim, a ovulação (BURKE, 1996).

2.1.3 Formação do ovo

Após a ovulação, o óvulo se dirige para o oviduto, denominação que é usada para descrever a genitália tubular completa da fêmea e que é dividido em cinco regiões. A primeira, o infundíbulo, onde a gema (ou oócito) é captada. Daí então seguirá para o magno, onde é adicionada a parte mais espessa da clara, composta,

principalmente, de albumina e outras proteínas e onde há a formação das chalazas (mucinas retorcidas que mantêm a gema no centro do ovo). Posteriormente, o ovo em formação é recebido na terceira região, o istmo, onde ocorrerá a formação das duas membranas testáceas (interna e externa), que são os componentes mais internos à casca. Estas membranas são intimamente ligadas a não ser no pólo mais rombo do ovo onde há a formação de uma câmara de ar entre estas. Finalmente, após a passagem pelo istmo, o ovo chega na quarta região, o útero ou glândula da casca, onde é adicionada a parte fluida da clara formada basicamente de água, sais minerais e vitaminas, os quais passam através das membranas por osmose. Ali também ocorre a diferenciação das quatro estratificações da clara: clara densa interna, clara fluida interna, clara densa externa e clara fluida externa. Ainda no útero se verifica a formação da casca, composta basicamente por carbonato de cálcio (98%) e por uma menor parte de matriz orgânica (2%). Por fim, há a deposição da cutícula, uma camada protéica e hidrossolúvel que envolve a casca e protege o ovo da entrada de determinadas bactérias, pois forma uma cobertura protetora (10 a 30µm de espessura) na superfície da casca cobrindo os poros e impedindo a invasão microbiana do conteúdo do ovo. O ovo passará para o meio externo através da vagina, a quinta e última região do oviduto (BURKE, 1996).

2.2 SALMONELAS

A seguir serão apresentados aspectos relacionados com o gênero *Salmonella* spp. e com o sorovar *Salmonella* Enteritidis.

2.2.1 Gênero *Salmonella* spp.

A seguir serão apresentados aspectos relacionados com o gênero *Salmonella* spp.

2.2.1.1 Características

Os membros do gênero *Salmonella* spp. são caracterizados pela morfologia de bastonete medindo 0,7 – 1,5 X 2 – 5 µm. Estes reagem negativamente ao teste de Gram. Usualmente apresentam motilidade através de flagelos peritríquios. São anaeróbios facultativos. Metabolicamente são quimiorganotróficos tanto pela via respiratória como pela fermentativa. Necessitam, como temperatura ótima para

multiplicação, de 37°C. A glicose e outros carboidratos são metabolizados com produção de ácido e usualmente gás. São oxidase negativos, catalase positivos, indol e Voges Proskauer negativos, vermelho de metila e citrato de Simmons positivos, lisina e ornitina descarboxilase positivos. Apresentam reação variável a dehidrolização da arginina. Produzem H₂S, não hidrolisam a uréia, se multiplicam em meio com KCN. Utilizam o malonato de forma variável. Reduzem nitratos. Os carboidratos usualmente fermentados incluem L-arabinose, maltose, D-manitol, D-mannose, L-rhamnose, D-sorbitol, trehalose e D-xylose (LE MINOR, 1984; HOLT et al., 1994; JAY, 1994b)

2.2.1.2 Divisão em sorovares

Os sorovares são representados por números e letras estabelecidas pelos diferentes antígenos O (somático), Vi(capsular) e H(flagelar) (HOLT et al., 1994). Estes antígenos são distintos por diferentes padrões de atividade bioquímica (TRABULSI, 1996).

2.2.1.3 Fagotipagem

A fagotipagem é feita para vigilância epidemiológica de certos sorovares, mais notadamente no caso dos sorovares Typhi e Enteritidis (HOLT et al., 1994).

Existem mais de 30 fagotipos de *Salmonella* Enteritidis. Geralmente é aceito que o PT4 é o mais importante (HUMPHREY, 1994).

2.2.1.4 Diferenciação das espécies e subespécies

O gênero *Salmonella* spp. consiste de duas espécies. A primeira é *Salmonella enterica* que é dividida em seis subespécies tais como a *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*. A segunda é a *bongori* (formalmente chamada de *Salmonella enterica* subespécie *bongori*), sendo que a *Salmonella* subespécie *enterica* apresenta 1435 sorovares dos 2435 conhecidos. Para os sorovares da subespécie *enterica*, que representa mais de 99,5% das cepas isoladas, são dados nomes. Estes nomes não são colocados em itálico e a primeira letra deve ser escrita em maiúscula. Ex.: *Salmonella enterica* sub espécie *enterica* sorovar Enteritidis ou apenas *Salmonella* Enteritidis (HOLT et al., 1994; POPOFF; LE MINOR, 1997).

2.2.1.5 Distribuição da *Salmonella* spp.

O principal *habitat* das espécies de *Salmonella* spp. é o trato intestinal de animais como aves, répteis, animais de granja, pessoas e, acidentalmente, insetos. Apesar do seu *habitat* principal ser o trato intestinal, algumas vezes podem ser encontradas em outras partes do organismo. No *habitat* intestinal, as células podem ser excretadas nas fezes e destas podem ser transmitidas através de insetos e outros seres vivos a um grande número de lugares. A partir do *habitat* intestinal podem ser encontradas também na água, em especial na água contaminada. Quando a água e os alimentos que foram contaminados por insetos ou por outras formas de contaminação são consumidos por pessoas e animais, estas bactérias são disseminadas novamente por meio de matéria fecal, completando-se desta forma a ciclo na natureza. A ampliação deste ciclo por meio de comércio internacional de produtos animais e rações, em grande parte é responsável pela distribuição universal das salmoneloses (doença causada pelas salmonelas) e seus problemas subseqüentes. A freqüente existência de espécies de *Salmonella* spp. em populações animais sensíveis, se deve em parte a contaminação dos animais isentos de *Salmonella* spp. por animais da mesma população que são portadores destes microrganismos ou estão infectados pelos mesmos. Um portador se define como um animal ou uma pessoa que elimina continuamente espécies de *Salmonella* spp., geralmente pelas fezes, sem apresentar nenhum sinal ou sintoma da enfermidade (LE MINOR, 1984; JAY, 1994b).

2.2.2 Sorovar *Salmonella* Enteritidis

A seguir serão apresentados aspectos relacionados com a *Salmonella* Enteritidis.

2.2.2.1 *Salmonella* Enteritidis nas aves

Galinhas são largamente conhecidas como sendo consideráveis reservatórios de *Salmonella* spp. para o homem devido a habilidade desta em proliferar no trato gastrointestinal de aves e subseqüentemente sobreviver em carcaças de frangos e miúdos processados comercialmente (TODD, 1980).

Segundo a *World Health Organization*¹ (1983), apud Tavechio et al. (2002), apesar das cepas de *Salmonella* spp. poderem ser isoladas de uma variedade de fontes e reservatórios animais, as galinhas são o mais importante reservatório, particularmente para a *Salmonella* Enteritidis.

Humphrey et al. (1989a) desenvolveram experimento com galinhas que naturalmente apresentavam *Salmonella* Enteritidis detectada ao nível da cloaca, enquanto que Gast e Beard (1990b) afirmam que a *Salmonella* Enteritidis pode ser isolada a partir de tecidos reprodutivos de galinhas artificialmente infectadas.

Conforme Hilton² (1990), apud Thiagarajan et al. (1996), vários fagotipos e cepas de *Salmonella* Enteritidis diferem em sua virulência para as galinhas.

De acordo com Madden (1990), tanto aves domésticas como pássaros selvagens, da mesma forma que outros animais, albergam a *Salmonella* Enteritidis, apesar das cepas albergadas poderem ou não ser do fagotipo que pode coexistir com frangos e serem passadas através de transmissão vertical. A identificação de fagotipos de *Salmonella* Enteritidis e a determinação das diferenças entre cepas ambientais e aquelas infecciosas, que são transmitidas verticalmente por aves, são áreas de interesse para pesquisa.

Gast e Beard (1990b) citam pesquisas que demonstram que o ovário de galinha pode ser infectado com *Salmonella* Enteritidis através da contaminação pelo ar, citam uma que sugere que uma via conjuntival de contaminação em uma situação de *Salmonella* spp. no ar, é prevalente, e citam outra que demonstrou que depósito de 100 células nos olhos de galinhas de postura produziram a infecção por *Salmonella* spp. em ovários e ovidutos.

Nagarajava et al.³ (1991), apud Holt et al. (1995), descrevem que a infecção natural de frangos por *Salmonella* Enteritidis ocorre por via oral, e esta eventualmente coloniza o trato intestinal, e o mecanismo de infecção intestinal por *Salmonella* spp. é complexo e vários fatores podem afetar o sucesso ou a falha na colonização inicial.

¹ WORD HEALTH ORGANIZATION. *Guidelines on prevention and control of Salmonellosis*. Word Health Organization. Geneva. 1983.

² HILTON, M.; THREIFALL, E.J.; ROWE, B. The invasive potential of *Salmonella* Enteritidis phage types for young chickens. *Letters Applied Microbiology*, v.10, p.237-239. 1990.

³ NAGARAJAVA, K.V.; POMEROY, B.S.; WILLIAMS, J.E. Paratyphoid infections. In: CALNEK, B.W.; BARNES, H.J.; BEARD, C.W.; REID, M.; YODER, H.W. *Diseases of Poultry*. 9 ed. Ames, Iowa: Iowa State University Press. 1991. p.99-130.

De acordo com Humphrey et al. (1991), a *Salmonella* Enteritidis PT4 pode ser diferenciada da maioria das outras *Salmonella* spp. associadas com galinhas por serem adaptadas ao hospedeiro, sendo assim esta bactéria pode ser transmitida verticalmente a partir dos pais contaminados, e assim serem isoladas a partir do tecido reprodutivo e do conteúdo de ovos intactos.

Cox et al. (1991) observam que granjas de criação e incubatórios de ovos para frangos estavam altamente contaminados com *Salmonella* spp.

Os fatores que contribuem para a instalação da *Salmonella* spp. incluem a idade, o estresse ambiental, a muda e o tempo de alojamento, entre outros (HOLT, 1992).

A patogenia da *Salmonella* Enteritidis em galinhas de postura é complexa (BARROW, 1993).

Thiagarajan et al. (1994) consideram que as observações de outros autores de que depois de inoculação experimental oral de galinhas em postura com *Salmonella* Enteritidis, o organismo foi isolado de tecidos do aparelho reprodutor em torno da gema e nos folículos pré-ovulares, indicam que a bactéria pode interagir com componentes celulares dos folículos pré-ovulares. Citam ainda que foi demonstrada a ligação de isolamentos de vários fagotipos de *Salmonella* Enteritidis em galinhas adultas saudáveis e infectadas *in vitro*, com as células granulosas de ovário de galinhas.

Lindell et al. (1994) consideram que o fenômeno da transmissão transovariana de *Salmonella* Enteritidis é um intrigante aspecto da patogênese deste microrganismo em galinhas. Observam que seguindo a inoculação oral, este microrganismo não causa infecções clínicas evidentes em galinhas adultas em postura que produzem ovos contaminados.

Holt et al. (1995) indicam que a infecção natural de frangos com *Salmonella* Enteritidis ocorre por via oral, e esta eventualmente coloniza o trato intestinal, enquanto que de acordo com Keller et al. (1995), a contaminação por *Salmonella* Enteritidis parece resultar na colonização de tecidos do aparelho reprodutor, especialmente o ovário e oviduto superior, em aves sistematicamente infectadas, e as cepas de *Salmonella* Enteritidis que comumente estão infectando plantéis de aves de postura geralmente não causam sinais clínicos nestas aves, e a deposição de *Salmonella* Enteritidis no interior de ovos é uma consequência da colonização dos tecidos reprodutivos em aves de postura infectadas sistemicamente.

Pintos para obtenção de frangos podem albergar *Salmonella* spp. antes de deixar o incubatório e antes de serem expostos a outras fontes conhecidas de *Salmonella* spp. no ambiente. Isso indica que pintos podem ser contaminados com *Salmonella* spp. antes da postura do ovo. Se ovos são contaminados com *Salmonella* spp., os pintos nascidos poderiam excretar milhões de células de *Salmonella* spp., assim prontamente infectando outros pintos (REIBER; CONNER, 1995).

Os resultados obtidos por Holt et al. (1995) indicam que a muda induzida apresenta um profundo efeito tanto na infecção intestinal como na extra intestinal por *Salmonella* Enteritidis. Os autores citam que estes efeitos ocorrem dentro de 24 horas após a infecção no intestino e dentro de 48 horas após a infecção no fígado e baço.

Reiber e Conner (1995) observam que a principal via de infecção antes da incubação é através da transmissão vertical de *Salmonella* spp. a partir dos pais. Citam que a maioria das pesquisas consideram a transmissão vertical de *Salmonella* spp. na indústria de frangos focada no papel da fêmea. Citam também pesquisas que mostram que a *Salmonella* spp. pode atingir o ovo desde o desenvolvimento até quando já está pronto. Concluem que, no entanto, o modo exato da infecção do ovário e ovos não é totalmente conhecido. Observam que poucos trabalhos tem focado no papel que o macho reprodutor pode ter na contaminação por *Salmonella* spp., particularmente ao nível de incubadoras de reprodutores, e informam que pesquisas mostram que quando o sêmen é inoculado com *Salmonella* spp., este pode servir como veículo para transmissão de *Salmonella* spp. para a galinha resultando em esporádica produção de ovos contaminados. Reiber et al. (1995b) citam que em investigações de campo, bactérias do gênero *Salmonella* spp. foram detectadas no sêmen de reprodutores, que a maioria das contaminações foi considerada como proveniente da cloaca quando o sêmen foi colhido através de ejaculação artificial e que a contaminação ascendente das partes baixas do oviduto, a partir de sêmen contaminado, pode ocorrer em condições naturais.

No Brasil, a *Salmonella* Enteritidis iniciou sua disseminação em 1993, sendo largamente isolado em aves. Depois disso tornou-se o sorotipo prevalente em salmoneloses humanas, particularmente em surtos de origem alimentar, mas também em surtos atribuídos a diferentes fontes não humanas (KAKU et al., 1995).

Mcgruder et al. (1995) informam que a Infecção por *Salmonella* Enteritidis fagotipo 4 em frangos é considerada pelo USDA como uma doença animal estrangeira nos EUA, e a importação de animais sabidamente infectados é proibida.

O aumento significativo da ocorrência de *Salmonella* Enteritidis no Estado de São Paulo parece estar associado ao intercâmbio comercial de matrizes de aves com países da Europa, o que pode ter facilitado a introdução e disseminação do fagotipo PT4, a partir de 1993 no Brasil (IRINO et al., 1996).

Protais et al. (1996) observam uma diminuição das taxas de postura e um aumento na percentagem de cascas frágeis ou mais finas em galinhas infectadas com *Salmonella* Enteritidis PT4, e uma associação entre a diminuição das taxas de postura e a severidade da contaminação.

Peresi et al. (1998) informam, com base em uma revisão bibliográfica, que cepas de *Salmonella* Enteritidis dos fagotipos 8 e 13a (PT8 e PT13a) são predominantes nos EUA, enquanto que, nos países da Europa, o fagotipo 4 (PT4) é o mais freqüente.

A *Salmonella* Enteritidis pode colonizar os ovários e o tecido periovariano de modernas matrizes produtoras de poedeiras, possibilitando assim um potencial para transmissão vertical de matrizes para poedeiras e daí para ovos vendidos para consumo humano (TAUXE⁴, 1999, apud MOLBAK; NEIMANN, 2002).

Rabsch et al. (2000) defendem a teoria de que dados epidemiológicos da Inglaterra, Wales e EUA indicam que a *Salmonella* Enteritidis ocupa o nicho ecológico deixado pela erradicação da *Salmonella* Gallinarum de galinhas conduzindo a um aumento epidêmico de infecções em humanos.

Fiorentin (2000) descreve que a *Salmonella* Pullorum e *Salmonella* Gallinarum tiveram sua erradicação iniciada ainda na década de 30, tanto nos EUA como na Europa. A premissa básica era muito simples, e é aquela adotada ainda hoje e que considera que *Salmonella* Pullorum e *Salmonella* Gallinarum somente infectam aves, e sua erradicação do plantel, seguida de um esquema de biosseguridade rigoroso, é uma quase garantia de se manter o plantel livre deste patógeno. Afinal, a fonte de infecção somente podem ser outras aves, e se as "outras aves" também estão livres do patógeno, estas não mais são fontes da infecção. Descreve também que na

⁴ TAUXE, R.V. *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium DT104: successful subtypes in the modern world. In: SCHIELD W.M.; CRAIG, W.A.; HUGHES, J.M. *Emerging Infections*. 3ed. Washington DC: ASM Press, 1999. p.37-52.

década de 70 já eram raros os casos de infecção por *Salmonella Pullorum* e *Salmonella Gallinarum* em aves de exploração comercial, e o que era uma premissa virou obrigatoriedade nos plantéis básicos, facilitado então pela popularização de um método simples, rápido e eficiente para a detecção da infecção, no caso o teste de soroglutinação rápida que proporciona que a infecção com qualquer dos dois biovares possa ser detectada em dois minutos de reação com sangue total e na própria granja, utilizando-se de um insumo francamente disponível, que são os antígenos inativados e corados para o diagnóstico sorológico de Pulrose e Tifo Aviário. Observa que a praticidade e a eficiência deste método tornaram "invendáveis" as linhagens contaminadas por *Salmonella Pullorum* e *Salmonella Gallinarum*, que conjuntamente com as infecções por Micoplasmas, compunham o maior contra-"marketing" da avicultura. Sendo assim a única atitude de sucesso era então a de oferecer linhagens de galinhas livres de *Salmonella Pullorum* e *Salmonella Gallinarum*, *Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma synoviae*, o que virou regulamentação em alguns países e uma espécie de "lei informal" que o cliente faz vigorar mesmo quando essa regulamentação é falha. Descreve que na década de 60, enquanto diminuía os surtos por *Salmonella Pullorum* e *Salmonella Gallinarum* em galinhas na decorrência de sua crescente erradicação, o número de casos por ano da infecção por *Salmonella Enteritidis* em humanos começava a crescer tanto na Europa como nos Estados Unidos. A *Salmonella Enteritidis* passou do sexto mais freqüente sorotipo de *Salmonella* spp. isolado em humanos, em 1963, para o terceiro nesta freqüência, em 1967. Na segunda metade da década de 80 a *Salmonella Enteritidis* aparece como uma preocupação máxima para a segurança alimentar, e nos anos 90 passa a ser o sorotipo mais freqüentemente isolado em infecções alimentares, sobretudo envolvendo ovos crus. Observam que em um gráfico simples mostrando o número de casos por ano, as linhas de freqüência da infecção por *Salmonella Pullorum* e *Salmonella Gallinarum* em aves e de *Salmonella Enteritidis* em humanos se inclinam em direções contrárias.

De acordo com Dibb-Fuller e Woodward (2000), pintos novos são considerados mais susceptíveis a colonização por *Salmonella Enteritidis*, e com o desenvolvimento (amadurecimento), geralmente tornam-se mais resistentes à infecção. As bactérias do gênero *Salmonella* spp. produzem uma variedade de supostos fatores de virulência tais como hemaglutininas, adesinas, invasinas, fimbrias e flagelos, mas o mecanismo pelos quais elas aderem e invadem o epitélio

do intestino de pintos permanece pouco entendido. Observam em seus experimentos que a adesão e a invasão das células epiteliais é multifatorial e envolve as fímbrias *SEF17* e *SEF21*, e motilidade mediada por flagelos, e estes flagelos, e não as fímbrias, estão envolvidos na aderência no intestino do pinto. Com base nestes experimentos sugerem que coletivamente, *SEF17*, *SEF21* e flagelos desempenham um papel menor nos estágios iniciais da colonização e invasão em pintos jovens, mas são desnecessários para a colonização em pássaros a partir de contaminação do ambiente imediato.

Dhillon et al. (2001) identificam o ceco como o órgão ideal para isolamento da *Salmonella* spp. durante a infecção aguda e crônica, comparada com outros órgãos, e concluíram que isso representa uma fonte potencial para contaminação ambiental.

Salmonella Enteritidis, particularmente a fagotipo 4, em comparação com outros fagotipos invasores, apresenta uma forte afinidade pelo trato reprodutivo de frangos e é o mais hábil em colonizar este por longos períodos (OKAMURA et al., 2001). A infecção ocasionalmente foi identificada em lotes de reprodutoras, mas infecções persistentes em lotes comerciais é o problema predominante (DAVIS; BRESLIN, 2001).

Seo et al. (2001) citam que modificações induzidas é um importante instrumento de manejo usado pela indústria de postura de ovos para aumentar os níveis de produção em aves mais velhas, aumento do tamanho dos ovos, diminuição de cascas rachadas e aumento da qualidade da casca. Muitos dos métodos de modificação em uso são modificações simples em dois aspectos básicos: retirada da alimentação seguida por uma alimentação com baixo nutrientes no período de entrada no galpão. Segundo alguns experimentos, a modificação induzida através do método de privação alimentar tradicional pode estressar as galinhas e causar subsequente imunodepressão. Como consequência, o efeito da modificação induzida sobre infecção por *Salmonella* Enteritidis em galinhas é substancial. Essas aves transmitem mais microrganismos, mais aves permanecem *Salmonella* Enteritidis positivas, e a inflamação intestinal, primariamente no colon e no cecum, é substancialmente maior. Concluem que a realização desta ferramenta econômica muito importante na indústria de postura de ovos exacerba a infecção por *Salmonella* Enteritidis em aves e induziu pesquisas sobre métodos para melhorar a situação, tanto através de métodos alternativos de indução de modificação como através de esquemas de intervenção durante a modificação.

Defra⁵ (2001), apud Davis e Breslin (2003b), considera que existem poucas evidências de que o estoque de aves poedeiras esteja significativamente infectada, sendo assim, a maioria das infecções em granjas comerciais são consideradas como sendo associadas com a contaminação persistente em granjas de postura, o que permite o estabelecimento de infecção nas aves novas que entram na granja. Uma vez infectada, uma pequena proporção de aves de postura, em uma granja, pode tornar-se disseminadora da contaminação por um longo tempo e elas podem ocasionalmente produzir ovos contaminados internamente (BERCHIERI et al.⁶, 2001, apud DAVIS; BRESLIN, 2003a).

A obtenção de aves completamente livres de *Salmonella* Enteritidis nas granjas é muito difícil por que esta bactéria permanece viável no ambiente, e granjas naturalmente infectadas não mostram anormalidades clínicas óbvias, não mostram aumento da mortalidade e nem uma diminuição na produção de ovos (GRIJSPEERDT; HERMAN, 2003).

2.2.2.2 *Salmonella* Enteritidis em ovos

Ovos frescos e alimentos contendo ovos frescos, além de aves e outras refeições são os alimentos de origem animal que mais comumente são implicados como fontes de infecções por *Salmonella* spp. (WORD HEALTH ORGANIZATION⁷, 1983, apud TAVECHIO et al., 2002).

Hopper e Mawer (1988) citam que níveis de contaminação natural em ovos positivos para *Salmonella* Enteritidis é menor que 100 ufc / 100 g de gema, enquanto Humphrey et al. (1989a) afirmam que usualmente os ovos positivos para *Salmonella* Enteritidis apresentam menos de dez ufc por ovo. Estes, estudando a localização de *Salmonella* Enteritidis em ovos intactos em granjas naturalmente contaminadas detectaram *Salmonella* Enteritidis tanto no albúmem quanto na gema, com maiores concentrações na gema.

Segundo Humphrey et al. (1989b), anteriormente a carne de frango era considerada como a principal fonte de *Salmonella* Enteritidis, contudo evidências foram surgindo de que os ovos estavam se tornando paulatinamente mais

⁵ DEFRA. Animal Health 2001, the report of the Chief Veterinary Officer. London. Defra Publications.

⁶ BERCHIERI, A.; WIGLEY, P.; PAGE, K.; MURPHY, C.K.; BARROW, P.A. Further studies on vertical transmission and persistence of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis phage type 4 in chickens. *Avian Pathology*, v.30, p.297-310. 2001.

⁷ WORD HEALTH ORGANIZATION. *Guidelines on Prevention and Control of Salmonellosis*. World Health Organization. Geneva. 1983.

importantes. Ovos em casca representam um importante e valioso item na nutrição humana e eram considerados como inerentemente seguros. Contudo, evidências surgidas tanto no Reino Unido como nos EUA, indicam que os ovos e as refeições das quais fazem parte, tornaram-se progressivamente importantes veículos de DTA causadas por *Salmonella* spp., em particular por *Salmonella* Enteritidis, em humanos. Cowden et al. (1989), com base em dois surtos estudados, concluem que o aumento da ocorrência de *Salmonella* Enteritidis PT4 no Reino Unido se deve, pelo menos em parte, a contaminação de ovos com este microrganismo.

Humphrey et al. (1989a) mencionam que o conteúdo de ovos limpos e intactos usualmente contém culturas puras de *Salmonella* Enteritidis e que o entendimento do mecanismo que conduz a colonização de ovos de aves por *Salmonella* Enteritidis é essencial para reduzir o risco para a saúde pública associado com o consumo de ovos infectados, mas, no entanto a patogênese da contaminação dos ovos está ainda com o entendimento incompleto. Explicam que uma das razões para isso são os baixos índices de isolamento de *Salmonella* Enteritidis a partir de ovos experimentalmente infectados em campo, o que torna difícil a elucidação do mecanismo de contaminação do ovo. Citam que a natureza invasiva da *Salmonella* Enteritidis PT4 pode conduzir a presença desta no conteúdo dos ovos, e que é importante estabelecer tanto a prevalência de ovos contaminados com *Salmonella* Enteritidis PT4, como estimar o número desses microrganismos presentes em ovos naturalmente contaminados. Observam que ovos em casca, cujas cascas estão sujas com fezes, ou que estão danificadas, são mais significativamente passíveis de apresentar coliformes, e mais importante ainda, que os ovos danificados estão mais frequentemente contaminados com *Salmonella* spp., enquanto que os ovos intactos contêm somente *Salmonella* Enteritidis. Descrevem uma experiência em que enumeram a quantidade de *Salmonella* spp. no conteúdo de ovos naturalmente contaminados, onde todos os ovos examinados apresentaram, usando a técnica do NMP, um número inferior a dez células por ovo, apesar de terem estado estocados em temperatura ambiente por sete dias.

Pesquisas desenvolvidas por agências governamentais nos EUA e Reino Unido indicam uma muito baixa frequência de ocorrência de ovos individuais contaminados em granjas sabidamente contaminadas (BRADSHAW et al., 1990).

Baker (1990) realizou inspeção microbiológica nos estabelecimentos produtores de ovos no estado de Nova Iorque, nos EUA, para determinar a

prevalência de *Salmonella* Enteritidis. Foram amostrados 46 estabelecimentos que representavam em torno de 80% dos ovos produzidos neste estado. Os resultados obtidos demonstram que a *Salmonella* Enteritidis não está presente nos ovos (interna ou externamente), na ração ou nas fezes das galinhas. Analisaram também amostras de ovários e intestinos. Em aproximadamente 3.600 ovários e 1200 peças de intestinos não se isolou *Salmonella* Enteritidis.

Humphrey et al. (1991), em um estudo, observam que 72% dos ovos positivos para *Salmonella* Enteritidis apresentaram menos que 20 células deste microrganismo e assim concluem que isso indica fortemente que o albúmem, principalmente próximo à membrana vitelina, é o local principal de contaminação (a *Salmonella* Enteritidis foi isolada deste material em 12 dos 15 ovos onde a gema e o albúmem foram semeados separadamente), e que está de acordo com outros estudos com galinhas de postura artificialmente infectadas com *Salmonella* Enteritidis onde, apesar da *Salmonella* Enteritidis ser isolada com uma alta frequência no albúmem, todas as conteúdos de gemas foram *Salmonella* Enteritidis negativos. Indicam que se deve considerar que o isolamento de *Salmonella* Enteritidis a partir de tecidos de ovários indica que a contaminação da gema, embora sob uma baixa frequência, é uma possibilidade e isso pode permitir que ovos carreguem uma população elevada deste microrganismo.

Clay e Board (1991) inocularam células de *Salmonella* Enteritidis sobre a membrana da casca mais interna, na altura da câmara de ar, e demonstram que uma significativa multiplicação não ocorre até a gema ter contato com as membranas na câmara de ar e que a adição de ferro anula o efeito inibitório do albúmem.

Gast e Beard (1992) citam que em quatro de 132 ovos frescos postos por galinhas experimentalmente infectadas com *Salmonella* Enteritidis, o nível médio de contaminação foi de 5,5 ufc / mL.

A prevalência de *Salmonella* Enteritidis em ovos comercializados a varejo parece ser bastante baixa (GAST; BEARD, 1992). Segundo Saeed e Koons (1993), isso é observado com base na análise do número de ovos consumidos nacionalmente e pelo número de casos de infecções por *Salmonella* Enteritidis relacionadas a ovos que são mensalmente reportados ao CDC e a “Força Tarefa” para *Salmonella* Enteritidis criada pelo USDA, e pelo fato de que somente 10% - 30% das galinhas que foram experimentalmente infectadas com cepa virulenta de

Salmonella Enteritidis colocaram, intermitentemente, ovos contaminados com *Salmonella* Enteritidis por uma a três semanas após a infecção. Além disso, em granjas que operam com mais de 50.000 galinhas, infecção natural simultânea de um grande número de galinhas com *Salmonella* Enteritidis é improvável. Então, um número relativamente baixo de ovos contaminados com *Salmonella* Enteritidis são esperados, em granjas naturalmente contaminadas, a qualquer momento. É concebível que o número de células de *Salmonella* Enteritidis em ovos naturalmente contaminados deve sofrer um crescimento significativo para causar os surtos e casos esporádicos de infecções oriundas do consumo de ovos que foram reportados anualmente nos últimos anos da década de 90.

Humphrey e Whitehead (1993) afirmam que a *Salmonella* Enteritidis é capaz de se multiplicar, no entanto, em uma proporção de ovos contaminados, isso é fortemente influenciado pela idade do ovo. Descrevem um estudo onde foram usados ovos intactos naturalmente contaminados, com casca livre de contaminação fecal, todos os conteúdos positivos examinados num período de três semanas após a postura continham menos que 20 células de *Salmonella* Enteritidis enquanto que seis de 13 ovos examinados após estarem estocados a 20°C por três semanas apresentaram mais que 100 células, sendo que três estavam intensamente contaminados. Citam uma recente inspeção realizada pelo PHLS, na Inglaterra, em ovos comercializados em estabelecimentos varejistas que após estarem estocados a 20°C por cinco semanas, foram analisados e também detectados ovos pesadamente contaminados.

Hammack et al. (1993) inocularam *Salmonella* Enteritidis no albúmem próximo as membranas da casca de ovos intactos. Em dois dias de estocagem a 26°C, a maioria dos ovos estava altamente contaminada (> 7 log por mL do conteúdo dos ovos). Os mesmos pesquisadores concluem que isso se deve a invasão do conteúdo da gema. Humphrey (1994) observam que a velocidade com a qual a *Salmonella* Enteritidis cresceu no conteúdo dos ovos nesta pesquisa está em desacordo com a citada por Humphrey e Whitehead (1993), e que isso pode ser devido a diferenças nas técnicas experimentais, mas pode também refletir o fato de terem usado um inoculo concentrado (4,5 log por ovo) em ovos com idades não citadas.

Humphrey (1994) afirma que o risco potencial dos ovos contaminados está ligado, em parte, ao número de células de *Salmonella* spp. presentes. Por esta razão, muitos trabalhos foram desenvolvidos na análise dos parâmetros que

interferem na multiplicação de *Salmonella* Enteritidis no conteúdo dos ovos. A relativa baixa contaminação do conteúdo de ovos, mesmo naqueles oriundos de granjas sabidamente infectadas, significa que a grande maioria dos estudos sobre a multiplicação de *Salmonella* Enteritidis foram desenvolvidos usando métodos artificiais de contaminação. Tais investigações obtiveram dados importantes, mas deve ser considerado que os resultados podem nem sempre refletir as características de multiplicação no conteúdo de ovos naturalmente contaminados, e os dados devem ser interpretados com cuidado. Analisa que existe a possibilidade de que a inoculação, mesmo de uma pequena quantidade de material no conteúdo do ovo, traga algumas alterações que poderiam facilitar a multiplicação de *Salmonella* spp. Cita o trabalho realizado junto com outros colaboradores, onde se tentou superar esse problema proporcionando o monitoramento de alterações em ovos não alterados, e conclui que a idade do ovo representa um marcante fator na habilidade da *Salmonella* Enteritidis em crescer rapidamente no albúmem adjacente a gema. Descreve que dados obtidos neste trabalho, a partir do estudo de ovos de diferentes idades, proporcionam a construção de uma curva de crescimento simulada com três fases distintas. Durante as primeiras 24 horas após a postura, quando o pH do albúmem se apresenta variando de 7.0 a 9.0, ocorre um aumento em torno de dez vezes no número de *Salmonella* spp. Explica que isso é confirmado em experimentos em separado quando o número de bactérias foi estimado somente um dia após a inoculação, e como o albúmem é um ambiente com restrição de ferro, considerou que esse crescimento inicial pode envolver a bactéria usando suas reservas de ferro que parece ser suficiente para suportar quatro gerações. Quando a reserva de ferro é exaurida as células entram em lagfase, onde, na grande maioria dos ovos, existe pequena ou nenhuma alteração no número de *Salmonella* spp. Observa que a duração dessa fase é fortemente dependente da temperatura, sendo que a 20°C dura de três a quatro semanas, após as quais, o crescimento exponencial então ocorre em uma proporção crescente de ovos inoculados. Cita como exemplo, ovos estocados a 20°C por sete dias, onde somente uma pequena percentagem permitiu a cultura de *Salmonella* Enteritidis aumentar a níveis superiores a 3.0 log, enquanto que, em ovos estocados por seis semanas a 20°C, um rápido crescimento, onde a cultura aumentou na proporção de 1000 vezes ou mais, foi possível em quase 90% das amostras. Indica que a possível explicação para este fenômeno poderiam ser os seguintes: O conteúdo da gema é rico em ferro,

mas as células de *Salmonella* Enteritidis não podem fazer uso deste estoque devido a proteção proporcionada pela membrana vitelina no ovo fresco, que não permite a penetração bacteriana e nem a saída de ferro para o albúmem; Durante a estocagem, a membrana vitelina diminui sua resistência e em alguns pontos tornando-se suficientemente permeável para permitir que a *Salmonella* spp. penetre no conteúdo da gema; Uma vez que o rápido crescimento se instala é possível se encontrar uma população substancial de *Salmonella* spp. tanto na gema como no albúmem. Conclui que os dados obtidos relacionados a influência do albúmem sobre a multiplicação da *Salmonella* Enteritidis, sugerem que o albúmem não se torna mensuravelmente menos inibidor para *Salmonella* spp. e que não existe vazamento significativo de ferro para o albúmem. Indica que o período de tempo antes dos ovos serem capazes de suportar a rápida multiplicação de *Salmonella* spp. no albúmem em torno da gema é influenciado pela temperatura de estocagem e cita que quando ovos foram estocados sob condições onde as temperaturas flutuaram entre 18 e 30°C, para simular aquela que pode ser encontrada em cozinhas, um rápido crescimento foi possível, na maioria dos ovos examinados, após seis a dez dias. Considera que o isolamento de *Salmonella* Enteritidis de ovários leva a convicção de que a *Salmonella* spp. pode estar presente no conteúdo da gema. Investigações com ovos onde *Salmonella* Enteritidis foi inoculada diretamente no conteúdo da gema observaram que a bactéria, a partir de uma quantidade inoculada muito pequena, poderia crescer em ovos de qualquer idade, independente se eles vem de galinhas infectadas ou livres de infecção. Estes dados sugerem que se o conteúdo da gema fosse um lugar freqüente de contaminação a maioria dos ovos apresentariam um alto nível de contaminação com *Salmonella* Enteritidis mesmo em ovos frescos. Isso não acontece. Investigações post mortem em aves infectadas mostraram que a *Salmonella* Enteritidis pode ser isolada de óvulo. Isso, apesar de ser freqüente, é improvável de resultar na formação de um ovo completo. Tal óvulo pode ser abortado pela galinha. Afirma que não existe dúvida de que a *Salmonella* Enteritidis pode ser isolada do conteúdo de ovos intactos e limpos. A bactéria esta presente como resultado da infecção do tecido reprodutivo. Isso indicaria que algumas partes do aparelho reprodutivo das galinhas, principalmente a parte superior do oviduto, leva a produção ocasional de ovos com poucas células de *Salmonella* Enteritidis. O subsequente crescimento dessas bactérias é influenciado pela temperatura e tempo de estocagem. As diferentes pesquisas experimentais

desenvolvidas atualmente apresentam resultados divergentes, mas existe também muitos que são convergentes. Em particular, no que se refere aos altos níveis de contaminação (superior a 6.0 log por ovo) só será alcançado, na maioria dos ovos contaminados, quando o conteúdo da gema é invadido. Assim a *Salmonella* Enteritidis se comportará, na essencialidade, da mesma forma que um microrganismo deteriorador, mas com uma importante diferença, pois freqüentemente é difícil detectar a presença de *Salmonella* Enteritidis em ovos contaminados antes que a população exceda 9.0 log por ovo e não existem alterações tanto na aparência como no odor. Acima deste nível haverá um aumento da turbidez no albúmem e eventualmente a membrana da gema estará danificada .

Conforme Reiber et al. (1995a), baseado no fato da presença de *Salmonella* spp. nas fezes e a resultante produção de ovos contaminados, é provável que a presença de *Salmonella* spp. nas fezes possibilite a contaminação da superfície dos ovos quando eles passam da vagina para a cloaca.

Reiber et al. (1995b) observam não haver nenhuma relação aparente entre a presença de *Salmonella* spp. nas fezes e a infecção do oviduto ou produção de ovos positivos para *Salmonella* Enteritidis, e citam que outros autores também não observam relação aparente entre a presença de *Salmonella* spp. nas fezes e a presença de *Salmonella* Enteritidis nos ovos.

De acordo com Keller et al. (1995), a deposição de *Salmonella* Enteritidis no interior de ovos, é uma consequência da colonização dos tecidos reprodutivos em aves de postura infectadas sistemicamente.

Bichler et al. (1996), analisando os resultados obtidos em um experimento com galinhas da raça White Leghorn inoculadas com *Salmonella* Enteritidis, concluem que estes indicam que estas galinhas infectadas produzem ovos *Salmonella* Enteritidis positivos com alta freqüência inicialmente, o que diminui com o tempo, quando os anticorpos contra *Salmonella* Enteritidis começam a diminuir, e a freqüência de ovos *Salmonella* Enteritidis positivos aumenta.

A incidência de contaminação por *Salmonella* Enteritidis em ovos de granjas de postura nos EUA parece ser muito baixa. A inspeção tem reportado uma freqüência de ovos contaminados inferior a 0,03% em granjas naturalmente contaminadas (KINDE et al., 1996).

Desmidt et al. (1996) citam que anticorpos contra antígenos da camada LPS e flagelos estão comumente presentes na gema de ovos de galinha derivadas de granjas infectadas.

Yokoyama et al.⁸ (1998), apud Dera-Tomaszewska et al. (2003), obtiveram evidências do papel da camada LPS e flagelina como determinantes da virulência da *Salmonella* spp. e indicam que a ação inibitória de anticorpos direcionados contra estes antígenos poderia reduzir a patogenicidade bacteriana provavelmente pela inibição da invasão e colonização bacteriana.

De acordo com Mead et al.⁹ (1999), apud Lu et al. (2003), a *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis é a único entre os sorovares de *Salmonella* spp. freqüentemente presente como contaminante no conteúdo de ovos. Outros sorovares de *Salmonella* spp., incluindo a *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium, podem infectar galinhas, mas estes sorovares não persistem no interior do ovo e os ovos não são comumente implicados como veículos em infecções humanas causadas por esses sorovares inclusive o sorovar Typhimurium.

Chang (2000) não detectou *Salmonella* spp. interna e externamente em ovos com casca.

Gast e Holt (2000) confirmam as observações de outros autores de que em ovos artificialmente contaminados, a quantidade inicial de células aumenta aproximadamente dez vezes durante as primeiras 24 horas após a inoculação, e concluem que isso sugere que ovos naturalmente contaminados podem receber aproximadamente duas células quando nos tecidos do aparelho reprodutor da galinha.

Cogan et al. (2001) analisam que, em geral, e particularmente durante investigações de surtos, os ovos não são examinados imediatamente após a postura. Levando esta assertiva em consideração, Gast e Holt (2000) desenvolveram um experimento onde a quantidade de células inoculadas foi muito pequena, em nível de duas células, como sendo representativo do número de células em um ovo no momento da postura. Concluem que os dados obtidos neste

⁸ YOKOYAMA, H.; UMEDA, K.; PERALT, R.C.; HASHI, T.; ICALTO, F.C.; KUROKI, M.; IKEMORI, Y.; KODAMA, Y. Oral passive immunization against experimental salmonellosis in mice using chicken egg yolk antibodies specific for *Salmonella* Enteritidis and Typhimurium. *Vaccine*, v.16, n.4. p.388-393. 1998.

⁹ MEAD, P.S.; SLUTSKER, L.; DIETZ, V.; MCCAIG, F.; BRESEE, S.; SHAPIRO, C.; GRIFFIN, P.M.; TAUXE, R.V. Food-related illness and death in the United States. *Emerging Infectious Diseases*, v.5, p.607-625. 1999.

experimento mostram, inequivocamente, que aumentos relativamente pequenos no número de células inoculadas, de duas para 25 células por ovo, tem um profundo efeito sobre a habilidade da *Salmonella* Enteritidis crescer rapidamente no conteúdo de ovos, e permitem concluir que um grande número de células de *Salmonella* spp. inoculadas artificialmente nos ovos, ou a adição de diluentes que favorecem a multiplicação celular, substancialmente alteram os padrões de multiplicação da bactéria no interior do ovo. Concluem também que o baixo nível de crescimento observado neste experimento, usando-se pequena quantidade de células (inoculação) com um diluente pobre em nutrientes e ferro, é comparável com aquele em ovos naturalmente contaminados.

Cogan et al., (2001) descrevem que a possibilidade de aumentar o número de células de *Salmonella* spp. presentes no interior do ovo está diretamente relacionado com o aumento do potencial de risco de infecção. Enquanto existe uma concordância de que a *Salmonella* Enteritidis pode crescer em ovos, existe uma incerteza sobre a velocidade com que isto acontece. Dados obtidos por pesquisadores analisando ovos produzidos por galinhas infectadas, tanto naturalmente quanto artificialmente, sugerem que existe uma demora antes da invasão da gema e um rápido crescimento da *Salmonella* spp. em ovos mantidos a 20 – 25°C. Isso ocorre devido a membrana vitelina em ovos frescos inibir a invasão da gema pela *Salmonella* spp. O perfil de crescimento da *Salmonella* spp. observado em ovos contaminados naturalmente estão em desacordo com estudos feitos com ovos artificialmente contaminados, que sugerem que o crescimento é rápido na maioria dos ovos e que a invasão da gema é comum. Dados sobre o nível de *Salmonella* spp. em ovos naturalmente contaminados, os quais, em geral, contém uma pequena quantidade de células, sugerem que o conteúdo da gema não é freqüentemente contaminado no ovo fresco. Citam autores que explicam que a variação do número de células bacterianas encontradas nos ovos mostrando crescimento generalizado, pode ser atribuído a diferenças nos conteúdos de ferro e glicose na gema.

Gast e Holt (2001) afirmam que sempre depois de uma administração experimental de uma grande dose oral de *Salmonella* Enteritidis, relativamente poucos ovos contaminados são tipicamente detectados. Consideram que comparado com outras fontes de *Salmonella* spp., poucos ovos contaminados são produzidos em granjas infectadas, mas levando em consideração o grande volume de ovos que

são consumidos e a virulência da *Salmonella* Enteritidis, estes podem resultar em um significativo número de infecções humanas .

Radkowski (2001), investigando 1200 ovos produzidos na Polônia, não detectou *Salmonella* spp. na superfície da casca ou no conteúdo destes ovos.

Lu et al. (2003) identificam o YafD como um gene essencial para a resistência de *Salmonella* enterica sorovar Enteritidis no albúmem de ovos. Levantam evidências de que YafD pode desempenhar um papel no reparo do dano ao DNA causado pelo albúmem de ovos e por isso pode facilitar a sobrevivência de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis em ovos de galinha. Observam que existem indicações de que o dano ao DNA bacteriano é um dos mecanismos que o albúmem usa para controlar a multiplicação bacteriana, e que as enzimas reparadoras do DNA estão envolvidas no reparo de lesões geradas pelo albúmem. Citam que uma possível explicação para o efeito das nucleases do albúmem sobre o DNA bacteriano é que estas conseguem passar para interior das células através dos poros na parede celular formados pela lisozima e ovotransferrina com conseqüente dano ao DNA cromossomial. Citam que o gene YafD é encontrado em muitas espécies de bactérias, incluindo *Escherichia coli* e outros sorovares de *Salmonella* spp., tais como a *enterica* sorovares Typhi, Typhimurium. Contudo a *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis é um sorovar patogênico ao homem que é unicamente associado com o albúmem do ovo. Na *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium e na *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis, o gene YafD é semelhante exceto nos nucleotídeos que codificam o aminoácido 33, que é uma serina na *Salmonella enterica* Enteritidis e uma asparagina na *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium. Não foi determinado se esta diferença e a possível regulação do YafD nestes sorovares contribuem para o aumento da resistência da *Salmonella* Enteritidis no albúmem do ovo. É altamente provável que a resistência da *Salmonella* Enteritidis no albúmem do ovo seja mediada por vários fatores juntamente com YafD. Demonstram que a YafD é essencial para a sobrevivência da *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis no albúmem. Consideram a YafD como um novo determinante genético da *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis sendo essencial a sobrevivência e disseminação desta bactéria no albúmem em associação epidemiológica com produtos de ovos.

Fleischman (2003) desenvolveram um experimento com o objetivo de determinar se a *Salmonella* Enteritidis migra para o interior da gema em ovos

relativamente frescos, levando em consideração que não se sabe se a membrana vitelínica é susceptível a penetração da *Salmonella* Enteritidis logo após a postura quando a pasteurização poderia ser aplicada.

Segundo Buck et al. (2003), os ovos de consumo em natureza parecem ser o único nicho para *Salmonella* Enteritidis, apesar de ocasionalmente, outros sorotipos de *Salmonella* serem encontrados em ovos.

2.2.2.2.1 Vias de acesso da *Salmonella* Enteritidis em ovos

Ovos em casca podem ser tornar contaminados com *Salmonella* Enteritidis por duas rotas possíveis: via contaminação e passagem através da casca ou por via transovariana (BOARD, 1966).

Bradshaw et al. (1990) descrevem que existem algumas vias em que os ovos em casca podem tornar-se contaminados, externamente ou internamente. Citam que investigações epidemiológicas de surtos de doença de origem alimentar causados por *Salmonella* Enteritidis associadas com ovos nos EUA, sugerem que a contaminação externa dos ovos através de fezes de aves que contém este microrganismo é uma fonte improvável, já que a maioria dos ovos produzidos comercialmente são coletados em sistemas de esteiras que minimizam a contaminação, e estes surtos de doença transmitida por alimentos foram associados com ovos classe A sanitizados, que atendem os padrões estaduais e federais de qualidade de casca nos EUA. Concluem que a alternativa possível da via transovariana resultando em ovos contaminados é fortemente indicada pelo isolamento desses microrganismos em vários lotes de aves reprodutoras. Citam que segundo alguns autores, algumas bactérias do gênero *Salmonella* spp., entre elas a *Salmonella* Enteritidis, podem colonizar o ovário e o peritônio de aves naturalmente infectadas, e a infecção de aves de postura nem sempre causa diminuição significativa da fertilidade. Assim a infecção tanto no peritônio, como no ovário, deve permitir a contaminação da gema do ovo antes da formação da casca, desta forma facilitando a transmissão vertical da doença.

Gast e Beard (1990a), monitorando a frequência de isolamento de *Salmonella* Enteritidis a partir de alguns órgãos internos de galinhas de postura experimentalmente inoculadas em vários intervalos de tempo, concluem que o isolamento de *Salmonella* Enteritidis a partir de órgãos internos aparentemente pode ser usado com um indicador de que aves estão infectadas com uma cepa invasiva

que poderia ser capaz de causar a produção de ovos contaminados via contaminação transovariana.

Gast e Beard (1990b) citam que galinhas infectadas experimentalmente com grandes doses de uma cepa particular de *Salmonella* Enteritidis apresentaram uma diminuição na produção total de ovos, a postura de ovos com o conteúdo contaminado durante um período de tempo relativamente curto, e a elevação na produção de um anticorpo específico que foi detectável por métodos padrões de aglutinação sorológica.

Segundo Maden (1990), a passagem da galinha para o ovo (transmissão vertical), a qual é denominada de infecção transovariana, pode levar a produção de ovos embrionados de galinhas infectadas, contaminados, sendo incubados, produzindo pintos infectados. O consumo de ovos embrionados ou não embrionados, inadequadamente aquecidos, pode causar salmonelose em humanos. Frangos podem também se tornar infectados por transmissão horizontal, por exemplo, ave para ave, homem para ave, alimento para ave ou ambiente para ave.

Clay e Board (1991) citam pesquisadores que indicam que *Salmonella* Enteritidis pode contaminar ovos igualmente através de ovários de aves que se tornam contaminados de forma que a gema é contaminada antes da postura – transmissão transovariana, ou através de rápida infecção intestinal de aves de postura permitindo a contaminação da casca de ovos antes da postura, com a infecção microbiana se iniciando com a penetração através da cutícula e casca, seguida pela colonização das membranas da casca, depois a contaminação do albúmem permitindo, eventualmente, a generalização da infecção do conteúdo do ovo dependente de fatores tais como a carga bacteriana inicial, temperatura, características antimicrobinas do albúmem e as características microrganismo infectante.

Humphrey et al. (1991), citam que os resultados de experimentos com ovos naturalmente e artificialmente contaminados, desenvolvidos por outros pesquisadores, parecem demonstrar que durante a passagem do ovo através do oviduto, o albúmem é contaminado com poucas células de *Salmonella* Enteritidis, e que estas permanecem dormentes, mesmo em ovos estocados em temperatura ambiente por duas a três semanas, sendo que durante este tempo, o conteúdo do ovo sofre alterações físicas e químicas que provavelmente proporcionam que um ou outro nutriente, ou alguns fatores os quais anulam as propriedades inibitórias do

albúmem, saem a partir da gema, possivelmente devido a alterações na estrutura da membrana da gema e na área do albúmem em contato com a membrana da gema, até atingirem concentração suficientemente alta para permitir a multiplicação de *Salmonella* Enteritidis e suportar uma larga população deste microrganismo.

Nascimento et al. (1992), descrevem que para satisfazer a função de câmara embriogênica, função esta para o qual foi inicialmente concebido, o ovo tem uma série de mecanismos de defesa para reduzir a invasão de microrganismos e minimizar sua influência desde de que alcancem o conteúdo do ovo. Realizaram um estudo sobre a relação entre a estrutura da casca e o movimento da *Salmonella* Enteritidis através delas. Os resultados obtidos indicam que a penetração bacteriana não é dependente dos poros. Observam que ovos com casca de excelente qualidade são consideravelmente mais resistentes a penetração de várias bactérias do gênero *Salmonella* spp. do que aqueles ovos com casca de baixa qualidade, que os resultados sugerem que se a eficiência da cutícula como a primeira barreira é questionável, e se as membranas da casca são uma barreira temporária ao movimento bacteriano, a estrutura da casca assume um papel crítico como uma barreira física.

Saeed e Koons (1993) citam que alguns pesquisadores demonstraram que a contaminação do conteúdo do ovo improvavelmente resulta de contaminação fecal de ovos em casca. Explicam que esta conclusão é baseada, em parte, no fato de que em infecções por *Salmonella* Enteritidis de origem alimentar nos EUA terem sido incriminados ovos classe A, e no fato dos resultados de algumas infecções experimentais de galinhas de postura com cepas de *Salmonella* Enteritidis sugerirem que a contaminação do ovo é originária de uma transmissão transovariana de *Salmonella* Enteritidis para os folículos pré ovulatórios em formação. Afirmam que isso indica que ovos contaminados albergam *Salmonella* Enteritidis principalmente na gema.

Humphrey (1994) informa que a infecção de aves de postura com *Salmonella* Enteritidis e a resultante contaminação de ovos, particularmente o conteúdo dos ovos, é aceito como sendo importante no aumento marcante da ocorrência de salmoneloses humanas em um largo número de países desde meados dos anos 80. Informa também que a casca do ovo torna-se contaminada com *Salmonella* spp. tanto no oviduto como resultado de contaminação fecal. Com relação a *Salmonella* spp. outras que não a Enteritidis, a ultima via parece ser a mais importante, mas

existe relativamente poucos dados sobre a prevalência da contaminação da casca do ovo. Observa que em comum com outras bactérias do gênero *Salmonella* spp., existe a possibilidade de células de *Salmonella* Enteritidis presentes sobre a casca do ovo poderem contaminar o conteúdo pela migração através da casca e membranas associadas. No entanto, a presença de *Salmonella* Enteritidis no conteúdo do ovo parece estar mais relacionado com a transmissão a partir do tecido reprodutivo. De 8.698 ovos analisados, 56 apresentaram o conteúdo contaminado, sendo que em 55, a *Salmonella* Enteritidis estava presente em cultura pura. Isso é também fortemente sugestivo do envolvimento do tecido reprodutivo.

Keller et al. (1995) citam que as vias de invasão bacteriana do ovo foram definidas, e a transovariana foi proposta como a utilizada pela *Salmonella* Enteritidis, no entanto, continua a controvérsia sobre o local onde as células se alojam, sendo a gema, a membrana entorno da gema ou o albúmem, os locais considerados. Examinam o curso da invasão e colonização por *Salmonella* Enteritidis em ovos em formação e recentemente postos por aves infectadas, através da pesquisa destas nos seus órgãos, especialmente os tecidos relacionados com o oviduto. Neste estudo, observam que uma média de 29,25% de ovos em formação tirados do oviduto de aves infectadas foram positivos para *Salmonella* Enteritidis, comparado com uma taxa de 0 a 0,6% de colonização de ovos recentemente postos a partir das mesmas aves. Observam que uma proporção de 73% dos ovos em formação positivos para *Salmonella* Enteritidis estavam associados tanto com o tecido do ovário quanto com o de tecido oviduto superior infectados. Concluem que os resultados obtidos sugerem que a infecção do ovo em formação ocorre no oviduto superior, antes da ovoposição. Concluem também que a grande diminuição na incidência de ovos recém postos contaminados comparados, com ovos em formação, sugere firmemente que fatores tais como anticorpos, enzimas antibacterianas, restrição de ferro e proteínas inibidoras de protease bacterianas inerentes a gema e ao albúmem são capazes de controlar a infecção por *Salmonella* Enteritidis nos ovos em formação antes da casca estar completa e o ovo ser posto. Afirmam que uma vez que a casca e a cutícula estão no lugar, a probabilidade da contaminação bacteriana a partir de fontes internas e externas é grandemente diminuída, no entanto, quando o ovo a temperatura média de 41,9°C é posto em temperatura ambiente, o gradiente de pressão criado, como no caso do rápido resfriamento, pode ser suficiente para sugar bactérias para o interior do ovo. Por

essa razão, concluem que a possibilidade de contaminação de ovos recentemente postos, já que eles passam através da vagina ou cloaca altamente contaminadas não pode ser desprezada.

Holt et al. (1995) citam que alguns pesquisadores, com base em estudos, sugerem que a via de contaminação vertical seria a mais importante na contaminação por *Salmonella* Enteritidis, e a via horizontal seria importante na contaminação por bactérias do gênero *Salmonella* spp. outras que não *Salmonella* Enteritidis. No entanto, nenhuma evidência decisiva sobre a via de contaminação por *Salmonella* Enteritidis em ovos foi obtida.

Segundo Keller et al. (1995), o entendimento dos mecanismos que contribuem para a colonização dos ovos por *Salmonella* Enteritidis é essencial para a redução do risco para a saúde pública associado com o consumo de alimentos contendo ovos contaminados.

Dependendo da região onde o trato reprodutivo é infectado, *Salmonella* Enteritidis pode ser depositada tanto na gema quanto no albúmem de ovos em desenvolvimento (BICHLER et al., 1996).

A frequência de isolamento de *Salmonella* Enteritidis observada em ovos postos em granjas comerciais naturalmente contaminadas, foi menos que 0,03% na maioria das inspeções (KINDE et al., 1996).

Miyamoto et al., (1997) afirmam que nenhuma evidência decisiva sobre a via de contaminação por *Salmonella* Enteritidis foi estabelecida, e uma das razões para isso é a baixa taxa de isolamento desta em ovos tanto naturalmente como artificialmente contaminados, o que torna difícil esclarecer o mecanismo de contaminação do ovo com esta bactéria. Citam que muitas infecções experimentais foram pesquisadas. No entanto, a maioria dos estudos sobre infecção experimental foi conduzida, tanto por via oral, como pela via intracloacal ou intravenosa, e as taxas de contaminação dos ovos nestes experimentos foram consideravelmente baixas. Estudando a contaminação de ovos com *Salmonella* Enteritidis em galinhas inoculadas por via vaginal, cloacal e intravenosa, concluem que quando os ovos se desenvolvem em um oviduto *Salmonella* Enteritidis positivo com elevadas populações, estes são provavelmente contaminados com essa bactéria. Citam que a *Salmonella* Enteritidis foi detectada em níveis elevados em amostras de cloaca com contagens médias de 10^2 a 10^5 ufc / g em qualquer das formas de inoculação, no entanto na inoculação intracloacal, a *Salmonella* Enteritidis não foi detectada em

qualquer ovo(conteúdo), exceto em poucos ovos contaminados na casca. Explicam que devido a parte terminal da vagina ser projetada para fora da cloaca, os ovos raramente tocam a parede contaminada da cloaca na ovoposição. Sendo assim, fezes ou cloaca parecem ser fontes improváveis de contaminação da casca com *Salmonella* Enteritidis. Os autores detectaram altos níveis de contaminação por *Salmonella* Enteritidis na vagina de galinhas inoculadas intravaginalmente, as quais produziram ovos contaminados com frequência. Concluem que essa observação sugere que a *Salmonella* Enteritidis é transmitida a partir de vagina contaminada para a superfície da casca, e conseqüentemente passa através desta quando o ovo é posto, resfriado e o conteúdo retraído, e que os resultados indicam que a contaminação da parte baixa do oviduto pode ocorrer naturalmente. Concluem também que a face interna da casca do ovo é a porção de maior incidência na detecção de *Salmonella* Enteritidis e consideram que a contaminação da parte interna do ovo é importante no que se refere a ocorrência de casos de DTA, por que a *Salmonella* Enteritidis nesta localização não é destruída facilmente nos métodos ordinários de desinfecção.

Schuman et al. (1997) observam que, mesmo considerando que apesar de muitos sorovares diferentes de *Salmonella* spp. serem isolados da superfície da casca de ovos, somente *Salmonella* Enteritidis foi isolada do conteúdo de ovos intactos usando métodos de amostragem asséptica correntemente aceitos e que a via transovariana de transmissão de *Salmonella* Enteritidis é a mais plausível via de infecção do ovo em casca.

Wang e Slavik (1998) citam que, apesar de existir a possibilidade da transmissão transovariana de *Salmonella* Enteritidis, o que resulta na contaminação do conteúdo de ovos intactos, a contaminação horizontal de ovos parece ser a principal via. Descrevem que as defesas físicas naturais do ovo são a casca, a cutícula e membranas da casca (interna e externa). A cutícula age como uma cobertura que impede a penetração microbiana obliterando os poros presentes na casca e como conseqüência diminui a permeabilidade da casca. A casca é a linha seguinte de proteção do ovo. No entanto, contém milhares de poros que permitem a troca de gases respiratórios do desenvolvimento embrionário. Os microrganismos também podem penetrar no ovo através desses poros após a cutícula ter sido removida nos procedimentos de lavagem. As membranas internas e externas da casca localizadas na superfície interna da casca são uma importante linha de defesa

para o ovo. A mais externa é mais grossa, mas mais porosa que a interna. Conseqüentemente não provê tanta proteção quanto a membrana interna. A membrana interna é principalmente composta por proteínas na forma de fibras entrelaçadas e não apresenta poros. Além disso, a membrana interna é rica em lisozima que pode prevenir infecção bacteriana. Examinando o efeito de diferentes tempos e temperaturas de estocagem sobre a penetração microbiana em ovos lavados com soluções comerciais de lavagem tais como solução de quaternário de amônio, carbonato de cálcio e hipoclorito de sódio, observam que diferentes graus de dano a cutícula podem ser provocados sobre a superfície da casca de ovos por diferentes tipos de soluções usadas na lavagem de ovos, e a superfície da casca do ovo alterada pode permitir uma grande penetração microbiana. Afirmam que uma solução de lavagem de ovos considerada ótima deve remover seletivamente ou inativar microrganismos na casca do ovo sem danificar a cutícula. Citam que a solução de quaternário de amônio e a solução de hipoclorito de sódio, ambas muito efetivamente, controlam a contaminação e a penetração de *Salmonella* spp., mas a solução de quaternário de amônio deixa resíduos na superfície dos ovos tratados, resíduos estes que devem ser considerados quando da determinação da solução ótima para a lavagem de ovos. Citam um experimento prévio onde se usou diferentes soluções de lavagem e observou-se significativas diferenças na microestrutura de casca de ovos lavados com diferentes agentes químicos. Observam que a solução de quaternário de amônio não produziu danos na camada de cutícula, mas deixou resíduos de fezes e agentes químicos na superfície da casca, enquanto que as soluções alcalinas, carbonato de sódio e hidróxido de sódio produziram ovos visualmente limpos, mas foram agressivas o bastante para remover parcial ou mesmo totalmente a camada de cutícula. Quanto ao hipoclorito de sódio, observam que este não causa maiores danos, mas a superfície das cascas dos ovos testados ficaram ligeiramente ásperas. Concluem que ovos lavados com soluções alcalinas foram 30 a 70 vezes mais porosos que ovos lavados com outras soluções.

Miyamoto et al. (1998) mencionam que muitos estudos citam que as bactérias do gênero *Salmonella* spp. são capazes de penetrar na casca e se multiplicar no conteúdo dos ovos. Estudando a penetração de *Salmonella* spp. através da casca do ovo associado a frescura do ovo e sua refrigeração verificam taxas de detecção de *Salmonella* spp. tanto na face interna da casca quanto no conteúdo de ovos, no período até três horas após a postura, significativamente maiores que aquelas de

ovos após um período de três horas da postura, especialmente em doses de exposição elevadas. Observam que a penetração bacteriana através da casca ocorreu mais rapidamente em ovos recém postos e que a penetração de *Salmonella* spp. através da casca nas três horas após a postura foi significativamente diminuída pelo resfriamento do ovo antes da inoculação da *Salmonella* Enteritidis. Analisam, com base nos resultados obtidos, que o resfriamento do ovo rapidamente após a postura conseqüentemente parece inibir a penetração da *Salmonella* spp.

Cox et al. (2000) afirmam que o modo provável de contaminação natural de ovos fecundados é o resfriamento destes, ainda frescos e úmidos, postos a partir da temperatura do corpo da ave para a temperatura externa da ave na presença de contaminação na superfície da casca. Ovos em casca contaminados foram considerados por muito tempo como responsáveis pela disseminação de *Salmonella* spp. em incubatórios.

Gast e Holt (2000) reportam baixa freqüência de contaminação em estudos de infecção experimental, até mesmo depois de largas doses de *Salmonella* Enteritidis.

Okamura et al. (2001) consideram que um foco sobre os mecanismos de colonização do ovo em formação deveria ser o caminho mais direto para o controle das enfermidades transmitidas pelos alimentos relacionados com *Salmonella* Enteritidis. Demonstram que a penetração da *Salmonella* spp. através da casca do ovo realmente ocorre, possivelmente devido a sucção das células para o interior do ovo fresco, sob pressão negativa devido ao resfriamento. Consideram que estas observações sugerem que a *Salmonella* Enteritidis é transmitida a partir da vagina contaminada para a superfície do ovo, e esta, conseqüentemente, passa através da casca quando o ovo é posto e resfriado. Observam que os níveis de contaminação, via inoculação na vagina, foram significativamente maiores que em outras vias de inoculação. Concluem, levando em consideração o fato do elevado isolamento de *Salmonella* Enteritidis na vagina e na cloaca, que conseqüentemente ocorre uma contaminação significativamente elevada dos ovos com *Salmonella* Enteritidis. Descrevem que na ovoposição, os ovos raramente tocam a parede contaminada da cloaca por que a parte terminal da vagina se projeta para fora da dela. Conseqüentemente, as fezes ou a cloaca parecem ser uma fonte de contaminação do ovo com *Salmonella* Enteritidis de pouca importância, entretanto esta foi altamente isolada a partir da cloaca. Antes de a *Salmonella* Enteritidis ascender a vagina a partir da cloaca, esta bactéria necessita colonizar e proliferar na cloaca. A

elevada afinidade da *Salmonella* Enteritidis pela cloaca deve contribuir para a infecção ascendente até a vagina, a partir dela. Observam que a *Salmonella* Enteritidis raramente foi isolada no ovário, oviduto superior e outros órgãos internos das aves inoculadas. Além disso, nenhum ovo em formação no oviduto foi positivo para *Salmonella* Enteritidis. Observam também que 25% dos ovos foram positivos para *Salmonella* Enteritidis na parte interna da casca, que foi considerada ser a porção mais comum onde *Salmonella* Enteritidis estava presente. Consideram que isso deve ser atribuído ao fato das membranas da casca proverem uma barreira mecânica contra a invasão microbiana. Consideram também que a contaminação da parte interna da casca é tão importante para enfermidades transmitidas por alimentos quanto a contaminação dos conteúdos dos ovos, por que *Salmonella* Enteritidis, nesta localização, não é destruída facilmente através dos métodos tradicionais de desinfecção, e este microrganismo em adição a isso pode invadir o conteúdo dos ovos. Consideram que o estudo desenvolvido por eles demonstra que a *Salmonella* Enteritidis apresenta uma vantagem específica sobre outros sorovares na capacidade de colonizar os tecidos da vagina de aves, e esta alta afinidade da *Salmonella* Enteritidis pela vagina pode representar um significativo papel na produção de ovos contaminados por esta bactéria.

Grijpspeerdt (2001) cita que um modelo de simulação mostra que a penetração bacteriana em ovos pode conduzir a uma concentração muito alta na gema, até mesmo antes do albúmem estar saturado, e que a concentração microbiana na face externa da casca influencia significativamente nos resultados das simulações. Analisa que considerando o crescimento sobre a casca do ovo, o impacto da concentração inicial na casca é consideravelmente menos significativo. Conclui que os resultados obtidos no modelo de simulação indicam que poderia ser benéfico a manutenção da casca do ovo mais limpa possível.

Gast et al. (2002) consideram que em particular, a disponibilidade de um número substancial de ovos contaminados postos por aves infectadas é essencial para determinar a frequência na qual a *Salmonella* Enteritidis é depositada em locais diferentes no interior do ovo, e que devido aos modelos de infecção experimental por via oral geralmente produzir uma baixa frequência de ovos contaminados, rotas alternativas de administração de *Salmonella* Enteritidis foram pesquisadas. Concluem que, no entanto, de acordo com pesquisadores, a inoculação oral é considerada a que mais se aproxima da contaminação natural, e que tanto a via

intravenosa quanto a inoculação por aerossol com *Salmonella* spp. pode também resultar em infecção sistêmica e contaminação de ovos. Em um experimento que envolveu a inoculação de *Salmonella* Enteritidis por via oral, intravenosa e aerossol, observam que todas as três vias de administração induziram frequência similar de contaminação de ovos, mas a inoculação por via oral foi associada com maiores proporções de aves que põe pelo menos um ovo contaminado. Observam também que as três vias de inoculação usadas apresentaram similar distribuição da contaminação entre gema e albúmem, e que a contaminação da gema ocorreu com mais frequência do que a contaminação do albúmem nos três métodos de inoculação utilizados. Observam que a inoculação intravenosa difere da via oral por nunca resultar na contaminação do albúmem. Consideram que esta observação sugere que os modelos experimentais com inoculação intravenosa devem ter limitada aplicabilidade no entendimento da distribuição espacial da *Salmonella* Enteritidis no interior dos ovos produzidos por aves naturalmente contaminadas.

Buck et al. (2003) estudando a interação da *Salmonella* Enteritidis com as secreções do istmo concluem que a ligação das células de *Salmonella* Enteritidis as secreções do istmo devem ajudar a explicar o por que de muitos trabalhos relatarem que as membranas da casca são as partes do ovo mais contaminadas com *Salmonella* Enteritidis após infecção natural e experimental, e que o eficiente transporte da bactéria a partir da localização intracelular até as membranas da casca no momento da sua formação, deve reduzir a exposição desta bactéria ao sistema imunológico da galinha a um mínimo.

Gast et al. (2003) afirmam que tanto as aves naturalmente como as experimentalmente infectadas podem apresentar a *Salmonella* Enteritidis no interior dos ovos. Citam que algumas propriedades microbiológicas que se tornam relevantes após colonização de órgãos reprodutivos, juntamente com a habilidade de contaminar e colonizar estes órgãos deve ser necessário para a deposição de *Salmonella* Enteritidis no conteúdo de ovos e que os resultados da infecção por *Salmonella* Enteritidis em aves são influenciados pela susceptibilidade do hospedeiro tanto quanto devido a fatores microbianos. Analisando os resultados de um experimento, concluem que estes indicam que a interação da *Salmonella* Enteritidis com tecidos do trato reprodutor de aves pode ter sido tanto induzido como selecionado pela expressão das propriedades microbianas responsáveis pela contaminação do ovo.

2.2.2.2.2 *Salmonella* Enteritidis e a resistência ao calor

Humphrey et al. (1989b) descrevem citações de que *Salmonella* Enteritidis PT4 foi implicada em surtos de toxinfecção alimentar envolvendo ovos cozidos, e sugerem que este microrganismo é capaz de resistir a alguns procedimentos de aquecimento. Observam, com base em um experimento, que as bactérias do gênero *Salmonella* spp. presentes na gema de ovos em casca são capazes de resistir em ovos cozidos. Observam que em ovos cozidos por mais de oito minutos ou fritos, onde toda ou parte da gema permaneceu líquida e onde a gema cozida não alcançou temperaturas letais para *Salmonella* spp., a resistência não foi afetada pelo sorotipo ou tamanho do inóculo. Citam que em alguns experimentos com *Salmonella* Enteritidis PT4, mais de 75% do inóculo inicial pôde ser recuperado. Citam também que sabendo que o número de células de *Salmonella* Enteritidis PT4 era menor que 8,0 log por grama de gema ou ovo, foi possível destruir todo o inóculo no processo de elaboração de ovo mexido rapidamente em alta temperatura, cozimento por nove minutos ou mais, ou fritura intensa até toda a gema estar solidificada. No caso de ovos mexidos, seria importante alcançar a temperatura de 80°C na mistura de ovo. Somente uma de 15 amostras que alcançaram esta temperatura foi *Salmonella* spp. positiva. Com aquecimento lento, onde a principal temperatura foi de 75,2°C +/- 1°C, *Salmonella* spp. foi positiva em todas as 15 amostras. Poderia ser sugerido que o risco potencial associado com *Salmonella* spp. em ovos aquecidos foi exagerado neste estudo pelo uso de grande inóculo. Deveria ser notado, contudo, que as bactérias do gênero *Salmonella* spp. são capazes de se multiplicar com facilidade na gema de ovos infectados experimentalmente em temperatura ambiente. Informam que a cepa de *Salmonella* Enteritidis PT4 isolada de ovos usados no preparo de pudim identificado como veículo em surto, foi identificada como resistente em ovos cozidos, fritos e mexidos. Este dado tem uma implicação potencialmente séria para a saúde pública, e sendo assim, foi decidido examinar em detalhes, e em um estudo multilaboratorial, a habilidade da *Salmonella* Enteritidis PT4 e outras *Salmonella* spp. isoladas de ovos em resistir em ovos em casca aquecidos sob condições domésticas simuladas. Em todos os testes as cepas testadas resistiram em ovos cozidos por quatro minutos. Informam que em um estudo comparativo para examinar a habilidade das salmonelas em resistir na gema de ovos em casca aquecidos sob condições domésticas demonstrou que elas poderiam ser isoladas de ovos

aquecidos mesmo quando a temperatura medida foi superior a usada para pasteurizar ovo líquido (64°C). As diferenças nas propriedades de transferência de calor entre o ovo líquido e o ovo em casca significa que os microrganismos que resistem ao aquecimento doméstico podem não resistir a pasteurização. Mencionam que as bactérias do gênero *Salmonella* spp. crescem rapidamente na gema de ovos em casca artificialmente contaminados estocados em temperatura ambiente e alcançam a fase estacionária em dois dias. Estas permanecem neste estado durante a vida de prateleira do ovo. Isso pode acontecer também em ovos naturalmente contaminados. Outros autores observaram que as células de *Enterococcus faecalis* em fase estacionária mostraram ser mais termorresistente do que as células na fase log. Sendo assim é provável que *Salmonella* spp. apresente o mesmo comportamento nas mesmas condições. Citam que *Salmonella* spp. ao nível de 10^8 ufc / g de gema em ovos artificialmente contaminados foram observadas resistindo a alguns métodos de aquecimento convencionais.

Humphrey et al. (1990b), esclarecem que as informações obtidas no experimento desenvolvido por eles, associadas com observações anteriores de que as bactérias do gênero *Salmonella* spp. na gema de ovos em casca estocados a temperatura ambiente rapidamente alcançam a fase estacionária, fornecem uma explicação para a habilidade da *Salmonella* Enteritidis PT4 em resistir a aquecimentos. A gema é termoprotetora e significativamente aumenta a termorresistência de *Salmonella* spp. As células se multiplicam a 37°C por 48 horas e na fase estacionária são muito menos termosensíveis que células em multiplicação por 24 horas. Assim a combinação desses fatores deve ter permitido a resistência de um número suficiente de células viáveis para se constituir uma dose infectiva. Apesar disso, os resultados apresentados mostram que enquanto a *Salmonella* Enteritidis PT4 é mais termorresistente que algumas outras bactérias do gênero *Salmonella* spp., isso não é excepcional. O que a torna diferente das outras é sua presença no conteúdo de ovos, particularmente na gema de ovos em casca intactos. Apesar de se saber que a *Salmonella* Enteritidis PT4 não resistiria a pasteurização em ovo líquido, o risco muito pequeno realizando este procedimento pode ser reduzido mais ainda pelo uso de ovos frescos e estocados a baixa temperatura suficiente para inibir a multiplicação antes da pasteurização. Sugerem que *Salmonella* Enteritidis deve ser mais termorresistente que outras bactérias do gênero *Salmonella* spp. comumente associadas com produtos de ovos e o valor D

observado para *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium em clara a 55°C foi de 1,5 e 1,0 minutos, respectivamente; o pH da clara não foi mencionado.

Humphrey et al. (1990a) citam que a *Salmonella* Enteritidis PT4 tem se mostrado mais resistente ao calor que outras bactérias do gênero *Salmonella* spp. comumente associadas com ovos. Informam que pesquisas tem mostrado que quando o inóculo excede 10^8 células por ovo, *Salmonella* Enteritidis PT4 pode ser isolada de ovos aquecidos por uma variedade de formas, incluindo fervura por mais de dez minutos, mesmo que a temperatura de aquecimento da gema ultrapasse a usada na pasteurização de ovo líquido. Esclarecem que isso poderia permitir acreditar que a *Salmonella* Enteritidis PT4 é excepcionalmente termorresistente, mas os resultados obtidos mostram que não é esse o caso.

Saeed e Koons (1993), com base nos dados obtidos por outros pesquisadores, concluem que diferentes cepas e fagotipos de *Salmonella* Enteritidis podem expressar potencial de invasão e multiplicação, além de níveis de termorresistência diferentes, o que influencia na sua sobrevivência e longevidade.

Chantarapanont et al. (2000), com base em outros autores, citam que o número de *Salmonella* Enteritidis presente é geralmente menor que 20 células por ovo. Analisam que, já que baixos números de *Salmonella* Enteritidis podem contaminar ovos via transmissão transovariana ou via fecal, sua presença não pode ser ignorada. Observam que se ovos contaminados internamente são objeto de abuso de temperatura, altos números de *Salmonella* Enteritidis podem ser alcançados e algumas células podem sobreviver ao processo de aquecimento intenso se este não for conduzido corretamente. Descrevem que a termorresistência de *Salmonella* Enteritidis na gema é maior que no albúmem devido as diferenças de pH, gordura e atividade de água. Concluem que o aquecimento adequado é essencial se células viáveis de *Salmonella* spp. no interior do ovo devem ser destruídas. Demonstram que a menos que a *Salmonella* Enteritidis contida nos ovos seja exposta a água quente até a gema estar completamente solidificada, esta pode sobreviver ao processo de aquecimento, e confirmam que a termorresistência da *Salmonella* Enteritidis é maior na gema do que no albúmem.

O CDC (2003) cita que ovos que reportadamente foram aquecidos intensamente e usados em salada de atum, foram implicados como veículo em surtos na Carolina do Sul nos EUA. Cita também que a contaminação cruzada da salada de atum através de manipuladores caseiros também foi considerada possível.

2.2.2.2.3 Detecção da *Salmonella* Enteritidis em ovos

Para isolar *Salmonella* Enteritidis em grande número de ovos, Gast (1993) cita que o *Animal and Plant Health Inspeccion Service* do *USDA* recomenda o uso de plaqueamento direto para reduzir o tempo e os custos de análise. No entanto, Gast e Holt (1995a), analisam que é possível que a presença de *Salmonella* Enteritidis em ovos não seja detectável usando-se o método de plaqueamento direto, devido não estar previsto pré-enriquecimento e enriquecimento seletivo para permitir as células de *Salmonella* Enteritidis se multiplicarem até níveis mais elevados, já que quando presentes, normalmente estão em baixo número de células e as proteínas do ovo tais como a ovotransferrina podem contribuir para a redução dos seus níveis.

Chen et al., (2001) informam que pesquisadores realizaram pesquisas no sentido do desenvolvimento de métodos rápidos e altamente sensíveis para detecção de *Salmonella* Enteritidis em ovos. Analisaram vários estudos sobre a suplementação do conteúdo de ovos com ferro que comprovam que este pode superar as propriedades antimicrobianas da ovotransferrina e aumenta a multiplicação e detecção de *Salmonella* Enteritidis em ovos. O *FDA* recomenda utilização de caldo tripticase soja (225 mL) suplementado com 35 mg / litro de FeSO_4 para 25 g de conteúdo de ovo. Baseado nos resultados obtidos nos vários estudos analisados, citam que o método de enriquecimento direto para *Salmonella* Enteritidis em conteúdo de ovos frescos suplementado com uma concentração ótima de ferro (0,5 mg de FeSO_4 por grama de conteúdo) significativamente aumenta a detecção de *Salmonella* Enteritidis em ovos. Devido ao baixo custo do FeSO_4 , consideram que esse método é prático na detecção em larga escala de *Salmonella* Enteritidis em ovos. Ainda baseado nos resultados obtidos, concluíram que o plaqueamento direto do conteúdo de ovos suplementados com 0,2 a 2 mg de FeSO_4 por grama de conteúdo de ovos deve ser usado no lugar do pré-enriquecimento e enriquecimento seletivo para rápida e consistente detecção de baixos níveis de *Salmonella* Enteritidis em ovos.

Valentin-Bom et al. (2003) afirmam, com base nas observações de outros autores de que as células de *Salmonella* Enteritidis tipicamente estão presentes em baixas concentrações e somente esporadicamente em ovos individuais, que métodos de isolamento altamente sensíveis, e a análise de um grande número de ovos são necessários. Citam que métodos convencionais para análises de ovos

incluem um pré-enriquecimento para permitir a ressuscitação e multiplicação das células de *Salmonella* Enteritidis seguido de enriquecimento seletivo, plaqueamento seletivo e confirmação sorológica.

2.2.2.3 *Salmonella* Enteritidis e a saúde das populações humanas

Casos de DTA causadas por *Salmonella* spp. associada com ovos não é um problema novo. Sanders et al. (1964) citam um grande número de surtos associados com produtos de ovos a granel e ovos em casca rachados. Segundo Cohen e Blake (1977), desde a exigência da pasteurização de produtos de ovos a granel e a inspeção federal de ovos em casca a partir de 1970, nos EUA, foram menores os números de surtos de DTA causadas por *Salmonella* spp. associadas a ovos e o CDC não recebeu nenhum reporte de surto associado com produtos de ovos a granel.

Mota et al. (1983) publicaram a primeira descrição de surto de *Salmonella* Enteritidis ocorrido no Brasil. Relatam a ocorrência de um surto de DTA produzida por *Salmonella* Enteritidis, resultante da ingestão de maionese contaminada, em um restaurante do Bairro de Santa Felicidade em Curitiba, comprovadamente em condições de higiene na manipulação insatisfatórias, no qual 306 pessoas fizeram refeições (almoço e/ou jantar) no dia 28 de julho de 1981. Das 306 pessoas identificam 181 doentes, dos quais 40 hospitalizados. Concluem que o creme de maionese contaminado provavelmente na fase de manipulação, preparado com antecedência e até mesmo reaproveitado de refeições anteriores e conservado em geladeira que apresentava refrigeração inadequada por avarias, permitiu a multiplicação bacteriana a nível suficientemente elevado, ultrapassando em muito a dose infectante. Recomendam que sejam dadas maiores atenções aos manipuladores de alimentos, através de atividades de assessoria técnica, supervisão e fiscalização de carteiras sanitárias especiais, renovadas semestralmente, acompanhadas de criterioso exame médico.

Segundo a *World Health Organization*¹⁰ (1983), apud Tavechio et al. (2002), as bactérias do gênero *Salmonella* spp. são enterobactérias zoonóticas que são responsáveis por surtos tanto de doenças clínicas humanas como animais, e apresentam uma significativa importância higiênica e econômica a nível mundial.

¹⁰ WORD HEALTH ORGANIZATION. *Guidelines on prevention and control of Salmonellosis*. Word Health Organization. Geneva. 1983.

Existem algumas vias de transmissão para as salmoneloses, mas a maioria das infecções humanas são derivadas do consumo de alimentos contaminados (especialmente aqueles de origem animal) e água.

Em 1987, o *CDC* (*CDC*, 1987) informou que quatorze surtos de *Salmonella* Enteritidis ocorridos na região nordeste dos EUA desde 01 de outubro de 1986 foram reportados. Citou que o veículo de transmissão foi identificado em dez dos 14 surtos, que pelo menos seis desses veículos foram ovos ou alimentos que continham ovos crus ou subaquecidos, que os surtos associados com ovos foram todos relacionados com ovos em casca classificados, segundo o *USDA*, como tipo A, e que em cada caso, a estória de preparação do alimento sugeriu que ovos foram consumidos cru ou subaquecidos. Com base nesses dados conclui que os surtos sugerem que a *Salmonella* Enteritidis associada ao ovo é um problema de saúde pública emergente e indica a importância da inspeção de rotina do sorotipo específico.

Um total de 6.390 isolamentos de *Salmonella* Enteritidis foram reportados ao *CDC* em 1987 (16% do total de reportes de isolamentos de *Salmonella* spp.). *Salmonella* Enteritidis foi o segundo sorotipo de *Salmonella* spp. mais reportado. Os surtos descritos confirmam a continua associação entre ovos e surtos de infecção alimentar por *Salmonella* Enteritidis. De 19 surtos causados por *Salmonella* Enteritidis com o veículo transmissor conhecido reportado ao *CDC* em 1987, 15(79%) foram associados com ovos frescos tipo A. O exame de dados de 1973 até 1987 revela que a maioria dos surtos causados por *Salmonella* Enteritidis ocorreram durante os meses do verão (*CDC*, 1988).

De acordo com dados de Sharp (1988), o aumento do número de casos causados por *Salmonella* Enteritidis não é limitado aos EUA. Ocorreu na Europa e Reino Unido, onde a doença está ligada ao consumo de frangos, tanto quanto ovos em casca frescos ou incompletamente cozidos.

Li et al.¹¹ (1988), apud Schoeni et al. (1995), afirmam que a manutenção dos ovos a temperatura ambiente por algumas horas foi considerado como um fator em surtos associados com *Salmonella* Enteritidis.

¹¹ LIN, F.Y.C.; MORRIS, J.G.; TRUMP D.; TILHGMAN, D.; WOOD, P.K.; JACKMAN, N.; ISRAEL, E.; LIBONATI, J.P. Investigation of an outbreak of *Salmonella* Enteritidis gastroenteritis associated with consumption of eggs in a restaurant chain in Maryland. *American Journal of Epidemiology*, v.128, p.839-844. 1988.

CDC (1990) informa que de 1976 até 1989, as taxas de isolamento de *Salmonella* Enteritidis em geral aumentaram nos EUA. Em 1989, os 8.340 isolamentos de *Salmonella* Enteritidis reportados através do Sistema de Vigilância de *Salmonella* spp., representaram 20% de todos os reportes de isolamentos de *Salmonella* spp. A *Salmonella* Enteritidis foi o segundo mais freqüente sorotipo reportado. Informa também que durante o período de 1985 até 1989, os departamentos de saúde estaduais e territoriais nos EUA reportaram 244 surtos de infecção por *Salmonella* Enteritidis, que determinaram 8.607 pessoas doentes, 1.094 hospitalizações e 44 mortes. Em 109 surtos em que o alimento veículo de transmissão foi identificado, 89 (82%) foram associados com ovos em casca. Observa que, estatisticamente, 0,01% dos ovos frescos contém *Salmonella* Enteritidis. Conseqüentemente, alimentos contendo ovos frescos ou mal cozidos apresentam um risco ocasional de infecção com *Salmonella* Enteritidis. A probabilidade de séria morbidade ou mortalidade como resultado da infecção por *Salmonella* Enteritidis é alta entre os muito jovens, idosos ou imunodeprimidos. Estas pessoas devem ser especialmente tratadas para não ingerirem alimentos contendo ovos frescos ou mal cozidos.

Madden (1990) descreve que os sintomas de gastroenterites humanas associadas com *Salmonella* Enteritidis incluem diarréia, dor abdominal, calafrios, febre, vômito e dor de cabeça. A doença não é restrita a um grupo etário específico, apesar da maioria dos surtos e mortes reportadas para o CDC terem ocorrido em hospitais ou enfermarias, onde muitos indivíduos estão debilitados ou idosos e podem ter a doença subclínica. Observa que os surtos que vem ocorrendo após a adoção da exigência, a partir de 1970, da pasteurização de produtos de ovos a granel, e a inspeção federal de ovos em casca nos EUA, se devem a presença da bactéria nos ovos em formação, devido a transmissão a partir da galinha responsável pela postura contaminada com *Salmonella* spp.

Rodrigue et al., (1990) citam que as recentes alterações na epidemiologia da *Salmonella* spp. foram caracterizadas pelo estabelecimento de um número de fagotipos de *Salmonella* Enteritidis em frangos e galinhas de postura, não relacionados, em alguns países diferentes. Citam também que anteriormente, a distribuição pandêmica em populações humanas na Europa e nas Américas, foi sugerida como sendo associada com a moderna produção intensiva de ovos.

De acordo com Madden (1990), as cepas de *Salmonella* Enteritidis isoladas na Europa e Reino Unido pertencem principalmente ao fagotipo 4, o qual parece ser mais patogênico ao homem que outros fagotipos de microrganismos e também patogênico para frangos. Em contraste, as cepas americanas de *Salmonella* Enteritidis predominantemente fagotipo 8 e 13^a, apesar de patogênicas ao homem, tem somente um efeito menor sobre frangos infectados. A coincidente emergência da *Salmonella* Enteritidis tanto na Europa quanto nos EUA, sugere que a bactéria pode ter se adaptado a coexistir em galinhas infectadas.

Thorne (1991) informa que dados de surtos de *Salmonella* Enteritidis envolvendo alimentos outros que não ovos como veículo, indicam que a dose infectiva de *Salmonella* spp. de vários sorotipos pode ser muito baixa (<50 ufc). Afirma que o mais surpreendente foi observar que a evolução da epidemia de infecção não estava associada com ovos sujos ou rachados como foi visto no passado. Afirma que o isolamento da *Salmonella* Enteritidis em ovos classe A intactos permitiu supor a possibilidade da infecção transovariana dos ovos, o que não foi ainda demonstrado no caso da *Salmonella* Enteritidis.

Mishu et al. (1991)¹², apud Hou et al. (1996), afirmam que as infecções por *Salmonella* Enteritidis apresentaram um aumento intenso devido ao consumo de ovos frescos ou alimentos contendo ovos insuficientemente cozidos. Considerando que mais de 65 bilhões de ovos em casca frescos são vendidos anualmente nos EUA, ovos em casca podem representar um sério risco a saúde se eles estão contaminados com *Salmonella* spp.

Segundo Humphrey et al. (1991), a análise de alguns casos e/ou surtos de infecção por *Salmonella* Enteritidis revela uma significativa associação entre o consumo de ovos mexidos, ovos levemente aquecidos, sanduíches adquiridos em estabelecimentos comerciais e doenças.

Muitos dos casos de infecção por *Salmonella* Enteritidis ocorrem como casos esporádicos ou limitado a surtos em família, mais do que como parte de um grande surto. Muitos casos esporádicos são causados pelo mesmo fagotipo associado com surtos relacionados com ovos e provavelmente tem a mesma fonte (RODRIGUE et al., 1992). No entanto, quando cozinhas comerciais servem alimentos feitos com

¹² MISHU, B.; GRIFFIN, P.M.; TAUXE, R.V.; CAMERSON, D.N.; HUTCHESON, R.H.; SCHAFFNER, W. *Salmonella* Enteritidis gastroenteritis transmitted by intact chicken eggs. *Ann. Int. Med.* V.115, p.190-194. 1991.

ovos contaminados que não são suficientemente aquecidos para destruir a *Salmonella* spp., um grande número de pessoas, potencialmente, podem tornarem-se infectadas (CDC, 1992).

Barnes e Edwards (1992), descrevendo um surto discreto de *Salmonella* Enteritidis fagotipo 4, concluem que a incidência fornece evidências de que a contaminação por *Salmonella* spp. em ovos é um problema contínuo e que evidências diretas, contudo, permanecem indefiníveis.

Binkin et al. (1993) citam que o número de casos de *Salmonella* Enteritidis aumentou substancialmente em muitos países da Europa, sendo que na Inglaterra, o número de casos aumentou seis vezes entre 1982 e 1988, e o mesmo aconteceu entre 1990 e 1991, sugerindo uma intensa aceleração. Citam também que na França aumentou sete vezes entre 1986 e 1990, na Suíça aumentou uma média de 51% por ano de 1984 e 1989, na Espanha aumentou dez vezes entre 1983 e 1987, sendo que muito desses aumentos foram atribuídos ao consumo de produtos contendo ovos crus ou deficientemente aquecidos.

A maioria das infecções associadas com o consumo de ovos envolve ovos frescos ou produtos em que eles participam como matéria-prima, e a ocorrência de ovos contaminados com *Salmonella* Enteritidis emergiu como a maior causa de doenças de origem alimentar nos Estados Unidos desde 1985 (MORSE et al., 1994).

De acordo com Caffer e Eiguer (1994), entre 1986 e os seis primeiros meses de 1993, foram reportados 150 surtos de DTA causadas por *Salmonella* Enteritidis que atingiram mais de 6.000 pessoas na Argentina. Um total de 71,3% desses surtos foram confirmados através de análise bacteriológica de fezes, e 47,3% por análise bacteriológica dos alimentos incriminados nos surtos.

Segundo Lepoutre et al.¹³ (1994), apud Protais et al. (1996), na França, como em outros países, a análise de infecções humanas relatadas a partir de surtos de doenças transmitidas por alimentos, mostra que ovos ou produtos de ovos infectados com *Salmonella* spp. são importantes fontes.

O *Communicable Disease Surveillance Centre*¹⁴ (1995), apud Boyce et al., (1996), informa que na Inglaterra e Wales, o número de isolamentos de *Salmonella* Enteritidis reportados aumentou 16 vezes, de 1.101 em 1982 para 17.369 em 1994.

¹³ LEPOUTRE, A.; SALOMON, J.; CHARLEY, C.; LE QUERREC, F. Les toxi-infections alimentaires collectives en 1993. *Bulletin Epidemiologique*, v.52, p.245-247. 1994.

¹⁴ Communicable Disease Surveillance Centre. *Salmonella* in humans, England and Wales: quaterly report. *CDR REV.* v.5, p.47. 1995.

Observa que a *Salmonella* Enteritidis fagotipo 4 é responsável pela maior parte deste aumento. Conclui que, anteriormente rara, a *Salmonella* Enteritidis fagotipo 4, naquele momento responde por 79% dos isolamentos de *Salmonella* Enteritidis reportados ao *Communicable Disease Surveillance Centre*.

Na região Noroeste do Estado de São Paulo, foi notificado, pela primeira vez em julho de 1993, surto causado por *Salmonella* Enteritidis afetando alunos de uma escola, no qual 772 pessoas foram expostas e 211 foram afetadas, conforme descrito por Kaku et al. (1995).

Araújo et al (1995) descrevem quatro surtos, em Sorocaba, associados ao consumo de alimentos preparados a base de ovos crus, que aconteceram em um restaurante “self-service” onde foram afetados 60 pessoas e, entre estas, 32 necessitaram de atendimento hospitalar; em refeição domiciliar onde nove pessoas foram expostas e as nove foram afetadas com duas hospitalizações; entre familiares durante ceia de natal; e em uma pequena indústria metalúrgica onde 20 pessoas foram expostas e desta 19 foram afetados sendo seis com atendimento hospitalar. Os sintomas apresentados foram semelhantes nos surtos relatados e constaram de diarreia, fortes dores abdominais, prostração, cefaléia e vômito variável. Dos alimentos analisados, isolou-se a *Salmonella* Enteritidis em arroz, coxa de frango, lasanha e maionese. Do surto entre familiares durante ceia de natal, em amostras de ovos do mesmo lote usado para o preparo do molho de maionese, foi isolada a *Salmonella* Enteritidis. No surto ocorrido na indústria metalúrgica a *Salmonella* Enteritidis foi isolada de amostras de maionese efetivamente consumida. Os autores concluem que a incidência de surtos de DTA provocadas por *Salmonella* Enteritidis está relacionada ao consumo de ovos crus em Sorocaba, que a contaminação cruzada acontece durante a manipulação e preparo de alimentos, sendo que a *Salmonella* Enteritidis tem condições de contaminar alimentos via utensílios e manipuladores e que a condição de portador pode existir temporariamente. Os autores sugerem a implantação de rastreamento de *Salmonella* spp. em ovos, para avaliação e caracterização do risco (perigo) de causar salmonelose, assim como programa de informação à comunidade com esclarecimento suficiente para impedir/diminuir o consumo de ovos crus ou medianamente cozidos e instruir sobre o perigo e as formas de controle das possíveis vias de contaminação cruzada durante o preparo/manuseio de alimentos.

Pissani et al. (1995) citam que na região de Campinas, no período de 1994-95, foram notificados 15 surtos causados pela *Salmonella* Enteritidis.

Fuzihara et al. (1995) relatam a ocorrência de quatro surtos, em Santo André, no período de 1994-95.

Kaku et al. (1995) descrevem que a partir de meados da década de 90, a *Salmonella* Enteritidis tornou-se o sorotipo prevalente em salmoneloses humanas, particularmente em surtos de origem alimentar, mas também em surtos atribuídos a diferentes fontes não humanas.

De acordo com CDC (1996), a *Salmonella* Enteritidis responde por um aumento na proporção de todos os sorotipos de *Salmonella* spp. reportados para o Sistema Nacional de Inspeção de *Salmonella* spp. do CDC. Durante o período de 1976 até 1994, a proporção de isolamentos de *Salmonella* spp. reportados, que foram confirmados como *Salmonella* Enteritidis, aumentou de 5% para 26%. Durante o período de 1985 até 1995, os departamentos de saúde locais e estaduais reportaram 582 surtos de *Salmonella* Enteritidis, que provocaram 24.058 doentes, 2.290 hospitalizações e 70 mortes. Durante o período de 1976 até 1994, as taxas de isolamento de *Salmonella* Enteritidis aumentaram nos EUA de 0,5 para 3,9 por 100.000 habitantes. Nos EUA, tanto os casos isolados como os surtos associados com *Salmonella* Enteritidis, freqüentemente foram associados com o consumo de ovos frescos ou mal cozidos. Os dados informados demonstram que os surtos de infecção por *Salmonella* Enteritidis associados com ovos persistem como um problema de saúde pública em estabelecimentos de serviços de alimentação, instituições de assistência e residências através dos EUA. No entanto o risco para infecção por *Salmonella* Enteritidis em humanos pode ser reduzido através de ações de prevenção em saúde pública.

Boyce et al. (1996) citam que em abril de 1993 o primeiro surto americano de infecção de *Salmonella* Enteritidis fagotipo 4 identificado ocorreu entre 130 pessoas (48 com cultura confirmada) que se alimentaram em um “fast food” de comida chinesa em El Paso, Texas. Apesar da ocorrência de casos esporádicos da infecção terem sido reportados nos EUA, este foi o primeiro surto de *Salmonella* Enteritidis fagotipo 4 reportado nos EUA que não foram associados com viajantes estrangeiros. Analisam que apesar da contaminação dos ovos com *Salmonella* Enteritidis, surtos devido a este microrganismo são preveníveis através da adoção de práticas de preparação de alimentos seguros, tal como evitar o uso de mistura de

ovos. A mistura de ovos permite que um grande número de pessoas sejam infectadas a partir de apenas um ovo contaminado; restaurantes não deveriam usar mistura de ovos em casca, mas sim produtos de ovos pasteurizados. Nenhum caso de infecção por *Salmonella* Enteritidis foi notificado a partir do uso de ovos pasteurizados. Para prevenir a ocorrência de surtos de *Salmonella* Enteritidis associados a ovos, manipuladores de alimentos devem ser instruídos quanto a manipulação correta dos ovos; isso inclui evitar uso de mistura de ovos, usar refrigeração adequada, evitar contaminação cruzada com outros alimentos, aquecimento insuficiente e temperaturas de manutenção inadequadas. Consideram que a razão para essa epidemia de *Salmonella* Enteritidis fagotipo 4 não é clara. Alguns pesquisadores sugerem que as cepas de *Salmonella* Enteritidis fagotipo 4 são mais invasivas em aves jovens, facilitando a transmissão transovariana para a geração seguinte. Qualquer que seja o mecanismo, a corrente epidemia nos países Europeus sugere que uma vez que a *Salmonella* Enteritidis fagotipo 4 é introduzida na população de galinhas de postura, esta tem a capacidade de se disseminar rapidamente, infectando tanto populações de aves quanto populações humanas e persiste como cepa dominante nestas populações.

Segundo Tauxe (1997), as salmoneloses não tifóides substituíram as salmoneloses tifóides que imperavam até o final da década de 50 (Anexo 1).

O aumento dramático de DTA causada por *Salmonella* Enteritidis em comparação com outras bactérias do gênero *Salmonella* spp. pode estar relacionado com a infecção por *Salmonella* Enteritidis nos tecidos reprodutivos. Mais estudos são necessários para se confirmar a causa para o aumento dos casos de DTA causados por *Salmonella* Enteritidis e reduzir o risco para a saúde no consumo de ovos (MIYAMOTO et al., 1998).

Peresi et al. (1998) descreveram 23 surtos notificados ocorridos na região noroeste do Estado de São Paulo no período compreendido entre julho de 1993 a junho de 1997. Dos 23 surtos analisados, a grande maioria estava associada ao consumo de alimentos contendo ovos, sobretudo ovos crus ou com cocção insuficiente. Concluem que os elevados índices de hospitalização dos indivíduos afetados no surto que envolveu internos de um asilo de idosos e de outro, onde crianças representaram 66,7% dos afetados, indicam a gravidade da infecção em pacientes de faixas etárias extremas e enfatiza a necessidade de uso de ovos com cocção completa. Concluem também que o isolamento de *Salmonella* Enteritidis de

alimentos não indicados como veiculadores pelo inquérito epidemiológico e que não continham ovos, relativo a alguns surtos, sugerem a ocorrência da contaminação cruzada durante o preparo da refeição. Este fato demonstra a importância das boas práticas de higiene no preparo de alimentos e reforça a necessidade da implantação de programas de orientação aos profissionais manipuladores de alimentos. Citam outros pesquisadores que verificaram que no Estado de São Paulo, a *Salmonella* Enteritidis representou, nas duas últimas décadas, 0,4-1% de todos os sorotipos isolados de infecções humanas, que a partir de 1993, ocorreu aumento crescente no seu isolamento e, em 1995, passou a ser o sorotipo predominante, correspondendo a 64,9% dos isolamentos de material biológico de origem humana e 40,6% de outras origens.

Segundo Walford e Noah (1999), embora quase não considerada uma doença emergente, a DTA provocada por *Salmonella* spp. reemergiu tanto em incidência como em importância na década de 90 (Anexo 2). A maior parte deste processo pode ser atribuído à *Salmonella* Enteritidis que foi incriminada em 70% de todos os casos infecção por *Salmonella* spp. e destas 45% foram fagotipo 4 e todas intimamente relacionadas com ovos e frangos.

Apesar de décadas de pesquisas e programas de controle, a salmonelose continua a ser uma das mais prevalentes formas de doença bacteriana de origem alimentar. Estima-se que 1.412.498 casos de salmonelose ocorreram nos EUA a cada ano (MEAD et al., 1999).

De acordo com CDC (2000), os isolamentos de *Salmonella* Enteritidis reportados para o CDC aumentaram de 0,6 por 100.000 pessoas em 1976 para 3,6 em 100.000 pessoas em 1996. Estudos epidemiológicos de casos isolados e surtos indicam que o aumento estava associado com o consumo de ovos em casca frescos ou mal cozidos. De 1996 até 1998, o número de casos confirmados por cultura informados ao CDC diminuiu para 2,2 por 100.000. No entanto, surtos da doença causada por *Salmonella* Enteritidis continuaram a ocorrer. No período de 1985 até 1998, os departamentos de saúde dos estados e territórios reportaram 796 surtos de *Salmonella* Enteritidis com 28.689 doentes, 2.839 hospitalizações e 79 mortes. De 360 surtos com a fonte confirmada, 279 (82%) foram associados com ovos em casca frescos ou mal cozidos.

Segundo Palmer et al. (2000), as investigações sistemáticas representaram um importante papel no estabelecimento de que os ovos de galinha foram a maior causa da pandemia de *Salmonella* Enteritidis nos anos 80 e 90.

Chang (2000) cita que a infecção por *Salmonella* spp. representa 55,1% das doenças bacterianas de origem alimentar reportadas desde 1993 até 1996 na Coreia.

Estima-se que a taxa de contaminação transovariana por *Salmonella* Enteritidis esteja por volta de um em 20.000 ovos produzidos nos EUA. Apesar desta taxa ser realmente baixa, existe uma variação definida do risco relacionado com a região e produtor. Junto a isso, considerando que uma estimativa de 47 bilhões de ovos em casca foram vendidos a cada ano nos EUA, algo em torno de 2,3 milhões de ovos em casca contaminados com *Salmonella* Enteritidis podem chegar até os consumidores (BRACKETT et al., 2001).

Okamura et al. (2001) citam que apesar de 2.200 tipos de sorovares serem conhecidos, somente os surtos de salmonelose humana causadas pela *Salmonella enterica* sub espécie *enterica* sorovar Enteritidis aumentou substancialmente através do mundo desde meados dos anos 80, e tem-se tornado um importante problema de saúde pública e economia a nível mundial. Citam que a prevalência de infecções por outros sorovares de *Salmonella* spp. tem permanecido a mesma ou diminuída. Analisam que as razões para o aumento da dominância da *Salmonella* Enteritidis nos casos de enfermidades transmitidas por alimentos são provavelmente multifatoriais, contudo, análises epidemiológicas sugerem ovos ou produtos de ovos contaminados como os principais fatores de risco para a infecção esporádica por *Salmonella* Enteritidis. Concluem que a predominância deste sorovar em muitos países sugere que a *Salmonella* Enteritidis deve ter características ou capacidades únicas para contaminar ovos e devem, por meio disso, apresentar risco maior para a saúde pública do que outros sorovares. Contudo, o porquê da *Salmonella* Enteritidis ser o sorovar predominante entre 2.200 sorovares de *Salmonella* spp. na incidência de salmoneloses humanas não foi provada.

Levando em consideração as observações de outros pesquisadores de que a maioria dos casos de infecções de origem alimentar no Reino Unido ocorreu esporadicamente e não em surtos reconhecidos, que alimentos preparados em casa foram considerados uma provável fonte de muitos dos casos individuais, apesar de raramente ser possível identificar o veículo e as fontes da infecção esporádica, que

os alimentos suspeitos raramente estavam disponíveis e a estória de exposição de apenas um indivíduo foi usualmente impossível de interpretar, que poucos estudos de caso controle de infecções esporádicas foram conduzidos no Reino Unido e que estes demonstram associação com o consumo de ovos em casca frescos, que estes estudos não distinguem claramente entre alimento preparado em casa e alimento comprado fora, que investigações de surtos relacionados com alimento preparado em cozinhas domésticas sugerem que a contaminação cruzada desempenhou um importante papel, que a manipulação de alimentos tais como carcaças de frangos e ovos mostrou-se positiva para a disseminação de patógenos nas superfícies das cozinhas, utensílios e toalha de louça e que o papel da contaminação cruzada na etiologia de casos esporádicos não foi determinada, Parry et al. (2002) estudaram um caso controle de um caso esporádico de *Salmonella* spp. para identificar os fatores de risco em uma cozinha doméstica e concluem que, como em outros estudos, ocorre uma associação com o consumo de ovos mal aquecidos, mas não com o consumo de frangos, e que o consumo de ovos frescos foi o mais proeminente fator de risco, mas que explicaria somente 20% dos casos.

Tavechio et al. (2002) estudaram 4.581 sorotipos de *Salmonella* spp. isolados de fontes não humanas em São Paulo, de janeiro de 1996 até dezembro de 2000, e entre os 123 sorotipos identificados, a *Salmonella* Enteritidis ficou em primeiro lugar por vários anos exceto em 1999, quando foi suplantada pela *Salmonella* senftenberg devido ao largo número dessas cepas que foram isoladas de amostras do ambiente e enviadas para um laboratório particular. A maioria dos 170 surtos de *Salmonella* spp. de origem alimentar detectados durante o período de realização do trabalho foram causados por maionese caseira, e a *Salmonella* Enteritidis representou 95% dos isolamentos a partir desta fonte. De 4% de todas as cepas de *Salmonella* spp. isoladas de ovos em casca não pasteurizados, em torno de 60% foram cepas de *Salmonella* Enteritidis. Os autores concluem que na década de 90 quase o mesmo sorotipo predominou entre os isolamentos não humanos no Estado de São Paulo.

Conforme Silva e Duarte (2002), as taxas de crescimento da avicultura brasileira na década de 90 criaram condições favoráveis para a manutenção e proliferação da *Salmonella* Enteritidis nos plantéis avícolas. Além disso, o uso indiscriminado de antibióticos em aves, particularmente as quinolonas, encorajou a manutenção de lotes positivos para *Salmonella* Enteritidis. As cepas de *Salmonella* Enteritidis isoladas de aves têm mostrado alta sensibilidade aos antibióticos de uso

comum em avicultura, incluindo as quinolonas. Entretanto, o aumento da resistência antimicrobiana e multirresistência foi observado em cepas de origem humana. Os últimos levantamentos realizados no ano de 2001 mostram que a *Salmonella* Enteritidis em materiais avícolas é o principal sorovar responsável pelas infecções humanas. Embora as carcaças de frangos apresentem altas taxas de contaminação por *Salmonella* Enteritidis, são os ovos e seus derivados, principalmente a maionese caseira, os principais responsáveis pelos surtos humanos. O uso de vacinas específicas em poedeiras e reprodutoras tem se mostrado uma ferramenta auxiliar no controle de *Salmonella* Enteritidis. O procedimento mais indicado para o controle de *Salmonella* Enteritidis na avicultura está na aquisição e produção de lotes livres do agente. As rações e matérias primas de origem animal parecem não ser tão importantes na perpetuação do problema de *Salmonella* Enteritidis, porém, os roedores parecem ser reservatórios ambientais importantes de *Salmonella* Enteritidis em granjas contaminadas.

Molbak e Nelmann (2002), informam que pesquisadores tem observado que viagens internacionais foram o maior fator de risco para infecção com *Salmonella* Enteritidis, e que é concebível que um largo número de infecções associadas a viagens foram adquiridas a partir do consumo de ovos. Analisam que baseado na sistemática fagotipagem de isolamentos a partir de humanos e da cadeia alimentar, estima-se que 55 a 65% dos casos de salmonelose na Dinamarca poderiam ser atribuídos a ovos. Surtos de infecção por *Salmonella* Enteritidis associadas com ovos é uma evidência que indica que o aumento da infecção em humanos vem sendo causado pela disseminação da *Salmonella* spp. entre granjas de postura dinamarquesas. Confirmam a hipótese de que ovos em casca contaminados são as fontes primárias de infecção humana por *Salmonella* Enteritidis, e que o risco é particularmente associado com o consumo de refeições específicas contendo ovos frescos ou tratados rapidamente.

Alguns estudos envolvendo aves experimentalmente e naturalmente infectadas com *Salmonella* Enteritidis indicam que a camada interna da casca, junto às membranas da casca, são freqüentemente as partes mais infectadas de ovos lavados e concluem que a contaminação da casca do ovo ocorre principalmente no interior do trato reprodutivo. Mesmo quando a liberação intestinal de *Salmonella* Enteritidis cessa, a casca do ovo pode apresentar cultura positiva. Estes dados

sugerem que a infecção do trato reprodutivo baixo (istmo e útero) deve ser importante na contaminação de ovos por *Salmonella* Enteritidis (BUCK, et al., 2003).

De acordo com CDC (2003), nos EUA, o número de isolamentos de *Salmonella* Enteritidis reportados para o CDC foi de 3,8 para cada 100.000 pessoas em 1995. Apesar das taxas de culturas confirmadas para *Salmonella* Enteritidis reportadas pelo CDC declinarem para 1,9 em 1999, as taxas não declinaram mais adiante em 2001, e surtos continuam a ocorrer. Investigações de surtos e casos esporádicos tem indicado repetidamente que quando um alimento veículo é identificado, a mais comum fonte de infecção por *Salmonella* Enteritidis são ovos em casca frescos ou subaquecidos. Durante o período de 1990 a 2001, os departamentos de saúde estaduais e territoriais reportaram 677 surtos de *Salmonella* Enteritidis, os quais produziram 23.366 doentes, 1988 hospitalizações e 33 mortes. Entre 309 surtos reportados com um veículo de transmissão confirmado, 241 (78%) foram associados com ovos em casca, produzindo 14.319 doentes. Destes, 10.406 doentes ocorreram entre 1990 e 1995, e 3.913 ocorreram durante 1996 até 2001.

2.2.2.3.1 Prevenção e controle

O CDC (1987) indica que a manipulação apropriada e o cozimento dos ovos podem minimizar o risco da ocorrência de DTA causada por *Salmonella* spp. associada a ovos e que pesquisas futuras são necessárias para entender a ecologia da colonização em frangos e outros alimentos de origem animal e para determinar o caminho para uma futura redução da contaminação de ovos e outros alimentos de origem animal.

O CDC (1988) faz citação de um programa de controle de *Salmonella* Enteritidis que foi desenvolvido pelos departamentos estaduais de saúde juntamente com cientistas de aves, indústria de ovos, USDA, FDA e CDC. Observa que o controle a longo prazo pode depender da eliminação de lotes infectados ou do uso de produtos de ovos pasteurizados e que a manipulação correta e o cozimento dos ovos pode minimizar o riscos de salmoneloses. Cita que clínicos estão sendo encorajados a reportar casos de salmoneloses para os departamentos de saúde locais e estaduais.

Muitos produtos tais como o molho Caesar salad, molho holandez, gemada e sorvete caseiro, foram implicados em surtos de *Salmonella* Enteritidis porque eles

recebem tipicamente pouco ou nenhum tratamento térmico antes do consumo. Além disso, certas práticas tradicionais de aquecimento de ovos podem ser inadequadas para destruir *Salmonella* spp. em ovos (ST LOUIS et al., 1988).

Humphrey et al. (1989b), observam que a associação entre a contaminação de ovos e doenças humanas, conduziu a um esforço no sentido de quantificar o risco para o público. Ovos testados em relação a casos isolados ou surtos podem render uma proporção significativa de positivos, enquanto que ovos provenientes de lotes de aves incriminados são freqüentemente negativos em repetições de testes subseqüentes. Essa observação sugere que a produção de ovos contaminados deve ser intermitente e poderia possivelmente explicar por que rotineiramente testes feitos ao acaso raramente apresentam resultado positivo. Citam manuais para fornecedores de alimentos para hospitais sobre o uso de ovos em casca, editado pelo Departamento de Saúde da Inglaterra e Wales, que adverte que ovos frescos ou ligeiramente aquecidos não devem ser servidos para os pacientes em hospitais. Muitos casos de infecções por *Salmonella* Enteritidis ocorrem como casos esporádicos ou limitados a surto em família. Muitos desses casos esporádicos ou surtos limitados podem ser associados com o consumo de ovos contaminados que foram insuficientemente cozidos para matar a *Salmonella* spp. Portanto, a ocorrência de infecções adquiridas através do consumo de alimentos preparados em cozinhas de residências deve ser reduzida através da melhoria da educação dos consumidores com respeito ao risco do consumo de ovos frescos ou mal cozidos e pelo aumento da disponibilidade de ovos pasteurizados. Para reduzir o risco de infecção por *Salmonella* Enteritidis em outros lugares, tais como enfermarias e hospitais, produtos de ovos pasteurizados devem ser usados como prescrição. Similarmente, estabelecimentos comerciais de alimentação podem reduzir o risco de surtos usando produtos de ovos pasteurizados em tais prescrições.

Esforços para diminuir ou prevenir a transmissão de *Salmonella* Enteritidis de alimentos para o homem depende de uma detecção precisa de infecções de *Salmonella* Enteritidis em galinhas. A identificação de granjas positivas através de métodos bacteriológicos ou sorológicos somente é efetiva se as dinâmicas da infecção das galinhas são bem entendidas. A disseminação de *Salmonella* Enteritidis nos órgãos internos das aves, por exemplo, sugere que a contaminação transovariana dos ovos pode ocorrer. O isolamento de *Salmonella* Enteritidis dos órgãos internos foi assim proposto como um requerimento para a classificação de

granjas como infectadas e capazes da produção de ovos com o conteúdo contaminado (GAST; BEARD, 1990a).

Madden (1990), informa que em abril de 1988, o *FDA* e o *USDA* formaram uma força tarefa para desenvolver estratégias para o controle do aumento contínuo surtos de *Salmonella* Enteritidis relacionados com ovos e para desenvolver programas de pesquisa necessários ao controle do risco para a saúde pública relacionado com este problema. Um encontro público nacional patrocinado pelo *FDA* e pelo *USDA* foi realizado em Washington, DC, em 15 de setembro de 1988. Os comentários feitos neste encontro foram incorporadas ao programa de controle estratégico originalmente preparado pelos membros da Conferência Nordeste em Doença das Aves. Um modelo voluntário de programa estadual para garantia de qualidade quanto a *Salmonella* Enteritidis foi então emitido para os estados e territórios em 2 de novembro de 1988. O Programa trabalha com o teste de todas as granjas de reprodução. Detalhes do programa incluem o monitoramento do ambiente dos galpões, teste sorológico das aves dos galpões para determinar a exposição a *Salmonella* Enteritidis, cultura microbiológica de órgãos de aves aleatoriamente selecionadas nos galpões, e periodicamente testar a morte de embriões no ovo. A granja foi considerada positiva para *Salmonella* Enteritidis somente se esta bactéria estiver presente nos órgãos internos (excluindo os intestinos e pulmões) em aves selecionadas. O plano mais adiante trabalha com o teste de granjas comerciais se elas foram relacionadas com doenças humanas ou se elas foram derivadas de granjas de reprodução detectadas como positivas para *Salmonella* Enteritidis. Analisa que muitas questões científicas permanecem sem resposta. Após setembro de 1988, reuniões públicas, veterinários e cientistas do *USDA*, *FDA* e *CDC* e acadêmicos e veterinários de várias instituições revisaram a literatura e estabeleceram pesquisas prioritárias. Vários projetos de pesquisa foram então desenvolvidos pelo *USDA* e *FDA* e pela própria indústria de ovos que gastaram milhões de dólares. Os frutos de todos estes esforços ainda não foram visualizados ainda, mas tem-se aprendido sobre esta doença em galinhas e os possíveis meios de se remover ou excluir esta bactéria das granjas de galinhas. Informa que o governo federal conduziu uma campanha de prevenção da doença através do *FDA* e *USDA*. Jornais e revistas divulgaram informações para alertar o público sobre o risco de consumo de ovos frescos e refeições contendo ovos. O *FDA* e *CDC* também prepararam e distribuíram um vídeo sobre a correta manipulação e aquecimento de

alimentos, incluindo ovos e alimentos contendo ovos, para indivíduos com *FDA*. Observa que o plano de testes obrigatórios não deve se restringir ao nível de criação de frangos. Os incubatórios devem ser incluídos tanto que os produtores de ovos renovando a população dos galpões possam ter garantido que as novas galinhas foram obtidas de ovos postos por galinhas negativas para presença de *Salmonella* Enteritidis. Produtores de ovos comerciais devem também ser incluídos no plano obrigatório. Apesar deles não necessitarem seguir os mesmos testes sorológicos e microbiológicos indicados para novos criadores, eles devem testar o ambiente do galpão antes de colocar novas aves. Seguindo estas regras se asseguraria que ovos de galinha são seguros para o consumo.

Conforme *CDC* (1990), para atacar o problema de saúde pública representado pela *Salmonella* Enteritidis, duas importantes medidas foram implementadas. Primeiro, em fevereiro de 1990, o *USDA* começou a investigar lotes de poedeiras de ovos que são epidemiologicamente implicados em surtos de doença humana, e segundo, a movimentação interestadual de ovos de lotes verificados como contaminados com *Salmonella* Enteritidis (através de cultura a partir de órgãos de aves) foi restringido e estes desviados para o processamento de pasteurização ou destruição. Segundo *CDC* (1990), em agosto de 1990, o *FDA* revisou o código de segurança alimentar na comercialização de alimentos para incluir os ovos como alimento de risco potencial. O código revisado recomenda que ovos (que anteriormente eram dispensados da regulamentação federal sobre tempo e temperatura que são aplicados a outros alimentos de origem animal) sejam refrigerados durante a estocagem. Além disso, estabelecimentos de alimentação são aconselhados a não servir ovos frescos ou mal cozidos e substituir por ovos pasteurizados.

Bradshaw et al. (1990) citam que os dados sobre a cinética do crescimento de *Salmonella* Enteritidis na gema de ovos em casca a partir de aves normais mostram que qualquer abuso de temperatura, ou estocagem a 16°C, permitem uma rápida amplificação a partir de um pequeno número de células até elevados níveis suficientes para causar infecção humana. Analisam que a alta incidência de surtos de *Salmonella* Enteritidis durante os meses de verão, pode, em parte, ser resultado de tais abusos de temperatura, que permitem uma rápida multiplicação desses microrganismos até níveis elevados o suficiente para causar infecção humana.

Segundo Thorne (1991), os custos da prevenção de salmoneloses não são conhecidos, mas o custo de um único surto em hospital (envolvendo 242 pessoas e três mortes) foi estimado entre US\$ 340.000 e US\$ 1.530.000 em 1985. Para o controle do aumento da incidência de *Salmonella* Enteritidis e a sua erradicação de granjas de reprodução e postura, a base para a diferenciação na virulência entre fagotipos de *Salmonella* Enteritidis, precisa ser identificada. Tais informações básicas proporcionarão condições para a identificação específica de granjas infectadas com cepas epidemiologicamente importantes, e permite o desenvolvimento de sistemas viáveis para intervenção e controle.

Baseados em evidências epidemiológicas, Gast e Beard (1992) sugerem que os surtos de *Salmonella* Enteritidis em humanos associados com ovos geralmente resultam de uma série de três eventos independentes. Primeiro, os ovos contaminados com *Salmonella* Enteritidis devem ser produzidos por aves contaminadas. Segundo, os ovos contaminados devem ser objeto de manipulação imprópria a qual permita a multiplicação da *Salmonella* Enteritidis até níveis infecciosos. Terceiro, os ovos contaminados com *Salmonella* Enteritidis devem ser submetidos termicamente ou consumidos frescos.

Segundo Nascimento et al. (1992), as indústrias de ovos normalmente empregam métodos padrões de controle de qualidade, muitos destes são subjetivos e assumem que a estrutura da casca é uniforme. Os mecanismos de defesa inerentes à casca podem ser prejudicados tanto por um mau funcionamento do oviduto ou acidente no caminho entre a ave e o consumidor, sendo assim, uma avaliação realista das imperfeições inerentes da casca devem ser a primeira etapa no desenvolvimento de uma melhor medida de qualidade do ovo.

Os dados obtidos Saeed e Koons (1993) indicam que uma excessiva contaminação dos ovos direcionados para pasteurização poderia ser evitada através de uma refrigeração dos ovos. A refrigeração mantém baixo o número de *Salmonella* Enteritidis e pode facilitar uma pasteurização mais efetiva. Indicam também que a refrigeração dos ovos rapidamente depois de recolhidos e classificados na granja e durante a estocagem em mercados varejistas, serviços de bufê e nas residências pode ser uma efetiva barreira contra a infecção do consumidor com *Salmonella* Enteritidis.

Segundo Mason (1994), uma ocorrência altamente ascendente de salmoneloses em humanos causados por *Salmonella* Enteritidis nos EUA entre 1985

e 1989 resultou em um programa de levantamento epidemiológico desenvolvido pelo governo e que começou em 1990. Granjas de postura consideradas como fonte de surtos relacionados a ovos foram testadas para *Salmonella* Enteritidis e os ovos dessas granjas foram desviados para indústrias de processamento de produtos de ovos para serem pasteurizados. Um programa para eliminação de *Salmonella* Enteritidis de granjas de criação e de reprodução foi iniciado na mesma época. A subsequente inspeção das galinhas e do conteúdo líquido antes da pasteurização revelou que a *Salmonella* Enteritidis estava muito mais prevalente do que se suspeitava, e que a prevalência mais elevada foi detectada nos Estados do nordeste e meio atlântico. Desde que as taxas não diminuíram nos dois anos subsequentes um projeto piloto foi iniciado em 1992 na Pensilvânia, uma das áreas mais afetadas. O projeto foi desenvolvido para reduzir o número de surtos de *Salmonella* Enteritidis desviando os ovos de granjas afetadas e ao mesmo tempo tentando delinear os aspectos epidemiológicos e de controle da doença. Com os resultados obtidos nos primeiros 18 meses de execução do projeto piloto, um programa bem maior para controle de *Salmonella* Enteritidis foi implementado na mesma área a partir de outubro de 1993.

Evidências consideráveis sugerem que sempre que uma granja apresenta infecção disseminada de *Salmonella* Enteritidis, a contaminação dos ovos ocorrem infreqüentemente e sempre envolvem um pequeno número de células de *Salmonella* Enteritidis. Conseqüentemente um número maior de ovos devem ser analisados para se obter um grau satisfatório de confiança do teste que assim será suficientemente sensível para detectar qualquer *Salmonella* Enteritidis que esteja presente. Normalmente recomenda-se que seja analisado o conteúdo de dez a trinta ovos juntos. Na análise de um grupo de ovos o método de plaqueamento direto, foi menos sensível que o método de com enriquecimento em caldo para a detecção de *Salmonella* Enteritidis. Detecção consistente (100%) em grupos contaminados experimentalmente requer um nível mínimo de células 10.000 vezes maior de *Salmonella* Enteritidis no método de plaqueamento direto do que no método de enriquecimento em caldo. A menor sensibilidade do método de plaqueamento em comparação com o método de enriquecimento pode ser justificada pelo tamanho da alíquota do grupo analisado que no caso de plaqueamento direto é capitado por um swabb enquanto que no método de enriquecimento o volume da alíquota é de 20 mL. Somando-se a isso, as duas etapas de enriquecimento proporcionam uma

oportunidade para o aumento na concentração de células de *Salmonella* Enteritidis nas amostras antes do plaqueamento. A diferença na sensibilidade da detecção entre o plaqueamento direto e o método observado neste estudo ajuda a explicar a baixa frequência em que o plaqueamento direto identifica os grupos de ovos contaminados com um pequeno número inicial de *Salmonella* Enteritidis observados em outras pesquisas(GAST; HOLT, 1995b).

Schoeni et al. (1995) obtiveram resultados que demonstram a necessidade de uma rápida remoção da contaminação fecal de ovos para se diminuir o potencial de penetração de *Salmonella* spp. no conteúdo dos ovos. Descrevem que apesar do número pequeno de *Salmonella* spp. que podem contaminar o ovo via transovariana ou através da casca, essa pequena população não pode ser ignorada. Temperaturas de estocagem inferiores a 4°C combinadas com as defesas naturais não previnem completamente a multiplicação da *Salmonella* spp. Já que uma rápida multiplicação ocorre a 25°C, um mínimo de abuso no controle da temperatura poderia causar elevados números de *Salmonella* spp. no ovo. Consideram a necessidade de um controle apropriado dos procedimentos de estocagem, aquecimento e consumo como crítica. Citam que a gema é altamente nutritiva e a multiplicação nela não é improvável, mesmo a 4°C. Observaram que a *Salmonella* Enteritidis foi capaz de crescer bem no albúmem a 25°C, enquanto ligeiro crescimento foi observado em alguns casos a 10°C e a 4°C. Citam que a alta percentagem de ovos contaminados e a taxas de penetração mais rápidas foram observadas quando um diferencial de temperatura foi criado. Essa observação é significativa desde de que os diferenciais de temperatura são produzidos quando os ovos são transferidos da produção para a estocagem. Analisam que desde de que práticas padrões de aquecimento podem não eliminar altos níveis de *Salmonella* Enteritidis, a temperatura de estocagem pode ser muito importante no controle de infecções por *Salmonella* spp. e manutenção da qualidade do ovo.

A refrigeração dos ovos durante a estocagem adicionalmente aumenta a sensibilidade térmica da *Salmonella* Enteritidis (HUMPHREY¹⁵, 1995, apud MESSENS et al., 2002).

Holt et al. (1996) citam que em um esforço para se controlar o problema de surtos de infecções por *Salmonella* Enteritidis relacionados a ovos ou produtos de

¹⁵ HUMPHREY, T.J. Contamination of eggs with potential human pathogens. In: BOARD, R.G; FULLER, R. *Microbiology of The Avian Egg*. London, Chapman & Hall. 1995. p.93-116.

ovos, a indústria de ovos iniciou um programa de vacinação com “bacterins” de *Salmonella* Enteritidis como uma medida de intervenção. Evidências experimentais mostraram que a vacinação contra a *Salmonella* Enteritidis significativamente diminuiu a progressão da infecção de galinhas por esta bactéria, incluindo a diminuição da produção de ovos contaminados com *Salmonella* Enteritidis. Pela redução da frequência de ovos contaminados com *Salmonella* Enteritidis, a vacinação desempenha um importante papel na proteção do consumidor contra DTA provocada pela *Salmonella* Enteritidis. O segundo benefício potencial da vacinação são os anticorpos na gema. Galinhas vacinadas com uma vacina de *Salmonella* Enteritidis destruída apresentam forte resposta imunológica no soro e concomitantemente na gema com um aumento dos anticorpos anti *Salmonella* Enteritidis. Os resultados obtidos indicam que a capacidade do conteúdo do ovo de galinha vacinada inibir *Salmonella* Enteritidis ocorre quando uma quantidade pequena de *Salmonella* Enteritidis está presente, mas pode ser subjugada quando altas doses de *Salmonella* Enteritidis estão presentes. O possível papel desempenhado pela limitação de ferro combinado com a presença de anticorpo específico sobre a inibição do crescimento de *Salmonella* Enteritidis no conteúdo de ovos está sendo estudado. A descoberta de que o conteúdo dos ovos de galinhas vacinadas inibiram a multiplicação de *Salmonella* Enteritidis pode significar uma importante aplicação na indústria de ovos. Contudo a produção de ovos contendo anticorpos dura um período curto de oito a dez semanas. Para ser economicamente viável para indústria este tempo deve ser aumentado algumas vezes.

O uso de linhagens de aves resistentes a infecção por *Salmonella* spp. poderia ser um caminho para prevenir tais transmissões (PROTAIS et al., 1996).

A condição do ambiente da granja pode servir com um indicador potencial de que a granja pode produzir ovos contaminados com *Salmonella* Enteritidis, e isso foi usado para determinar as mudanças no regulamento corrente quanto a *Salmonella* Enteritidis (KINDE et al., 1996).

Gast et al., (1997) afirmam que a significativa associação epidemiológica entre a doença humana causada pela *Salmonella* Enteritidis e o consumo de ovos contaminados tornou a detecção de granjas infectadas com *Salmonella* Enteritidis um importante objetivo de saúde pública. Testes para *Salmonella* Enteritidis em frangos foram aplicados tanto para identificar granjas que estão produzindo ou são capazes de produzir ovos contaminados e para determinar a efetividade das

medidas de controle tais como vacinação, sanitização, controle de roedores e biosegurança. Programas para detecção de *Salmonella* Enteritidis em galinhas tipicamente inclui duas sucessivas séries de testes. Uma etapa inicial de pesquisa (usualmente envolvendo tanto uma cultura bacteriológica de amostras do ambiente ou um teste nas aves para produção de anticorpo específico) é usada para identificar granjas correntemente ou previamente expostas a *Salmonella* Enteritidis. Cultura bacteriológica de ovos ou tecidos internos de aves selecionadas é então usada para confirmar uma infecção relevante epidemiologicamente ocorrendo na granja. Os testes de pesquisas para *Salmonella* Enteritidis em frangos são mais úteis, pois podem detectar consistentemente infecção e prever a probabilidade de que galinhas infectadas irão produzir ovos contaminados. Anticorpos para *Salmonella* Enteritidis foram observados em taxas relativamente altas no soro tanto de galinhas infectadas naturalmente como artificialmente. Anticorpos específicos foram detectados com sucesso. Consideram que a amostragem no ambiente claramente proporciona melhores respostas a alguns tipos de perguntas, tais como aquelas que questionam a utilidade das práticas de sanitização para remover a contaminação de *Salmonella* Enteritidis a partir de superfícies nas granjas. Entretanto, para monitoramento da incidência de exposição a *Salmonella* Enteritidis em granjas de galinhas, a amostragem de anticorpos na gema oferece vantagens sobre a amostragem do ambiente. Os ovos podem ser colhidos com menos riscos que aqueles que envolvem vários tipos de amostras ambientais. Além disso, considerando que o processo de pesquisa em amostras ambientais requer mais que uma semana para se obter resultados, o resultado quanto a presença de anticorpos na gema pode ser obtido no mesmo dia em que os ovos são colhidos.

O controle das infecções de *Salmonella* Enteritidis a longo prazo requer um exame da ecologia deste organismo em granjas avícolas e pode depender, no final das contas, de sua eliminação dos lotes, ou da pasteurização de ovos em casca ou líquido (SCHUMAN et al., 1997).

Miyamoto et al., (1997) mencionam que planos estratégicos foram propostos para se prevenir a incidência de surtos de *Salmonella* Enteritidis. Apesar destes esforços, pouco progresso foi alcançado, e casos de salmonelose humana aumentaram através das últimas décadas. Estratégias terapêuticas eficazes para prevenir a infecção por *Salmonella* Enteritidis em galinhas, e por meio disso prevenir a transmissão de *Salmonella* Enteritidis para ovos são urgentemente necessários.

Observam que o estabelecimento de aves completamente livres de *Salmonella* Enteritidis nas granjas é muito difícil por que esta permanece viável no ambiente e granjas naturalmente infectadas não mostram anormalidades clínicas óbvias, não mostram aumento da mortalidade e nem uma diminuição na produção de ovos. A estratégia para se minimizar ou erradicar a produção de ovos contaminados com *Salmonella* Enteritidis deveria ser estabelecida através da análise dos processos pelos quais as galinhas infectadas produzem ovos contaminados.

O Processamento centralizado e a ampla distribuição são as principais características do novo cenário em comparação como o velho cenário onde o processamento era local, doméstico e o consumo intrafamiliar. Os programas de saúde e educação da família são igualmente necessários. Mais esforços para o entendimento da evolução da virulência poderia nos prover com informações sobre as características genéticas e condições ambientais necessárias para se minimizar o risco. A melhoria da detecção permite medidas de controle e prevenção mais efetivos. Oitenta e cinco por cento dos surtos ocorrem por falhas na manipulação em serviços de alimentação ou nas residências (HALL, 1997).

Considerando que a quase totalidade dos custos ocasionados por *Salmonella* Enteritidis terem sido associados ao consumo de ovos, conclui-se que os mesmos tem expressão epidemiológica significativa. Torna-se necessária, portanto, a instituição e a intensificação do controle dos métodos de produção e armazenamento de ovos sob refrigeração logo após a postura até o momento do consumo, além de campanhas de orientação à população quanto à manipulação de ovos e de carnes de aves visando a redução do número de surtos pela *Salmonella* Enteritidis. Conclui-se, ainda, que essa bactéria pode causar doenças graves, sobretudo em pacientes de faixas etárias extremas, o que se revela pela necessidade de grande número de hospitalizações, representando elevados custos econômicos e sociais (PERESI et al. 1998).

Miyamoto et al. (1998) concluem que, desde de que a refrigeração no experimento desenvolvido por eles diminuiu a diferença de temperatura entre o ambiente e os ovos, uma possível explicação para o aumento da penetração em ovos frescos poderia ser a pressão negativa causada pela diferença de temperatura entre o lado interno e externo do ovo. Uma vez que as células de *Salmonella* spp. atravessaram a casca e membranas da casca de ovos postos, é muito difícil prevenir a futura invasão do conteúdo dos ovos pela *Salmonella* spp. e a sua retirada do ovo.

Sugerem que ovos frescos deveriam ser protegidos da exposição a *Salmonella* spp. o mais rápido possível após a postura, que a sanitização dos ninhos é de especial importância e que a refrigeração dos ovos deve ser iniciada logo após a postura. Verificaram que o rápido resfriamento e subsequente estocagem a 7°C protegeu o ovo da penetração de *Salmonella* Enteritidis. Por outro lado, citam outros autores que mostraram que o rápido resfriamento dos ovos foi acompanhado por um aumento do número e a extensão de fissuras microscópicas na casca e que estes ovos resfriados foram mais susceptíveis a penetração por *Salmonella* Enteritidis. Concluem que mais informações sobre os vários fatores que influenciam a penetração de *Salmonella* Enteritidis através da estrutura mais externa do ovo são necessárias para se desenvolver um método mais efetivo para se prevenir a contaminação interna do ovo.

A seleção para resistência a doença em criações de aves poderia ser uma estratégia efetiva na prevenção e controle de algumas doenças infecciosas importantes que afetam estes animais. Limitando a disseminação de patógenos, a seleção para resistência a doenças pode ajudar a prevenir a transmissão dessas doenças para populações humanas (GIRARD-SANTOSUOSSO et al., 1998).

A maioria das propostas de estratégias de redução de risco para reduzir a transmissão de *Salmonella* Enteritidis para humanos tem enfatizado a importância do controle da infecção em lotes de aves de postura (PRESIDENT'S COUNCIL ON FOOD SAFETY, 1999).

No Brasil, a Instrução Normativa nº 22 de 12 de agosto de 1999 (BRASIL, 1999) estabelece as Normas Técnicas para Controle e Certificação de Núcleos e Estabelecimentos Avícolas como Livre de *Salmonella* Gallinarum e de *Salmonella* Pullorum e Livre ou Controlado para *Salmonella* Enteritidis e para *Salmonella* Typhimurium que definem as medidas de monitorização das salmoneloses em estabelecimentos avícolas de controle permanentes e eventuais (exceto postura comercial e frango de corte), que procedam o comércio nacional e internacional de seus produtos, destinados a reprodução e produção de aves e ovos férteis, ficando os mesmos obrigados a procederem a monitorização de seus planteis, obedecendo as diretrizes do Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA). Estabelecem que para se proceder o comércio nacional e internacional, o núcleo ou estabelecimento avícola deverá estar certificado como livre de *Salmonella* Gallinarum e *Salmonella* Pullorum e livre e/ou controlado para *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella*

Typhimurium, que os núcleos dos estabelecimentos de linhas puras, bisavoseiros e avoseiros deverão apresentar-se livres das quatro salmonelas, que os núcleos dos estabelecimentos matrizeiros deverão ter a condição mínima de livre de *Salmonella Gallinarum* e *Salmonella Pullorum* e controlado para *Salmonella Enteritidis* e *Salmonella Typhimurium*. Determinam que, condicionado a apresentação e aprovação pela Delegacia Federal de Agricultura no estado onde se localiza o estabelecimento avícola, de um programa de controle ou erradicação, que ficará sob monitorização, supervisão e acompanhamento da Delegacia Federal de Agricultura e/ou da Secretaria Estadual de Agricultura, os estabelecimentos de exploração de aves silvestres ou ornamentais já instalados, um prazo de 24 meses para alcançarem a condição mínima de livre *Salmonella Gallinarum* e *Salmonella Pullorum* e controlado para *Salmonella Enteritidis* e *Salmonella Typhimurium* e os que vierem a se instalar, a adequação imediata a condição mínima de livre de *Salmonella Gallinarum* e *Salmonella Pullorum* e controlado para *Salmonella Enteritidis* e *Salmonella Typhimurium*.

De acordo com CDC (2000), as medidas de controle nas granjas devem incluir ações resultantes de investigações realizadas e programas de garantia de qualidade (QAP). Quando ovos são incriminados em surtos de *Salmonella Enteritidis*, os departamentos de saúde estaduais e/ou o FDA devem conduzir investigações com o objetivo de identificar a fonte de contaminação nas granjas e conduzir uma amostragem do ambiente dos galpões de criação das aves para se detectar a *Salmonella Enteritidis*. Quando a *Salmonella Enteritidis* é detectada em um galpão, os ovos são desviados voluntariamente para a pasteurização até a análise dos ovos demonstrar resultado negativo para *Salmonella Enteritidis*. Estas investigações tem apresentado sucesso na remoção de potenciais ovos contaminados do mercado. Durante os primeiros anos da década de 90, o USDA, a indústria de ovos, os departamentos de agricultura dos estados e a Academia colaboraram no desenvolvimento do QAP. Elementos devem incluir a compra de pintos de criadores monitorados quanto a presença de *Salmonella Enteritidis*, controle de roedores e insetos, câmara de ovos limpa e desinfetada, rotineira análise do ambiente com o desvio dos ovos para a pasteurização quando *Salmonella Enteritidis* é detectada, e correta refrigeração dos ovos. Treze estados participam de QAP voluntários. Os estados da região nordeste do EUA foram os primeiros a implementar tais QAP. A diminuição dos surtos de *Salmonella Enteritidis* de 61 em

1989 para oito em 1998, e de casos esporádicos na região devem refletir os esforços colaborativos e preventivos. Assegurando que os ovos são vendidos logo após serem produzidos e que eles são mantidos sob refrigeração são importantes etapas na redução de doenças provocadas por *Salmonella* Enteritidis associadas com ovos. Apesar de requerido em 17 estados, não existe lei federal que exija data de validade nas embalagens de ovos. Correntemente o *USDA* exige que os ovos sejam estocados e transportados a temperaturas inferiores a 7,2°C e que as embalagens sejam feitas com a indicação de que a refrigeração é requerida. O regulamento proposto deve ser finalizado em 2000 pelo *FDA*, que também deve requerer que os ovos no comércio varejista sejam refrigerados a temperaturas inferiores a 7,2°C e a educação dos consumidores e manipuladores de alimentos quanto ao estoque, manipulação e cozimento dos ovos adequadamente para prevenir a maioria das infecções por *Salmonella* Enteritidis em humanos. O *FDA* tem uma proposta de regulamento que indica a colocação de mensagens em todas embalagens de ovos quanto a manipulação segura. O código de alimentos do *FDA* para estabelecimentos varejistas, estabelecimentos de alimentação, enfermarias e centros de assistência recomendam que ovos pasteurizados sejam utilizados em substituição a ovos frescos na preparação de alimentos que levam ovos na sua composição e não são aquecidos.

O *FDA* determina que, quando mantidos em estabelecimentos comerciais, ovos em casca devem ser estocados e expostos aos consumidores sob refrigeração à temperatura de 7,2°C ou menos (*FDA*, 2000)

CDC (2000) considera que os surtos descritos neste reporte poderiam ter sido prevenidos se ovos pasteurizados tivessem sido usados ou se os ovos usados nas receitas tivessem sido totalmente cozidos. As recomendações do código de alimentos do *FDA* são especialmente importantes para crianças, idosos, imunodeprimidos e mulheres grávidas que são grupo de risco elevado de complicações severas no caso de infecção por *Salmonella* Enteritidis. A efetividade dessas recomendações e esforços de educação são demonstrados pelo declínio no número de mortes em instituições de assistência e em enfermarias. Indica que futuras reduções na incidência de *Salmonella* Enteritidis e relatos de surtos de *Salmonella* Enteritidis irão requerer múltiplas intervenções durante o percurso do ovo da granja até o consumo. Para marcar as edições sobre a prevenção de *Salmonella* Enteritidis, em 10 de dezembro de 1999, o Presidente do Conselho sobre Segurança

Alimentar anunciou um Plano de Ação sobre segurança de ovos que responde por 50% da redução da ocorrência doença provocada por *Salmonella* Enteritidis associado a ovos. Os objetivos do plano são direcionados para a redução da exposição do consumidor a alimentos contendo *Salmonella* Enteritidis; expandido e melhorando sistemas de inspeção para infecção de *Salmonella* Enteritidis em humanos e aves; melhorando a comunicação entre a federação, estados e agências locais para acelerar a detecção de surtos de *Salmonella* Enteritidis e o início das investigações; desenvolvendo pesquisas; educando as pessoas usando materiais baseados em ciência. Para ajudar a caracterizar casos esporádicos e colaborar com investigações epidemiológicas, recomenda que os isolamentos de *Salmonella* spp. devem ser sorotipadas em laboratórios estaduais de saúde pública. Clínicos e microbiologistas são encorajados a reportar casos de infecção de *Salmonella* spp. para os departamentos locais e estaduais de saúde pública. Quando surtos de *Salmonella* Enteritidis ocorrem, a notificação ao CDC e ao USDA através dos departamentos estaduais de saúde pública promoverá identificação de ovos contaminados e implementação de medidas de controle. Ilustra que surtos podem ocorrer devido falhas no processamento em várias fases na produção de ovos da granja ao consumo. Medidas de prevenção de *Salmonella* Enteritidis incluem programas de controle na granja, refrigeração e educação dos manipuladores e consumidores sobre o preparo e consumo de alimentos, adoção do código de alimentos do FDA em restaurantes e instituições e aumento da vigilância.

Segundo Fiorentin (2000), a Embrapa Suínos e Aves iniciou novo campo de pesquisas no controle de *Salmonella* spp. e *Escherichia coli*. A utilização de bacteriófagos, ou vírus de bactérias, foi testada como um método de controle destas bactérias. Um bacteriófago pode ser dirigido cirurgicamente a uma população bacteriana portadora de um determinado fator de virulência ou antígeno, e somente eliminar o organismo alvo, sem reduzir a população de bactérias da mesma espécie que não possuem este fator. Isto pode criar uma população inofensiva do mesmo organismo até então patogênico, exercendo exclusão competitiva do equivalente patogênico através do Princípio de Nurmi ou conferindo imunidade de rebanho pelos demais antígenos comuns. Em outros casos, um bacteriófago pode eliminar a espécie patogênica como parte de um programa de substituição desta por outra inofensiva e resistente ao bacteriófago, que poderia ser uma vacina atenuada ou um probiótico. A erradicação pura e simples de um patógeno será repensada no futuro

próximo. A visão de que somente poderia ser vantajosa será revisada e possivelmente novas premissas de controle de doenças infecciosas surgirão, como a eliminação de fatores de virulência sem a eliminação completa do patógeno. Visões menos particularizadas e mais holísticas começarão a ser mais empregadas em função de experiências com o caso da *Salmonella* Enteritidis aqui relatado.

Okamura et al., (2001) discute que devido a *Salmonella* Enteritidis ser o sorovar de *Salmonella* spp. predominante em ovos contaminados, presume-se que possua uma vantagem seletiva sobre outros sorovares na afinidade por ovos postos e trato reprodutivo. Entendendo os fatores específicos da *Salmonella* Enteritidis envolvidos no processo de contaminação do ovo deve ser útil para minimizar ou erradicar salmoneloses humanas causadas por ovos contaminados por *Salmonella* Enteritidis. Consideram que outros estudos sobre os mecanismos de adesão da *Salmonella* Enteritidis ao epitélio vaginal de aves são necessários para prevenir ou erradicar salmoneloses humanas devido ao consumo de ovos contaminados com *Salmonella* Enteritidis.

Gast e Holt (2001) analisam que a efetividade potencial da maioria das medidas de controle depende de se ter um verdadeiro entendimento dos processos biológicos essenciais para a contaminação dos ovos postos sistematicamente por aves. Uma importante instancia dessa preocupação generalizada é a maneira de como a distribuição espacial da deposição da *Salmonella* Enteritidis no interior do ovo afeta o resultado dos esforços para aplicação da refrigeração com o objetivo de restringir a multiplicação bacteriana. Além disso, a maioria das evidências disponíveis sugere que a contaminação do ovo com *Salmonella* Enteritidis tipicamente envolve relativamente um número inicial pequeno de células bacterianas, talvez dependendo de qual região do trato reprodutivo está colonizada pelo patógeno. Apesar de ocorrer uma muito baixa multiplicação bacteriana no albúmem, *Salmonella* Enteritidis pode persistir neste local quando submetido a temperaturas suportáveis. Contudo, a gema pode suportar um rápido e extensivo crescimento de *Salmonella* Enteritidis, especialmente em temperaturas de estocagem superiores a 20°C. Citam que a refrigeração dos ovos durante o transporte e estocagem a uma temperatura de 7°C foi proposta e instituída com o objetivo de prevenir que os baixos níveis iniciais de contaminação por *Salmonella* Enteritidis se multipliquem até níveis de risco para determinar enfermidade de origem alimentar em humanos. Contudo, tecnologias convencionais de refrigeração

podem requerer alguns dias para baixar a temperatura interna do ovo suficientemente para restringir o crescimento bacteriano. Apesar desse período de resfriamento determinar poucas conseqüências adversas se a *Salmonella* Enteritidis permanece no albúmem, a deposição inicial de *Salmonella* Enteritidis na gema ou subsequente penetração na gema poderia permitir a multiplicação até alcançar níveis perigosos durante os primeiros estágios da refrigeração. Sendo assim, a determinação do local onde a *Salmonella* Enteritidis é depositada no ovo e se a extensão é suficiente para conseguir a penetração e alcançar a gema, são aspectos críticos no desenvolvimento e aplicação de padrões efetivos de refrigeração de ovos. Consideram que o local de deposição da *Salmonella* Enteritidis no conteúdo de ovos e o potencial para movimentação para outras partes pode determinar se uma multiplicação significativa pode ocorrer antes de se alcançar níveis de temperaturas de refrigeração suficientes, no interior do ovo, para restringir os níveis de multiplicação. A deposição no interior da gema, como mostrada neste trabalho, e em outros, pode resultar em uma rápida multiplicação levando a elevados níveis de células. Citam que alguns trabalhos prévios sugerem que o movimento bacteriano do albúmem até a gema é incomum durante a primeira semana de incubação, mas a migração mais rápida pode ocorrer em níveis iniciais de bactéria mais elevados e em temperaturas de incubação mais mornas. Concluem que devido a *Salmonella* Enteritidis ser raramente depositado no interior de ovos, e porque a penetração de *Salmonella* Enteritidis através da membrana da casca ocorrer lentamente a baixas temperaturas, a imediata refrigeração de ovos deve minimizar as oportunidades de rápida multiplicação bacteriana através do consumo dos nutrientes da gema. No entanto, a deposição ocasional de *Salmonella* Enteritidis em ou sobre a gema, representa um risco potencial elevado se a temperatura interna do ovo não é reduzida rapidamente de modo suficiente. Informam que cálculos de risco tem estimado que aproximadamente 3,2 milhões de ovos contaminados com *Salmonella* Enteritidis devem ser produzidos anualmente nos EUA. Igualmente, se somente uma muito pequena percentagem desses casos envolvem a deposição na gema, dezenas ou centenas de milhares de ovos podem estar aptos a suportar um rápido crescimento bacteriano durante os primeiros estágios das práticas correntes de refrigeração. Recentes inovações nos processos de refrigeração de ovos incluem o uso de gases criogênicos, circulação forçada de ar e embalagens modificadas,

oferecem esperança de que um controle de temperatura mais rápido durante a estocagem de ovos deve estar brevemente disponível.

A legislação sanitária na Polônia recomenda o aquecimento dos ovos de patos, gansos e perus por nove minutos e quando salmoneloses são detectadas, esses ovos não podem ser vendidos para consumo (RADKOWSKI, 2001).

Hara-Kudo et al. (2001b), consideram que uma das medidas práticas e efetivas para redução do risco associado com a contaminação interna deve ser o controle do crescimento no conteúdo dos ovos durante a estocagem. Alguns pesquisadores mencionam que o número de *Salmonella* Enteritidis no conteúdo do ovo se mantém abaixo de 20 ufc / ovo por 21 dias de estocagem a 20°C após a postura, após isso *Salmonella* Enteritidis pode se multiplicar rapidamente até concentração de 10.000 a 100.000 ufc / ovo em alguns ovos. Além disso, o período de tempo entre o início do rápido crescimento e a postura do ovo tem se mostrado menor com o aumento da temperatura de estocagem indicando a importância do período de tempo e a temperatura de estocagem do ovo para a prevenção do crescimento de *Salmonella* Enteritidis no conteúdo dos ovos. Contudo, pouco se sabe sobre o efeito de outros fatores além do tempo e temperatura de estocagem sobre o crescimento de *Salmonella* Enteritidis no conteúdo de ovos. Para se entender o efeito da estação e fraturas na casca sobre o crescimento de *Salmonella* Enteritidis no conteúdo de ovos, estudaram o crescimento da *Salmonella* Enteritidis no albúmem de ovos intactos e com a casca danificada em ovos postos em diferentes estações. Utilizaram a habilidade do albúmem em facilitar a multiplicação da *Salmonella* Enteritidis de menos de 20 para 100 ou mais como um indicador das condições do albúmem em ovos. Observaram que a *Salmonella* Enteritidis cresce menos frequentemente no albúmem de ovos em casca estocados a 10°C do que a 20°C e 30°C em qualquer estação do ano. A proporção dos ovos em que o albúmem facilita a multiplicação da *Salmonella* Enteritidis até um nível detectável diminui sensivelmente durante os primeiros estágios da estocagem, indicando que o albúmem do ovo entra na fase menos favorável a multiplicação da *Salmonella* Enteritidis durante os primeiros estágios após a postura. Depois a proporção aumenta com o tempo de estocagem dependendo da temperatura de estocagem. Observou-se que a *Salmonella* Enteritidis pode crescer melhor no albúmem de ovos rachados do que no albúmem de ovos intactos, indicando que as condições de estocagem devem ser consideradas com mais intensidades para ovos rachados do

que para ovos intactos no que se refere a habilidade do albúmem a suportar a multiplicação da *Salmonella* Enteritidis. Do mesmo modo, as diferenças na habilidade do albúmem em facilitar o crescimento da *Salmonella* Enteritidis pode indicar que ovos em casca postos em estações com temperaturas elevadas devem ser consumidos com mais rapidez do que aqueles postos em outras estações.

Um importante papel dos laboratórios de saúde pública é contribuir na inspeção de salmoneloses através da informação sobre a sorotipagem de *Salmonella* spp., que se constitui em uma importante etapa inicial na caracterização detalhada de cepas de *Salmonella* spp. (TAVECHIO et al., 2002).

Messens et al. (2002) desenvolveram um estudo que teve como objetivo avaliar a manipulação de ovos em casca e ovos processados, adquiridos para serem servidos para pessoas vulneráveis em instituições tais como instituições de caridade, hospitais e creches. Destas, 49% compram somente ovos em casca, 45% adquirem tanto ovos em casca como produtos de ovos e apenas 6% adquirem somente produtos de ovos. Caminhão refrigerado é usado no transporte de ovos em casca e produtos de ovos em todos os hospitais pesquisados, em 95% das instituições de caridade e em 44% das creches. Em 97% das instituições a quantidade é checada. Em 84% o prazo de vida de prateleira é observada e em 58% a temperatura e a aparência dos ovos é verificada. O controle da temperatura é necessária por que o resfriamento por si só não é suficiente para controlar a multiplicação da *Salmonella* Enteritidis. Uma pequena fração das instituições declararam controlar a limpeza, preço, embalagem e consistência do albúmem. Setenta e três por cento das instituições não controlam microbiologicamente os ovos e produtos de ovos. Quando problemas ocorrem a qualidade microbiológica é controlada em 23% das instituições. Na maioria das instituições (85%), os ovos são estocados na embalagem, sendo que em 75% em refrigerador ou câmara frigorífica (2 – 7°C com média de 4.1°C). Em 15% das instituições, os ovos são estocados em câmaras resfriadas (8°C – 17°C com média de 18°C) e a temperatura ambiente entre 16 – 20°C com média de 18°C em 10% das instituições. Em comparação com a conservação a nível doméstico, nas instituições os ovos são estocados a baixas temperaturas. Mas é importante frisar, contudo, que em 25% das instituições os ovos são estocados a temperaturas superiores a 10°C permitindo a multiplicação da *Salmonella* Enteritidis. O período de estocagem médio foi de uma a duas semanas em 48% das instituições. Em 34% das instituições o período médio é de sete dias.

Em 8% são mantidos por duas a três semanas. Em 5% são mantidos por mais de três semanas. Para melhor conservação da qualidade do ovo o período de conservação não deve ser superior a sete dias. Consideram que para minimizar os riscos, particularmente para grupos de pessoas vulneráveis, os conselhos emitidos pelo governo Belga deveriam ser seguidos; 1º ovos frescos deveriam ser aquecidos até a clara e a gema estarem sólidas; 2º Alimentos contendo ovos frescos deveriam ser feitos usando ovos pasteurizados e resfriados após a preparação; 3º Alimentos ligeiramente aquecidos que contenham ovos deveriam ser evitados particularmente pelas pessoas vulneráveis; 4º Maionese comercialmente produzida, feita com produtos de ovos pasteurizados, deveriam ser usados ao invés de maionese caseira; 5º Ovos frescos deveriam ser estocados em refrigerador por no máximo três semanas; 6º Somente ovos muito frescos podem ser usados para preparações frias; 7º Ovos devem ser quebrados em recipientes diferentes dos usados na preparação de alimentos; 8º Resíduos de clara devem ser refrigerados e usados até 24 horas; 9º As mãos devem ser lavados após a manipulação de ovos frescos; 10º Ovos com a casca danificada não devem ser usados.

No Reino Unido houve uma grande redução no número de reportes de incidentes de *Salmonella* Enteritidis em aves e pessoas desde que se melhorou a biosegurança através de medidas de higiene e vacinação na maioria de aves de postura comercial e frangos que foram introduzidos na indústria de aves nos meados dos anos 90. Existe ainda, no entanto, algumas granjas de postura comercial onde *Salmonella* Enteritidis persiste, e nestas granjas uma pequena proporção de ovos produzidos podem tornar-se contaminados com *Salmonella* Enteritidis durante a sua formação no ovário ou na sua passagem através do oviduto, ou pela passagem de células para o interior do ovo frio após a postura. Para tentar reduzir a escala de infecção na indústria de aves uma vacina comercial inativada, a qual mostrou proporcionar alguma proteção em modelos laboratoriais, foi introduzida voluntariamente em lotes de criação em 1994 e em lotes de postura em 1998, como parte das exigências estabelecidas pelo Conselho Britânico de Industrias de Ovos. A redução na proporção tanto das amostras fecais como não fecais infectadas com *Salmonella* Enteritidis nas granjas vacinadas sugere que a vacina teve um efeito positivo na maioria das granjas. De uma maneira geral as pesquisas tem mostrado resultados que demonstram alguma redução na infecção, mas não uma proteção absoluta. Um efeito aditivo pode ser obtido quando a vacinação é combinada com

um tratamento de exclusão competitiva. Se poucas células de *Salmonella* Enteritidis estão presentes nas fezes de aves de granjas vacinadas é mais difícil detectar uma infecção através de uma cultura bacteriana. Porém, a presença nas fezes e a contaminação de ovos podem aumentar durante períodos de stress. Uma complicação devido a vacinação contra *Salmonella* spp. é a produção de anticorpos circulantes que não podem ser facilmente diferenciados daqueles que são resultado de uma infecção. A detecção de *Salmonella* spp. através de cultura bacteriana, particularmente a partir de ovos, é muito dependente de uma amostragem efetiva e dos métodos de cultura. É desejável que se obtenha uma vacina que produza uma resposta sorológica que possa ser facilmente distinguida de uma infecção. É possível também eliminar a *Salmonella* spp. somente através de eficientes métodos de limpeza e desinfecção. Entretanto, existe um risco de que a infecção possa ser reintroduzida a partir da área externa do estabelecimento e sendo assim a vacinação é recomendada para reduzir o risco (DAVIS; BRESLIN, 2003a).

Davis e Breslin (2003b), baseando-se em informações de pesquisadores, concluem que é importante que a limpeza, desinfecção e controle de insetos e roedores sejam executados efetivamente para minimizar as chances de infecção entre granjas, e que as amostragens feitas após a limpeza e desinfecção sejam suficientemente sensíveis para se detectar qualquer contaminação, para que melhorias possam ser desenvolvidas. Realizaram uma intensiva amostragem para pesquisa de *Salmonella* spp. antes e após os procedimentos de limpeza e desinfecção em uma série de granjas de postura como o objetivo de discutir as opções de melhoria. Os resultados obtidos indicam que existem problemas com a desinfecção das gaiolas nas granjas de postura. Isso pode ser explicado pela elevada densidade populacional mantida nas granjas, que tem como resultado a produção de grande volume e material fecal contaminado dificultando a eficiência da limpeza dentro e fora das gaiolas.

Segundo Davis e Breslin (2003a), baseando-se em informações de pesquisadores, a persistência de *Salmonella* spp., particularmente a *Salmonella* Enteritidis na indústria de ovos é um problema significativo que pode somente ser parcialmente controlado através dos programas correntes de vacinação. Maior interação é necessária entre a indústria e os microbiologistas e epidemiologistas para se definir um programa efetivo para se maximizar a detecção de *Salmonella* spp. nas granjas de postura e eliminar esta bactéria em infecções preexistentes

persistentes. Um treinamento mais eficiente na correta aplicação das medidas de higiene também é necessário porque os métodos correntes de treinamento são falhos. Seria desejável também que os ovos provenientes de granjas infectadas deveriam ser desviados para a indústria de produtos de ovos ou pasteurização em casca, se os processadores puderem ser persuadidos a aceitar ovos provenientes de granjas infectadas.

CDC (2003) considera que para alcançar um decréscimo sustentável da infecção por *Salmonella* Enteritidis associada com ovos, um esforço conjunto de prevenção é necessário das granjas até o consumo. O fator chave nesse esforço é a implementação de medidas para reduzir a contaminação dos ovos com *Salmonella* Enteritidis nas granjas durante a produção. A implantação de tal programa de controle nos estados da região nordeste dos EUA no início dos anos 90, deve ter contribuído para a subsequente diminuição dos níveis de isolamento de *Salmonella* Enteritidis em humanos nas regiões da Nova Inglaterra e Meio Atlântico. Uma importante medida de controle é o teste microbiológico nas granjas para verificar a presença de *Salmonella* Enteritidis. Se a *Salmonella* Enteritidis é encontrada no teste de rotina do ambiente, os ovos devem ser desviados para a pasteurização. Evidências sugerem que a implementação e a supervisão de programas de controle em granjas pode resultar em uma redução da infecção por *Salmonella* Enteritidis entre lotes em granjas. A participação das granjas nos programas de controle de *Salmonella* Enteritidis correntes é voluntária, e os componentes dos programas variam. Futuras medidas de segurança para ovos em casca devem incluir uma maior participação dos testes microbiológicos nos programas de controle nas granjas. Considera que a expansão nas medidas de prevenção de *Salmonella* Enteritidis será um importante esforço para prevenir a infecção por *Salmonella* Enteritidis no sudoeste dos EUA. Isso inclui um ativo incentivo às granjas para participarem dos programas de controle de *Salmonella* Enteritidis, incentivo da refrigeração dos ovos durante o estoque e transporte, e a educação dos manipuladores e consumidores sobre a preparação de alimentos. Estabelece recomendações para prevenção da infecção por *Salmonella* Enteritidis associada com ovos. Para produtores de ovos: As granjas devem estar baseadas no programa de controle de *Salmonella* Enteritidis que inclui teste microbiológico de rotina que deve ser adotado e implementado pela indústria em todo o país; Para o varejo e estabelecimentos de serviços de alimentação: No varejo e serviços de alimentação, produtos de ovos pasteurizados

ou ovos em casca pasteurizados são recomendados ao invés de ovos frescos ou mal cozidos. Se usados ovos frescos estes devem ser totalmente cozidos. Em hospitais, enfermarias e asilos de idosos, devem ser usados produtos de ovos pasteurizados ou ovos em casca pasteurizados; Ovos devem ser comprados ou recebidos de um distribuidor, refrigerados ou estocados sob refrigeração a temperaturas inferiores a 7°C o tempo todo; Para os consumidores: Evitar o consumo de ovos frescos ou mal cozidos principalmente por crianças, idosos, imunodeprimidos e doentes; Os ovos devem ser cozidos até que a gema e a clara estejam firmes e devem ser consumidos logo após o cozimento; Mãos, utensílios e superfícies de contato devem ser lavadas com sabão e água após contato com ovo fresco; Os ovos devem ser comprados ou recebidos no mercado ou distribuidor refrigerados e estocado sob refrigeração abaixo de 7°C. Considera que, teoricamente, a análise microbiológica de ovos provenientes de granjas infectadas com *Salmonella* Enteritidis poderia fornecer uma melhor estimativa do risco que esta granja representa para o consumidor de ovos. No entanto, mesmo com os dados das análises microbiológicas, somente o risco de exposição do consumidor pode ser calculado (por exemplo, a média do número de exposições a ovos contaminados com *Salmonella* Enteritidis per capita). É provável que exposições mais casuais não produzam significativo quadro clínico, porque a dose ingerida, a susceptibilidade do hospedeiro (ingestor) e as práticas de preparação do alimento também representam importante papel. Considera que o total da diminuição da incidência de *Salmonella* Enteritidis e diminuição do número de doentes relacionados com surtos de *Salmonella* Enteritidis relacionados a ovos durante a última década deveria ser atribuída em parte a implementação de medidas preventivas, incluindo os programas de controle na granja, refrigeração dos ovos, e a educação dos consumidores dos alimentos além do manipuladores. No entanto os casos reportados não declinaram durante o período de 1999 até 2001, e surtos associados com ovos em casca continuam a ocorrer.

Todos os ovos em casca provenientes de granjas comerciais de postura devem estar livres de *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium. O controle de granjas de postura na Dinamarca é essencialmente idêntico ao programa de controle para granjas de frangos. Sangue e amostras de fezes das granjas são testados e os infectados são eliminados. Todas as granjas comerciais são testadas rotineiramente a cada nove semanas através de uma combinação de teste

sorológico da gema e bacteriológico do ambiente. Todos os ovos produzidos em granjas suspeitas ou confirmadamente positivas são pasteurizados. Todos os ovos em casca são distribuídos em cadeia de frio não excedendo a 12°C e mantidos refrigerados no comércio e os ovos geralmente são refrigerados nas residências. A proporção de granjas infectadas com *Salmonella*, notavelmente a *Salmonella* Enteritidis diminuiu marcadamente desde o início do programa de controle (WEGENER et al., 2003).

Segundo Jones et al. (2003), desde a implementação do Programa de redução de patógenos estabelecido pelo *FDA*, os regulamentos de segurança alimentar nas indústrias de carnes e aves vem se alterados intensamente. Durante o mesmo período os regulamentos para ovos em casca e processamento de ovos alteraram muito pouco. A abordagem do tipo “farm to fork” para a segurança alimentar tem recebido considerável atenção nos últimos anos como o método mais completo para assegurar a segurança do suprimento nacional de alimentos. Desde de que a *Salmonella* Enteritidis pode ser depositada em ovos intactos por aves de postura infectadas, a segurança alimentar não é completamente responsabilidade do processador. Por essa razão, o Serviço de Inspeção e Segurança Alimentar do *USDA* e o *FDA* estão trabalhando para desenvolver novos regulamentos baseados no *FDA* para um plano de segurança alimentar completo da produção até o consumo para ovos em casca e para indústrias processadoras de ovos.

Gast et al., (2003) consideram que o controle das infecções por *Salmonella* Enteritidis em granjas de postura tem se tornado um alicerce da maioria das estratégias propostas para reduzir o risco de transmissão da doença. Analisam que a produção de ovos contaminados por aves experimentalmente infectadas tem algumas aplicações para avaliação do potencial das opções de controle da doença. Experimentalmente a indução da contaminação do ovo pode ser usada para determinar a relevância prediativa de outros parâmetros mensuráveis, tais como liberação nas fezes ou resposta de anticorpos, para detecção de infecções por *Salmonella* Enteritidis em granjas de postura, para caracterizar aspectos qualitativos ou quantitativos da deposição de *Salmonella* Enteritidis em ovos para em seguida desenvolver padrões efetivos de refrigeração dos ovos, e avaliar a eficácia de práticas preventivas tais como vacinação. Mas a utilidade dos modelos de infecção experimental para estes objetivos depende imensamente da verdadeira frequência de contaminação de ovos que estes modelos geram, o que é dificultado pelo fato da

detecção eficiente da contaminação do ovo ser complicada devido a muito pequena quantidade inicial de células de *Salmonella* Enteritidis que são tipicamente encontradas em ovos frescos postos por aves tanto naturalmente quanto artificialmente infectadas. Além disso, a manipulação e estocagem das culturas de *Salmonella* Enteritidis isoladas em laboratório pode atenuar suas capacidades de contaminação dos ovos.

Mumma et al. (2004) examinaram a correlação entre as alterações anuais na incidência de *Salmonella* Enteritidis em humanos e a introdução do Programa de Garantia da Qualidade do Ovo em alguns estados para reduzir a contaminação por *Salmonella* Enteritidis em ovos. A análise de regressão demonstrou que a cada 1% de aumento do número de ovos produzidos sob o programa de qualidade foi associado com 0,14% de diminuição na incidência de *Salmonella* Enteritidis. Estes dados indicam que o programa provavelmente representou um papel maior na redução das DTA nestes estados.

Messens et al. (2004), com base nos resultados obtidos em um experimento, afirma que as práticas de resfriamento são indicadas para serem procedidas de forma rápida após a postura, para prevenir a multiplicação da *Salmonella* spp. nos ovos, mesmo quando o albúmem se torna contaminado. Próximo a temperatura ambiente a probabilidade de uma multiplicação é muito alta quando o albúmem de um ovo fresco no lugar de um estocado é contaminado com *Salmonella* spp. De acordo com os resultados na avaliação do crescimento de *Salmonella* spp. no albúmem pode-se deduzir que a perda de nutrientes ou alguns fatores da gema negando as propriedades inibitórias do albúmem possivelmente não ocorre durante um período de três semanas de estocagem a 20°C embora não se tenha obtido evidência direta disso.

O consumo de ovos é fundamental para uma boa alimentação quando feito de forma equilibrada e segura. A Associação Paulista de Avicultura (ASSOCIAÇÃO PAULISTA DE AVICULTURA, 2005) alerta que o consumidor deve ficar atento desde a hora da compra até o momento de ingerir o alimento. Os ovos com a casca trincada e que não estejam armazenados em locais arejados e limpos devem ser evitados. Ao chegar em casa, devem ser guardados sempre na geladeira e têm de ser lavados com esponja macia, sabão e água antes de usados. O ideal é que o ovo seja muito bem frito, cozido ou assado, até que a gema e a clara fiquem bem duras, antes de ser consumido. Essas medidas são importantes para evitar a ocorrência da

salmonelose doença causada pela bactéria *Salmonella* Enteritidis cujos sintomas mais comuns são diarreia, náusea, vômito, cólica e febre. No caso da maionese caseira, o preparo com a gema cozida é a forma mais segura. Quando são feitos alimentos em grande quantidade, é recomendado o uso de ovo pasteurizado. O consumidor também não pode esquecer de verificar o prazo de validade e não deve reutilizar as embalagens. Quanto ao comércio de ovos, a Associação Paulista de Avicultura afirma que os comerciantes devem armazenar o produto sobre estrados e longe de fontes de calor. Devem ser empilhadas, no máximo, seis caixas de ovos, para evitar que eles se quebrem ou trinquem, o que pode causar contaminação. O alimento deve estar protegido de poeira, moscas e roedores. Quem trabalha com a venda do alimento também não deve reaproveitar as embalagens. A União Européia está estudando a adoção da vacinação para o controle das *Salmonella* spp. De acordo com a pesquisadora alemã Heike Scharr, as discussões não estão em torno apenas da *Salmonella* Enteritidis e da Typhimurium, mas de todas com importância relevante para a saúde humana. Em 2008 a União Européia passa a exigir que todos os ovos sejam testados contra a *Salmonella* spp. antes de serem comercializados e, no ano seguinte, isto deverá ser feito com as carnes também. Isto deve trazer diversas mudanças no processo produtivo e tem encontrado reações diversas nos países europeus. "Há muitas regulamentações e comissões que querem dar sua própria avaliação", destaca Heike. Citando o exemplo da França, ela comenta que o licenciamento deste tipo de vacina só pode ser feito após testes de campo no próprio país, não aceitando, por exemplo, testes realizados na Alemanha. A pesquisadora destacou em sua palestra que a cepa vacinal não se transmite por meio dos ovos e a vacinação dá uma proteção para o restante da vida da ave. A aplicação deve ser em três doses - poedeiras e matrizes - e é feita na água de bebida, o que diminui custos e manejo. "A grande vantagem é que a ave constrói a sua própria proteção e não tem problemas com resíduos", afirmou. Para a avicultura dois tipos de *Salmonella* spp. causam problemas às aves: a Pullorum e a Gallinarum. Mas a Typhimurium e a Enteritidis transmitida via ovo, principalmente, possuem um impacto na atividade porque são agentes de zoonoses. A contaminação em humanos se dá pela ingestão de alimentos contaminados. A gravidade dos casos varia conforme a sensibilidade do indivíduo e do número de bactérias que o infectaram (APINCO, 2005).

Há uma necessidade em prevenir a colonização intestinal por *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium em aves recém-nascidas. O tratamento com uma microbiota bacteriana indefinida não é aceitável pelas instituições reguladoras em alguns países, devido ao risco de transmitir patógenos. Uma cultura definida com potencial e estabilidade equivalente àqueles das culturas indefinidas ainda não foi desenvolvida. Desde que vacinas atenuadas de *Salmonella* spp. possam ter as características de colonização, mas não a virulência dos tipos selvagens de *Salmonella* spp., elas poderiam inibir a colonização dos organismos de desafio (METHNERA et al., 2005).

2.3 PASTEURIZAÇÃO

2.3.1 Aspectos básicos

Segundo Jay (1994a) a pasteurização mediante o uso de calor implica na destruição de todos os microrganismos patogênicos, assim como na destruição ou redução daqueles que provocam a deterioração.

Entende-se por pasteurização o tratamento térmico que destrói parte dos microrganismos presentes, mas não todos eles. É realizada a temperaturas abaixo de 100°C, e é empregada quando os tratamentos térmicos mais elevados danificam a qualidade do produto; quando um dos objetivos é a destruição de germes patogênicos ou quando os agentes de alteração mais importantes não são muito termorresistentes (FELLOWS, 1994).

Cunningham (1995) explica que o objetivo deste processo nos produtos de ovos inicialmente foi assegurar a ausência de qualquer bactéria patogênica nos produtos de ovos, mas em 1970, uma determinação do FDA especificou no regulamento de inspeção de produtos de ovos que todos os produtos de ovos deveriam ser produzidos livres de *Salmonella* spp. através de processos adequados de pasteurização. Afirma que normalmente menos de 1% das bactérias em produtos frescos de ovos resistem à pasteurização. Sendo os principais gêneros encontrados em produtos pasteurizados de ovos: *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Proteus*, *Escherichia*, *Flavobacterium*, assim como cocos Gram positivos. Considera que as alterações nos produtos de ovos provocadas pelo aquecimento são as principais preocupações tanto para o processador quanto para os usuários. Os produtos não devem ser somente microbiologicamente seguro, mas também devem funcionar

satisfatoriamente. Considera também que, com base em vários pesquisadores, a desnaturação e o prejuízo na performance das propriedades do ovo ocorrem em função do tempo e temperatura de processamento. Foi citado consistentemente que o aquecimento do albúmem a temperaturas de 54°C a 60°C prejudica as propriedades de formar espuma. As alterações macromoleculares na ultraestrutura do albúmem foram estudadas com microscópio eletrônico após pasteurização e as alterações foram caracterizadas pela formação de densas aglomerações irregulares de aproximadamente 0,1µm de diâmetro, que se tornam mais numerosas e densas com a extensão do tempo de aquecimento. A desnaturação, como indicada pela alteração na viscosidade, foi citada como acontecendo na faixa de temperatura entre 56°C e 66°C. Acima dessa faixa, precipitação fracionada das proteínas ocorre sendo que coagulação ocorre rapidamente em temperaturas acima de 73°C. Somente a γ -livetina é levemente afetada. Temperaturas elevadas progressivamente alteram estas proteínas até elas não serem detectadas na eletroforese. A lipovitelina e a fosfoviteína são similarmente afetadas pelo aumento da temperatura. Com o aquecimento na faixa de e 57°C até 87°C por 3,5 minutos, a levitina e algumas globulinas foram as mais termosensíveis, enquanto a conalbumina e a ovoalbumina foram as mais estáveis. Indica que as diferenças na composição dos vários produtos de ovos justificam a grande variação nas condições de pasteurização recomendadas. Os diferentes teores de sólidos totais (gema 45-48% e clara 12%) e, por conseqüência, a presença de água, são fatores que diferenciam a termorresistência. A gordura da gema tem algum efeito protetor e as proteínas biologicamente ativas da clara podem auxiliar na pasteurização desta.

É bem sabido que o albúmem é desnaturado termicamente a temperaturas inferiores aquelas necessárias para provocar o mesmo fenômeno na gema e que as células bacterianas na gema são usualmente mais termorresistentes que as mesmas no albúmem (STADELMAN et al., 1996).

2.3.2 Pasteurização do ovo em casca

Roberts¹⁶ (1991), apud Blackburn et al. (1997), afirma que a inativação de patógenos infecciosos não formadores de esporo usando tratamento térmico é considerado um ponto crítico de controle na preparação segura de muitos alimentos.

¹⁶ ROBERTS, D. Sources of infection: Food. In: WAITES, W.M.; ARBUTHNOTT, J.P. *Foodborne Illness*. London, 1991. p.31-37.

Processamento insuficiente, aquecimento ou reaquecimento são freqüentemente fatores que contribuem para a ocorrência de surtos de intoxicação alimentar.

Barrow (1993) discute várias possibilidades para a redução da incidência de doença transmitida por alimento causada por *Salmonella* Enteritidis, mas não incluem a pasteurização de ovos em casca por não haver literatura sobre este assunto.

Durante os anos quarenta e cinqüenta, o tratamento térmico de ovos em casca para prevenir crescimento de embriões em ovos férteis, reduzir a incidência de deterioração durante longo armazenamento e manter qualidade interna receberam atenção considerável de pesquisas (STADELMAN, 1995).

Para que qualquer processo mínimo de pasteurização seja efetivo, a carga bacteriana inicial deve ser mínima (STADELMAN et al., 1996).

Segundo Hou et al. (1996), existem alguns métodos de conservação e sanitização de ovos em casca tais com lavagem, resfriamento rápido, irradiação e tratamento Ultra-sônico, mas segundo alguns autores eles não destroem *Salmonella* spp. as quais se localizam no interior do ovo.

Stadelman et al. (1996) descrevem que os requerimentos mínimos para a pasteurização de produtos de ovos líquidos foram extensivamente pesquisados nos anos 60. Afirmam não terem localizado nenhuma literatura relativa a pasteurização de ovos em casca. Consideram como uma possível explicação para isso o fato de que os ovos intactos até o momento da produção eram considerados estéreis. Descrevem que em meados dos anos 80, ocorreram citações de infecção ovariana com *Salmonella* Enteritidis e a deposição de *Salmonella* Enteritidis no ovo durante a sua formação. Tentativas para se eliminar *Salmonella* Enteritidis de granjas de postura não foram completamente efetivos. Por essa razão a possibilidade de aplicação dos princípios de pasteurização de produtos de ovos líquidos em ovos em casca intactos foi investigada.

Os tratamentos de pasteurização pesquisados por Stadelman et al. (1996) constaram de aquecimento de ovos em casca em água quente, ar quente ou com microondas seguido por uma variedade de tempos de manutenção. A redução de unidades formadoras de colônias de uma cepa estreptomicina resistente foi determinada. Trabalhando com ovos não inoculados e que foram submetidos a vários tratamentos de pasteurização, avaliaram as alterações na qualidade interna e funcional do ovo. Para a qualidade interna mediu-se a Unidade Haugh e o índice da

gema. As únicas qualidades funcionais avaliadas foram o volume e estabilidade da espuma do albúmem. Os ovos inoculados com *Salmonella* Enteritidis foram mantidos a 55°C – 57°C por vários períodos de tempo após o aquecimento. Alguns procedimentos e tempos de manutenção e condições foram avaliados quanto a sua letalidade contra as células de *Salmonella* Enteritidis inoculadas e na estabilidade da espuma do albúmem dos ovos pasteurizados.

Hou et al. (1996) desenvolveram um processo para pasteurização delicada de ovos em casca com o objetivo de destruir *Salmonella* Enteritidis usando processos de aquecimento em imersão e em câmara com ar quente, e investigaram as propriedades funcionais dos ovos pasteurizados. Pesquisaram a radiação ionizante (6 kGy), e observam que esta diminui a qualidade dos ovos.

Serrano et al. (1997), pesquisando a utilização de radiação ionizante no tratamento de ovos em casca concluem que uma dose de 1,5 KGy deve ser suficiente para eliminar a *Salmonella* Enteritidis dos ovos. Com base no valor D calculado, uma dose mínima de 0,5 KGy seria suficiente para eliminar a *Salmonella* Enteritidis da superfície de ovos inteiros e uma dose de 1,5 KGy seria suficiente para eliminar a *Salmonella* Enteritidis do conteúdo de ovos.

Schuman et al. (1997) avaliam o potencial de inativação da *Salmonella* Enteritidis a 57°C e 58°C por imersão em água e os efeitos deste tratamento com relação a funcionalidade do albúmem e atributos de qualidade interna dos ovos, em ovos em casca frescos e intactos.

Kuo et al. (1997) avaliam a eficácia da radiação ultravioleta na redução da contaminação na superfície da casca do ovo e a dosagem de radiação ultravioleta apropriada para reduzir a carga bacteriana a níveis aceitáveis. O estudo indica que a radiação ultravioleta é efetiva na redução de ufc de *Salmonella* Typhimurium tanto no Ágar em placa como na superfície da casca de ovos na mesma forma na redução de mofo e leveduras no ágar em placa como na superfície da casca de ovos. Sendo assim, concluem que a radiação UV pode ter potencial como um sanitizante de casca de ovo. No entanto observam que o efeito sobre a superfície lisa do ágar foi maior que na superfície rugosa da casca do ovo; as bactérias nos poros da casca podem não serem suficientemente expostas à luz ultravioleta. Sugerem que outras pesquisas devem ser desenvolvidas no sentido de se desenvolver um método que aumente a exposição do ovo a luz ultravioleta promovendo a eliminação das bactérias presentes nos poros.

Himathongkham et al. (1999) citam que mergulhando ovos em água fervendo por três segundos resulta na completa destruição de *Salmonella* Enteritidis na casca e membranas, mas as vezes causa rachaduras nos ovos.

Em 1999, o *President's Council on Food Safety* anunciou um plano para eliminar doença por *Salmonella* Enteritidis transmitida por ovos. O plano estabelece duas estratégias inter-relacionadas para se alcançar o objetivo. Uma delas é identificar tratamentos letais que possam ser aplicados aos ovos e produtos de ovos para destruir qualquer *Salmonella* Enteritidis que possa estar presente nos ovos. Existem padrões para pasteurização de produtos de ovos líquidos que são primariamente usados em serviços de alimentação e produção de alimentos. No entanto, por volta de 70% dos ovos produzidos nos EUA são vendidos em casca. Conseqüentemente, seria prudente desenvolver técnicas que possam também destruir a *Salmonella* Enteritidis nestes produtos (*PRESIDENT'S COUNCIL ON FOOD SAFETY*, 1999).

Mermelstein (2001) informa que os primeiros ovos em casca pasteurizados oferecidos nos mercados de varejo e serviços de alimentação nos EUA foram introduzidos em maio de 1996 pela *Michael Foods Egg Products Co.* Estes ovos são produzidos usando processo de imersão em água quente com tempo e temperaturas controlados para proporcionar uma redução de *Salmonella* spp. de 5 log mantendo as características desejáveis dos ovos. Informa também que a *Pasteurized Eggs Corp's* usa um processo de imersão continua em água, patentiado em 1998 por John Davidson, para a completa pasteurização de ovos em casca, descrito como um sistema onde os ovos em caixas engradados são transportados através de um tanque com água quente até o centro da gema alcançar a temperatura desejada por um tempo desejado que proporcionam uma redução de 5 log de *Salmonella* spp. mantendo a funcionalidade do albúmem. Quando os ovos saem do tanque são selados para evitar contaminação subsequente, secos, marcados com a letra D (Davidson) e embalados, e nestas condições, mantidos a 7,2°C, o prazo de vida de prateleira pode chegar a mais de seis meses. Comenta que apesar do método de imersão em água quente ser o único método usado industrialmente para a pasteurização de ovos em casca, alguns outros métodos, além do daquele que usa ar quente, são pesquisados. Cita método que utiliza radiação ionizante e que em julho de 2000 foi aprovado pelo FDA. Citam também método que utiliza microondas.

James et al. (2002) desenvolveram um experimento com o objetivo de implementar uma investigação sobre a aplicabilidade de quatro tratamentos de aquecimentos diferentes (ar quente, água quente, infravermelho e vapor) que foram previamente aplicados em outros produtos alimentícios, para a pasteurização da superfície dos ovos. O alvo foi obter temperaturas na face externa e interna da casca do ovo para identificar a mais alta temperatura que poderia ser utilizada na face externa dos ovos sem alterar o conteúdo do ovo ou da própria casca. Três séries de experimentação foram conduzidas. Na primeira série, os simulantes de ovos (ovo com o conteúdo substituído por uma resina epox) foram objeto de tratamentos com tempo e temperatura específicos para cada tipo de processo de aquecimento para se determinar o tempo máximo de tratamento do ovo sem elevar a temperatura interna acima de 60°C. Um parâmetro de tempo e temperatura foi identificado para cada tipo de processo. Na segunda série, quatro parâmetros de tempo e temperatura foram testados usando ovo em casca. Cinco ovos foram objeto de cada tipo de tratamento. Todos os ovos foram analisados quanto a danos visíveis na casca e cada ovo foi quebrado e um recipiente limpo e visualmente examinado a procura de sinais de coagulação. Na série final do experimento foi avaliada com precisão a temperatura externa e interna do ovo em casca para cada tipo de processamento. Os resultados mostraram que a temperatura suficiente para se alcançar significativa redução na quantidade de microrganismos pode ser alcançada na superfície externa de um ovo sem aumentar a temperatura do interior até aquelas que poderiam causar coagulação do conteúdo do ovo. Os experimentos com imersão em água mostraram que a 95°C os ovos podem permanecer por dez segundos. Nenhum problema de rachadura foi encontrado em nenhum dos tratamentos durante este experimento. No entanto, somente um pequeno número de amostras foi usada. Desde que ovos em casca não são uniformes é possível que um alto número de amostras poderiam também ser susceptíveis a sinais de rachadura. A análise de valores D obtidos por outros autores indicaria que temperaturas superiores a 70°C por menos de 1,5 segundos seriam capazes de reduzir a população de *Salmonella* Enteritidis ao nível de 6 log. Então, levando isso em consideração, todos os tratamentos investigados são teoricamente capazes de reduzir o número de *Salmonella* spp. na superfície externa de um ovo em casca ao nível de 6 log sem danificar o conteúdo interno. Entretanto, é provável que a resistência térmica das células na superfície externa de um ovo seja diferente

daquelas no conteúdo do ovo. É sabido haver diferença na resistência da bactéria aos tratamentos com calor seco e calor úmido. Investigações são necessárias com objetivo de se estudar o efeito destes tratamentos sobre as bactérias presentes na superfície externa dos ovos. Existe também a possibilidade de que tais tratamentos possam causar danos a casca e ou cutícula, aumentando o risco da contaminação extrínseca se tornar uma contaminação intrínseca. Investigações microscópicas são necessárias para se verificar possíveis alterações na superfície após os tratamentos. Esta investigação somente focou a coagulação do conteúdo interno. Os autores concluem que outros parâmetros de qualidade como exemplo a consistência física da clara e gema, e os efeitos do tratamento sobre a estrutura da proteína necessitam ser investigados.

Grijspjeerdt e Herman (2003) determinaram uma série de curvas de inativação de *Salmonella* Enteritidis para tratamento térmico de ovos usando diferentes condições de tempo e temperatura.

Pombo (2003) desenvolveu um experimento com o objetivo de avaliar possíveis alterações nos fatores de qualidade interna de ovos inteiros, termoprocessados pelos tempos de dez e vinte minutos a temperatura de 57°C, através de comparação dos mesmos com ovos não submetidos ao termoprocessamento (grupo controle), durante 24 dias. Conclui, com base nos resultados obtidos, que os ovos submetidos à temperatura de 57°C por 20 minutos mantiveram as características relativas à qualidade interna com melhores resultados durante todo período do experimento e, ainda, que a unidade Haugh e o pH da clara, mostraram ser parâmetros confiáveis a serem utilizados na avaliação da qualidade interna dos ovos de consumo. Sugere que estudos microbiológicos sejam realizados em função do tratamento térmico.

A *National Pasteurized Eggs (NATIONAL PASTEURIZED EGGS, 2005)* é a empresa que detém a patente ThermalPure™ de tecnologia de pasteurização de ovos em casca e opera a única linha de processamento desenvolvida para utilizar esta tecnologia. A empresa, em seu site na Internet, descreve, basicamente com imagens, sem os dados principais de tempo e temperatura de processamento, como é feito o processamento de ovos segundo a tecnologia *ThermalPure™* (Anexos 3 a 10).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Serão descritos o material e os métodos utilizados no desenvolvimento do experimento. As figuras que ajudam o entendimento do material e dos métodos utilizados encontram-se nos Apêndices, item 10 (páginas 138 até 151).

3.1 MATERIAL

Foi dividido nas categorias de matéria-prima, equipamentos, vidrarias, meios de cultura, soluções e outros descritos a seguir.

3.1.1 Matéria prima

Foram processadas 32 dúzias de ovos de galinha, em grupos de quatro dúzias, produzidos por uma granja comercial sob inspeção federal, e classificados por esta como tipo extra branco classe A. Segundo Brasil (1990) os ovos com esta classificação são caracterizados como apresentando peso mínimo de 60g, casca limpa, íntegra e sem deformação, câmara de ar fixa e com o máximo de 4(quatro) milímetros de altura, clara límpida, transparente, consistente e com as chalazas intactas e gema translúcida, consistente, centralizada e sem desenvolvimento do germe. Estes foram adquiridos em uma unidade de uma rede de supermercados na cidade de Niterói – Rio de Janeiro – Brasil, com data de embalagem indicada não superior a cinco dias. Imediatamente transportados, nas embalagens originais, ao Laboratório de Controle Microbiológico dos Produtos de Origem Animal do Departamento de Tecnologia dos Alimentos da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense.

3.1.2 Equipamentos

Banho-maria eletrônico com agitação modelo *Thermomix* BM da marca *B. Braun Biotech International*; relógio *TIMEX* com *timer*; banho-maria sem agitação da marca *Fanen*; *Stomacher* modelo 80 marca *Seward*; pipetadora automática modelo *Labpette* da marca *Labnet*; estufa de incubação bacteriológica modelo *type 42000* da marca *Thermolyne*; estufa de incubação bacteriológica *Precision Scientific*; *mini drill* 3,6v/10000min⁻¹ da marca *Conthey*; Contador de colônias da marca *Quebec/Darkfroid*; termômetro de mercúrio da marca *APEX* graduado de -10°C a 110°C; autoclave da marca *Fanen*; agitador de tubos (certoma da marca *B. Braun*); Geladeira *Climax* modelo 230L; Fogão *Semmer*; Balança modelo *AS 2000C* da marca *Marte*.

3.1.3 Vidrarias

Becker de 50 e 1000mL; tubos de ensaio de 18X180mm; *erlenmeyers* de 500mL; lâminas de vidro; pérolas de vidro; garrafas com boca larga e capacidade de 500mL; pipetas com capacidade de 20mL.

3.1.4 Meios de cultura e soluções

Ágar *APC* - Merck 5463; Ágar *XLD* - Merck 5387; Caldo *Rappaport e Vassiliadis* - Merck 7700; *SSPT* (BRASIL, 2003c); Caldo *BHI* - Merck 10493; Ágar *TSI* - Merck 3915; *SSP* (BRASIL, 2003b); solução de álcool a 70% (BRASIL, 2000); formaldeído puro *Reagen*; solução de hipoclorito de sódio a 2,8% (água sanitária comercial).

3.1.5 Outros

Separador de gema; pote metálico; ponteiras de 3 mL e 1 mL da marca *Brand*; seringa descartável de capacidade de 5 mL da marca *Injex*; agulha descartável de 30 X 0,7mm marca Laboratórios *Ryncos S.A.*; selante de secagem rápida da marca *Locite*; soro polivalente somático de *Salmonella* spp. da marca *Probac do Brasil*; placas de Petri descartáveis com fundo medindo 55,42 cm², da marca *J Prolab*; envelopes esterilizados para o *Stomacher* tipo *IML PAK* marca *TART* produtos hospitalares.

3.2 MÉTODOS

Será descrita a metodologia aplicada para o preparo das amostras, inoculação dos ovos em casca diretamente nas gemas, pasteurização dos ovos, abertura dos ovos, retirada de alíquotas das gemas e análises bacteriológicas, que são etapas que compõem o experimento que foi repetido oito vezes, no período de agosto a novembro de 2003, no Laboratório de Controle Microbiológico dos Produtos de Origem Animal do Departamento de Tecnologia dos Alimentos da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense.

Os procedimentos críticos, equipamentos, recipientes, superfícies e utensílios, meios de cultura e soluções envolvidos nos métodos desenvolvidos neste experimento, quanto à preparação das amostras, inoculação dos ovos em casca diretamente nas gemas, pasteurização dos ovos, abertura dos ovos, retirada de alíquotas das gemas e análises bacteriológicas, foram realizados ou foram mantidos na zona de segurança do bico de Bunsen acesso e/ou em condições de assepsia específica aos procedimentos críticos, equipamentos, recipientes, superfícies e utensílios, meios de cultura e soluções basicamente pela utilização de solução de álcool a 70% ou esterilização em autoclave. Quanto aos procedimentos críticos, especialmente na metodologia aplicada a quebra dos ovos onde este cuidado foi considerado de extrema importância, esta foi desenvolvida estando as mãos devidamente limpas e desinfetadas com uma solução de álcool a 70%.

3.2.1 Preparo das amostras

O processamento das amostras teve início no mesmo dia da aquisição, e este foi realizado em uma câmara (Apêndices 1, 2 e 3) cujas condições de limpeza e desinfecção eram controladas diariamente antes, durante e após o processamento, basicamente utilizando-se evaporação de formol para a desinfecção do ambiente, solução de álcool a 70% para desinfecção das superfícies e solução comercial de hipoclorito de sódio (água sanitária comercial) para a desinfecção do piso.

Para cada repetição do experimento, as amostras foram organizadas em quatro grupos de 12 ovos cada (Apêndice 4). Os ovos de cada grupo foram identificados com uma combinação de letras escritas a lápis na superfície da casca (em uma localização mediana entre os pólos do ovo) que identificavam o tipo de processamento estabelecido para aquele grupo. As combinações utilizadas foram: **IP**

que identificava o grupo que foi Inoculado e **P**rocessado termicamente, **INP** que identificava o grupo que foi Inoculado e **N**ão **P**rocessado termicamente, **NIP** que identificava o grupo que **N**ão foi Inoculado e foi **P**rocessado termicamente e **NINP** que identificava o grupo que **N**ão foi Inoculado e **N**ão foi **P**rocessado termicamente.

3.2.2 Inoculação dos ovos em casca diretamente nas gemas

Os ovos dos grupos **IP** e **INP** foram inoculados, diretamente na gema, na forma descrita a seguir, com um volume de 0,2 mL de uma cultura de *Salmonella* Enteritidis (ATCC 13076), em caldo *BHI*, com 48 horas de incubação a 35°C, contendo aproximadamente 10^6 a 10^7 células / 7 a 8 log células (no pré-experimento e também durante o próprio experimento, verificou-se, que nas condições citadas, o volume de 0,2 mL da cultura apresentava este nível de células).

Com uma seringa com capacidade de 5 mL e agulha de 30 X 0,7 mm descartáveis, aspirou-se um volume de 5 mL da cultura de *Salmonella* Enteritidis (Apêndice 5). A seringa assim preparada, com a agulha devidamente protegida por sua embalagem, foi mantida, nos intervalos entre a inoculação de cada ovo em uma bandeja plástica.

Colocou-se cada ovo com a extremidade oposta a da câmara de ar voltada para cima em um becher de vidro de capacidade de 50 mL com pérolas de vidro com o objetivo de manter o ovo em posição estável facilitando os procedimentos de inoculação. O local de perfuração (extremidade oposta a da câmara de ar) foi desinfetado com um chumaço de algodão embebido com solução de álcool a 70% (Apêndice 6).

Com o ovo no becher com pérolas de vidro, fez-se uma perfuração na extremidade oposta a da câmara de ar, com auxílio do “mini drill” com uma broca desinfetada (solução de álcool a 70%) com diâmetro suficiente para obter um orifício com diâmetro adequado para passar a agulha (Apêndices 7 e 8).

Introduziu-se aproximadamente $\frac{3}{4}$ do comprimento da agulha através do orifício e inoculou-se o volume de 0,2 mL da cultura, diretamente na gema (Apêndice 9). Este procedimento está baseado nas observações feitas após pré-experimento. Neste procedeu-se a inoculação de ovos, com agulhas de comprimentos diferentes, com 0,2 mL de uma solução aquosa de azul de metileno a 2%. Estes ovos em seguida foram cozidos por dez minutos em água fervendo, que após resfriamento

foram abertos e analisados. Observou-se que com a introdução de $\frac{3}{4}$ da agulha de 30 X 0,7 mm a gema foi atingida com segurança.

Logo após a inoculação, exatamente sobre o orifício foi colocada uma gota de selante de secagem rápida esterilizado (autoclave à 121°C por 15 minutos), com o objetivo de selar o orifício (Apêndice 10).

O ovo assim inoculado foi colocado em uma cesta plástica com o local da inoculação voltado para cima (Apêndice 11).

Todos os procedimentos descritos acima foram executados em um por um dos ovos dos grupos **IP** e **INP**.

3.2.3 Pasteurização dos ovos dos grupos IP e NIP

Para facilitar a identificação dos grupos, os ovos do grupo **IP** foram arrumados, com o local de inoculação voltado para cima, em uma cesta plástica de cor amarela e os ovos do grupo **NIP** foram arrumados, com o local de inoculação voltado para cima, em uma cesta plástica de cor verde.

Os dois grupos foram processados separadamente. Primeiro processou-se o grupo **NIP** e depois o grupo **IP**.

As cestas foram submersas cuidadosamente no banho-maria eletrônico com agitação abastecido com água destilada esterilizada (autoclave à 121°C por 15 minutos) com um volume suficiente para proporcionar a submersão total dos ovos.

Depois de abastecido (Apêndice 12), o banho-maria foi ligado e marcou-se um tempo de 43 minutos, este suficiente, conforme o observado no pré-experimento, para elevar a temperatura da gema do ovo em casca de um valor de $24,5^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ até 57°C . O pré-experimento constou, entre outros, do aquecimento de um ovo com o bulbo de um termômetro de mercúrio tecnicamente introduzido na gema, de forma que este e o conteúdo do ovo permaneceram estáveis e isolados da água do banho-maria durante todo o processamento, da avaliação da temperatura inicial do ovo e da água do banho-maria e da medição do tempo gasto para se atingir a temperatura de 57°C na gema. Estes procedimentos no pré-experimento foram repetidos cinco vezes.

Vencido o período de aquecimento, marcou-se o tempo de 20 minutos (Apêndice 13), e quando completo, o banho-maria foi desligado e imediatamente retirou-se as cestas que foram colocadas na bancada e nela permaneceram por uma hora resfriando a temperatura ambiente.

3.2.4 Abertura dos ovos para retirada de alíquotas das gemas e preparo de amostra para as análises bacteriológicas

Os ovos de todos os grupos foram abertos para a retirada de alíquotas das gemas para serem submetidas às análises bacteriológicas.

Os ovos (um de cada vez) foram abertos um grupo por vez. O primeiro grupo processado foi o **NIP**, depois o **NINP**, depois o **IP** e por último o **INP**. A maior parte do material usado era próprio para cada grupo e antes do processamento de cada grupo, a bancada, bandejas e equipamentos, além de outros utensílios, foram limpos e depois desinfetados com chumaços de algodão embebidos com álcool a 70%.

Antes da abertura do primeiro ovo de cada grupo, retirou-se um envelope de *stomacher* do pote de plástico (recipiente com tampa que foi limpo e depois desinfetado com chumaço de algodão embebido com álcool a 70% onde a embalagem de envelopes de *stomacher* era mantida) e colocou-se cuidadosamente, mantendo a abertura do envelope fechada, em uma embalagem plástica com o objetivo de manter o envelope de *stomacher* em condições estáveis proporcionando o contínuo abastecimento com alíquotas das gemas dos 12 ovos analisados.

Em cada ovo, antes da quebra, desinfetou-se toda a superfície da casca com um chumaço de algodão embebido em álcool 70% (Apêndice 14). Este foi quebrado, inicialmente provocando uma rachadura no meio do ovo entre as duas extremidades com auxílio do bisturi (Apêndice 15). Depois forçou-se a quebra efetiva da casca com a pressão dos dedos e deixou-se o conteúdo cuidadosamente escorrer para o separador de gema apoiado sobre um pote metálico, com o objetivo de receber o albúmem dos ovos quebrados.

As cascas dos ovos de cada grupo foram dispensadas em embalagens próprias e esterilizadas (autoclave à 121°C por 20 minutos) antes do descarte.

Com um pipetador automático de capacidade de 5 mL, equipado com ponteira com capacidade de 3 mL (provida de filtro de algodão hidrófobo esterilizado), alíquotas de cada gema retida no separador de gema foram retiradas e transferidas para o envelope de *stomacher* (Apêndices 16 e 17). No momento da quebra de cada ovo, o pipetador equipado com a ponteira era mantido apoiado em uma garrafa de boca larga esterilizada.

Após a transferência das alíquotas referentes à gema do 12º ovo de cada grupo quebrado, fechou-se o envelope de *stomacher* e cuidadosamente retirou-se da embalagem plástica e colocou-se no aparelho de *stomacher* (Apêndice 18).

Dispensou-se a ponteira em uma embalagem plástica própria para descarte de material não contaminado, no caso dos grupos **NIP** e **NINP**, ou em uma embalagem plástica própria para descarte de material contaminado, no caso dos grupos **IP** e **INP**.

No aparelho de *stomacher* as alíquotas das gemas contidas em cada envelope de *stomacher* foram homogeneizadas na velocidade normal (segundo a indicação no painel de controle) por 60 segundos, obtendo-se assim as amostras para análise.

Após cada processo de homogeneização, retirou-se o envelope de *stomacher* fechado do aparelho e colocou-se de volta, cuidadosamente, na embalagem plástica.

Retirou-se 25 mL da amostra contida em cada envelope de *stomacher*, com auxílio de uma pipeta de vidro esterilizada (autoclave à 121°C por 15 minutos) com capacidade de 20 mL, e transferiu-se para um frasco de contendo 225 mL de SSPT (Apêndice 19), o qual incubou-se a 35°C por 24 horas.

Com auxílio da mesma pipeta utilizada anteriormente, retirou-se mais 25 mL de cada amostra e transferiu-se para um frasco contendo 225 mL de SSP (Apêndice 20).

3.2.5 Análises bacteriológicas dos homogeneizados de gemas e das culturas de *Salmonella* Enteritidis inoculadas

A partir dos frascos de SSP preparados no item 3.2.4 procedeu-se à contagem padrão de bactérias mesófilas aeróbias estritas e facultativas viáveis (Apêndice 21). Dos frascos de SSPT preparados no item 3.2.4, procedeu-se à pesquisa de *Salmonella* spp. (Apêndice 21) e das culturas de *Salmonella* Enteritidis inoculadas procedeu-se à contagem padrão de bactérias mesófilas aeróbias estritas e facultativas viáveis e a pesquisa de *Salmonella* spp. (Apêndice 21). A metodologia utilizada em cada análise bacteriológica é descrita a seguir.

3.2.5.1 Contagem padrão de bactérias mesófilas aeróbias estritas e facultativas viáveis

De cada grupo de gemas e das culturas de *Salmonella* Enteritidis procedeu-se à contagem padrão de bactérias mesófilas aeróbias estritas e facultativas viáveis segundo Brasil (2003a) e Brasil (2003b) (Apêndices 22 e 23).

3.2.5.2 Pesquisa de *Salmonella* spp.

De cada grupo de gemas e das culturas de *Salmonella* Enteritidis procedeu-se a pesquisa de *Salmonella* spp. segundo Brasil (2003c) (Apêndices 24,25 e 26) que está de acordo com o método proposto pela *Food Safety Inspection Service* dos EUA (*U S DEPARTMENT OF AGRICULTURE*¹⁷, 1998, apud HARA-KUDO et al., 2001a) e pela *Intenational Organization for Standardization* (ISO¹⁸, 1999, apud HARA-KUDO et al., 2001a) que indicam a utilização de pré-enriquecimento a 35 – 37°C SSPT e enriquecimento em Caldo Rappaport Vassiliadis a 43°C.

¹⁷ US Department of Agriculture. *Microbiology Laboratory Guidebook*, 3^a ed. US Department of Agriculture. 1998.

¹⁸ ISO. *Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs. Horizontal Methods for the Detection of Salmonella, Revision ISO 6579*. 1999.

4 RESULTADOS

Os resultados estão agrupados em conformidade com os procedimentos analíticos realizados.

4.1 CONTAGEM PADRÃO DE BACTÉRIAS MESÓFILAS AERÓBIAS ESTRITAS E FACULTATIVAS VIÁVEIS

Os resultados estão expostos, quando possível, em tabelas e figuras para melhor acompanhamento e visualização dos mesmos.

A quantidade de ufc de *Salmonella* Enteritidis por 0,2 mL da cultura ATCC nº 13076 com 48 horas de incubação a 35°C (fase estacionária) foi em média de 3×10^8 .

O método de inoculação da gema proporcionou a colocação de 2×10^6 ufc de *Salmonella* Enteritidis (ATCC 13076) por mL do conteúdo das gemas de ovos em casca, sem provocar danos que interferissem no desenvolvimento do experimento.

O tratamento de ovos em casca por imersão em água com agitação, mantendo-se a temperatura da gema a 57°C por 20 minutos foi efetivo na destruição total (8 log) de *Salmonella* Enteritidis (ATCC 13076) presente nesta.

Todas as amostras dos grupos **NIP**, **IP** e **NINP** apresentaram placas sem crescimento nas diluições 1/10, 1/100 e 1/1000 (Figuras 1 e 2), e de acordo com (BRASIL, 2003a), nesse caso o resultado deve ser lançado com < dez ufc de bactérias mesófilas aeróbias estritas e facultativas viáveis / mL da amostra.

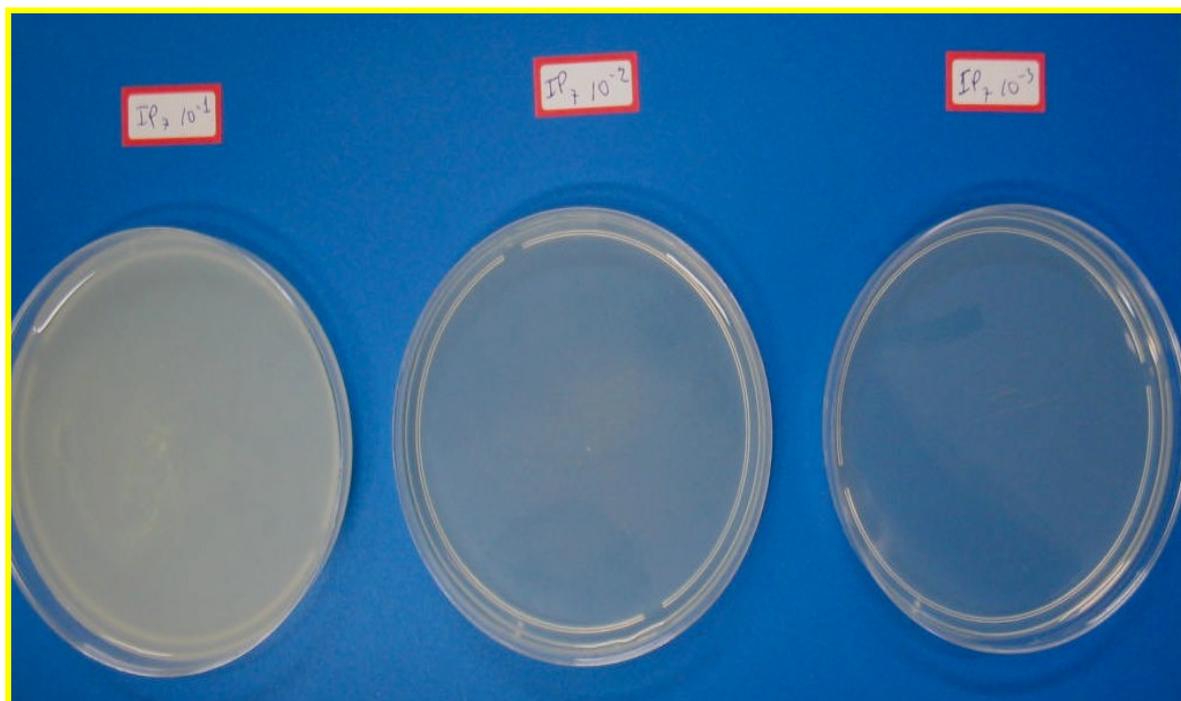


Figura 1. Placas de APC do grupo **IP** após incubação a 35°C por 48 horas

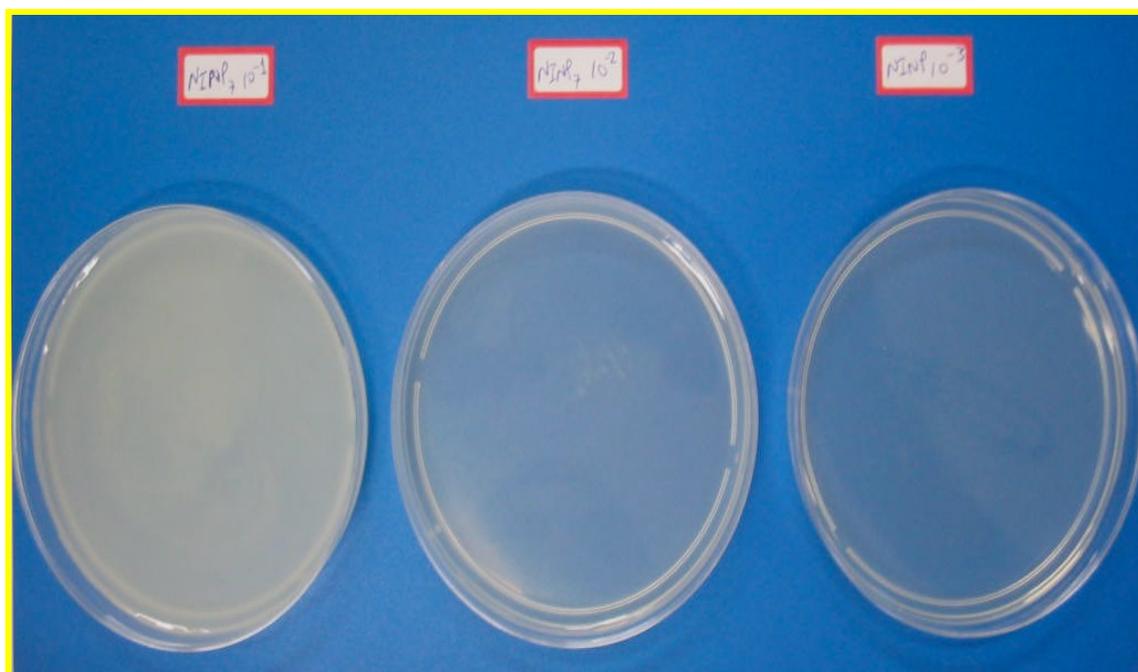


Figura 2 Placas de APC do grupo **NINP** após incubação a 35°C por 48 horas

Nas amostras do grupo **INP** o resultado médio foi de 2×10^6 ufc de bactérias mesófilas aeróbias estritas e facultativas viáveis por mL de amostra. Os resultados,

seguinto as normas padrões de aproximação estatística, estão lançados na tabela 1.

Tabela 1 – Número de unidades formadoras de colônias de bactérias mesófilas aeróbias estritas e facultativas viáveis por mL de amostra do grupo **INP**

AMOSTRAS	Nº de ufc / mL
1	8×10^6
2	6×10^6
3	2×10^5
4	6×10^4
5	1×10^6
6	2×10^4
7	1×10^4
8	6×10^4

Nos volumes de 0,2 mL das culturas de *Salmonella* Enteritidis inoculadas nos ovos dos grupos **INP** e **IP** nas 8 repetições do experimento, o resultado médio foi de 3×10^8 ufc de bactérias mesófilas aeróbias estritas e facultativas viáveis (Figura 3).



Figura 3. Placa de APC da cultura de *Salmonella* Enteritidis

Os resultados, seguindo as normas padrões de aproximação estatística, estão lançados na Tabela 2.

Tabela 2 – Número de unidades formadoras de colônias de bactérias mesófilas aeróbias estritas e facultativas viáveis por 0,2 mL de cultura inoculadas nos grupos **INP** e **IP** nas oito repetições do experimento

REPETIÇÃO	Nº de ufc / mL
1	8×10^7
2	2×10^8
3	2×10^8
4	4×10^8
5	4×10^8
6	4×10^8
7	4×10^8
8	6×10^8

Quanto ao grupo **INP**, a amostra 1 equivale à repetição 1 e assim sucessivamente.

4.2 PESQUISA DE *Salmonella* spp.

Noventa e seis ovos apresentaram ausência de *Salmonella* spp em 25 mL de gema.

A cultura de *Salmonella* Enteritidis (ATCC 13076) com 48 horas de incubação (fase estacionária) à 35°C foi sensível a temperatura de 57°C por 20 minutos na gema de ovo.

A manutenção das gemas de ovos em casca imersos em água com agitação a temperatura de 57°C por 20 minutos provocou a destruição de todas as células de *Salmonella* Enteritidis inoculadas nelas.

Todas as amostras dos grupos **NIP**, **IP** e **NINP** apresentaram ausência de *Salmonella* spp. em 25 mL das amostras. Todas as amostras do grupo **INP** apresentaram *Salmonella* spp. em 25 mL das amostras (Figura 4).



Figura 4. Cultura de *Salmonella* Enteritidis em Ágar XLD

4.3 AQUECIMENTO DOS OVOS

O tempo necessário para elevar a temperatura da gema de ovos classificados pela granja como tipo extra classe A (BRASIL, 1990), através da imersão destes em água, de $24,5^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ até 57°C , foi de 43 minutos, o que viabilizou a manutenção destas a temperatura de 57°C por 20 minutos, que proporcionou a destruição de todas as células de *Salmonella* Enteritidis inoculadas nelas.

5 DISCUSSÃO

O objetivo de testar uma metodologia básica de pasteurização do ovo em casca no que se refere a sua eficiência na destruição de uma cepa de *Salmonella* Enteritidis pode ser justificada por vários autores desde final da década de 80, pois apesar do CDC (1987) indicar que a manipulação apropriada e o cozimento dos ovos podem minimizar o risco da ocorrência de DTA causada por *Salmonella* spp. associada a ovos, o CDC (1988) sugere que temperaturas mornas podem propiciar o desenvolvimento e resistência de *Salmonella* Enteritidis em ovos durante a produção, transporte, estoque ou uso, e citaram que embora erros na manipulação de alimentos possam contribuir para surto de DTA causada por *Salmonella* spp., alguns surtos descritos demonstraram que a DTA causada por *Salmonella* Enteritidis pode ocorrer mesmo quanto técnicas aceitáveis de preparação de alimentos são usadas. Humphrey et al (1989b) citam, com base em informações de outros autores, que na Inglaterra, Wales e nos EUA, ocorreram surtos com *Salmonella* Enteritidis, onde ovos tratados termicamente foram incriminados, citam também investigações que indicam que a *Salmonella* Enteritidis pode ser transmitida verticalmente por aves infectadas, sendo assim, concluem que esta bactéria pode ser isolada da gema tanto quanto da face externa da casca. Humphrey et al. (1989a) confirmaram o isolamento de *Salmonella* Enteritidis a partir de conteúdo de ovos em casca intactos, e observaram que o exame de ovos de granjas implicadas em casos de surtos de *Salmonella* Enteritidis sugere que a produção de ovos contaminados deve ser intermitente. Segundo Madden (1990), a DTA produzida pela *Salmonella* Enteritidis é caracterizada por diarreia, dor abdominal, calafrios, febre, vômito e dor de cabeça. A doença não é restrita a um grupo etário específico, apesar da maioria dos surtos e mortes reportadas para o CDC terem ocorrido em hospitais ou enfermarias, onde muitos indivíduos estão debilitados ou idosos e podem ter a doença subclínica.

Todas as amostras no grupo **NINP** apresentaram resultado negativo na contagem padrão de bactérias mesófilas aeróbias estritas e facultativas viáveis por mL, que devido a técnica utilizada, foram lançados como < dez ufc de bactérias mesófilas aeróbias estritas e facultativas viáveis / mL da amostra e na pesquisa de *Salmonella* spp. Estes resultados estão de acordo com Humphrey et al. (1989a) que enumeraram a quantidade de *Salmonella* spp. no conteúdo de ovos naturalmente contaminados, e obtiveram resultados inferiores a dez células por ovo apesar destes terem estado estocados em temperatura ambiente por sete dias. Segundo CDC (1990), a contaminação interna do ovo com *Salmonella* spp. deve ocorrer em 0,01% a 0,6% de todos ovos em casca produzidos nos USA. Humphrey et al. (1991) citam que a maioria dos ovos contaminados postos em lotes naturalmente infectados no Reino Unido continham menos de dez células de *Salmonella* Enteritidis por ovo. Humphrey (1994), indica que a ocorrência observada de ovos com o conteúdo contaminado com *Salmonella* spp. pode ser variável, e que enquanto boa parte desta variação pode ser explicada observando as características da contaminação do ovo, é também importante considerar o impacto do uso de diferentes técnicas laboratoriais. Cita ainda que estudos com ovos obtidos de galinhas artificialmente e naturalmente infectadas mostraram que quando o conteúdo de ovos são misturados para análise, as taxas de isolamento podem aumentar significativamente extendendo-se o tempo de incubação de 24 para 48 horas. Cita também que pesquisas que não levam em conta este aspecto podem subestimar a ocorrência de contaminação dos ovos. Neste experimento esses aspectos foram levados em consideração ao se trabalhar com pool de 12 gemas caracterizando uma amostra. Mas segundo Gast e Holt (2000), qualquer tentativa de se obter níveis significativos de crescimento em termos de número de células a partir de um grupo de ovos em que a contaminação da gema ocorre esporadicamente, como ocorre na situação natural, mascara a produção ocasional de ovos contendo uma elevada quantidade de células de *Salmonella* Enteritidis. Radkowski (2001) analisou 1200 ovos produzidos na Polônia e não detectou *Salmonella* spp. na superfície da casca ou no conteúdo destes ovos, no entanto, ele discute que esse dado pode dar a impressão de que os ovos raramente estão contaminados por *Salmonella* spp. na superfície, mas considerando que a produção mundial de ovos está em torno de 400 bilhões e na Polônia chega aproximadamente a oito bilhões por ano, conseqüentemente, pode-se considerar que apenas uma pequena quantidade de ovos foi examinada em

comparação com o número de ovos que são postos. Os dados obtidos na sua pesquisa, com algum grau de consistência estão de acordo com os obtidos em outros países. Este ressalta que nos EUA um em 10.000 ovos está infectado com *Salmonella* spp. e no Reino Unido é um para 15.000. Cita também pesquisadores que observaram que o consumo de ovos frescos no Reino Unido está em torno de três por semana, e que assumindo a infecção de um ovo em 15.000, estes consideraram que um em 100 indivíduos pode consumir um ovo infectado por ano, e levando em consideração que a população do Reino Unido está em torno de 64 milhões, concluem que aproximadamente 640.000 pessoas consumem um ovo contaminado com *Salmonella* spp., mas, no entanto, existem muitos poucos casos reportados de DTA causada por *Salmonella* Enteritidis. Radkowski (2001) ainda cita que pesquisas realizadas nos EUA e Reino Unido mostram uma muito baixa contaminação dos ovos mesmo quando estes eram provenientes de granjas infectadas com *Salmonella* spp. e que os Serviços de Saúde Pública no Reino Unido tem investigado ovos provenientes de granjas as quais anteriormente foram responsáveis por casos de DTA por *Salmonella* Enteritidis e demonstraram que aproximadamente 0,1% dos conteúdos foram positivos. Radkowski (2001) levanta a questão do por quê que ovos, apesar da contaminação com *Salmonella* spp. ser rara, e quando presente estarem em baixos níveis, são freqüentemente incriminados como responsáveis por DTA na Polônia e em outros países.

Todas as amostras no grupo **NIP** e **IP** apresentaram resultado negativo tanto na pesquisa de *Salmonella* spp. como na contagem padrão de bactérias mesófilas aeróbias estritas e facultativas viáveis por mL da amostra, que devido à técnica utilizada, foram lançados como < dez ufc de bactérias mesófilas aeróbias estritas e facultativas viáveis / mL da amostra. Estes resultados indicam que o processamento testado foi eficiente na destruição da cepa de *Salmonella* Enteritidis inoculada. Outro resultado foi obtido por Hou et al. (1996), que utilizaram a mesma cepa deste experimento só que suspensa em gema de ovo, na concentração de 10^5 a 10^7 ufc por mL. Neste experimento utilizou-se a cultura suspensa em caldo *BHI* na concentração de aproximadamente 3×10^8 ufc por mL. Da mesma forma que neste experimento, desinfetaram os ovos com álcool a 70% e inocularam a gema através de uma perfuração na extremidade oposta a da câmara de ar. Utilizaram um volume de 0,5 mL da cultura enquanto que neste experimento utilizou-se 0,2 mL. Também selaram os orifícios com um selante de secagem rápida sendo que os ovos foram

mantidos em gelo até a completa secagem, enquanto que neste experimento os ovos foram mantidos em temperatura ambiente até a completa secagem do selante quando então foram pasteurizados. Também utilizaram banho-maria com agitação regulado a 57°C, mas testaram os tempos de dez, quinze, vinte e vinte e cinco minutos. Os ovos foram imediatamente resfriados em gelo logo após a pasteurização, enquanto que neste experimento, após a pasteurização, os ovos foram resfriados em temperatura ambiente. Igualmente utilizaram como parâmetro a temperatura no centro da gema. Assim como Pombo (2003), que foi utilizada como base neste experimento, a funcionalidade do ovo foi testada através do cálculo da unidade Haugh, das medidas de pH da clara e da gema e do cálculo do índice da gema. Além das análises citadas, Hou et al. (1996), mediram a viscosidade com um viscosímetro digital, a turbidez através de um espectrofotômetro, a capacidade de formar espuma e a atividade da lisozima do albúmem. Quanto a atividade da lisozima, esta foi reduzida a metade pela pasteurização. Devido a lisozima ser considerada um componente antimicrobiano do albúmem, uma perda mínima da atividade da lisozima não seria desejável para aumentar os aspectos de segurança dos ovos pasteurizados em casca. Ainda no experimento de Hou et al. (1996), a destruição máxima de *Salmonella Enteritidis* em banho-maria foi de 3 log enquanto que neste experimento os resultados indicam uma destruição total (8 log). Da mesma forma que Pombo (2003), a unidade Haugh não mostrou diferenças significativas ($p < 0,05$) entre o ovo fresco e o pasteurizado demonstrando que o processamento não afeta grosseiramente este parâmetro de qualidade do ovo. Stadelman et al. (1996), desenvolvendo experimento de tratamento térmico de ovos por métodos diferentes também não observaram alteração na unidade Haugh. Segundo Hou et al. (1996), nos ovos pasteurizados houve um aumento na capacidade de formação de espuma e sua estabilidade. Isso pode ser explicado por um aumento da hidrofobicidade superficial do albúmem.

Stadelman et al. (1996) observaram que quando os ovos foram submersos em água, o centro da gema foi aquecido até 56°C em aproximadamente 20 minutos. No aquecimento com ar quente, o tempo necessário foi por volta de uma hora e em forno de microondas, com potência menor que a máxima, somente dois minutos foram necessários. Com aquecimento em forno de microondas, a temperatura da gema foi de 60°C e no albúmem foi de 56°C – 57°C. Concluem que o aquecimento com ar quente seria o menos prático método de aquecimento de ovos em casca

devido ao período de tempo longo (mais de 60 minutos) necessários para se alcançar 55°C e por representar um meio pobre para eficiente transferência do calor para o interior do ovo. Consideram o aquecimento em banho-maria mais eficiente, mas ainda requerendo um tempo de aquecimento de aproximadamente 15 minutos para se alcançar a temperatura crítica de 55°C a 56°C a qual a máxima inativação bacteriana ocorre sem desnaturação das proteínas presentes no albúmem ou gema. Esclarecem que a diferença na eficiência do aquecimento é refletida no tempo necessário para uma redução de *Salmonella* Enteritidis em três ciclos log em ovos artificialmente inoculados, que no caso do método com ar quente é superior a 125 minutos enquanto que no método de submersão em água é de 25 minutos. Indicam que a extensão da inativação bacteriana pode ser alargada pelo aumento do tempo de manutenção nas temperaturas críticas para destruição bacteriana até se alcançar a redução microbiana desejável. O tempo de aquecimento até a temperatura de 55°C a 56°C observado por Stadelman et al. (1996), em comparação com este experimento, foi muito curto. Na leitura do trabalho publicado por estes autores não se encontrou justificativa para esta diferença. O tempo de 25 minutos a 55°C – 56°C para se obter uma redução de três ciclos log foi menos eficiente que o desenvolvido neste experimento.

Os resultados obtidos neste experimento, assim como os obtidos por Stadelman et al. (1996), não confirmam os resultados obtidos por Van Lith et al.¹⁹ (1995), apud Stadelman et al. (1996), que citam que o aquecimento de ovos em casca, inoculados artificialmente, a 57°C por 30 minutos não resultou em completa destruição de *Salmonella* Enteritidis e observam que a extensão dessa temperatura de tratamento causaria coagulação das proteínas do albúmem.

Stadelman et al. (1996), com o objetivo de se obter uma redução no tempo necessário para se conseguir uma redução de sete ciclos log nas células de *Salmonella* Enteritidis, implementaram uma etapa de aquecimento em microondas como um método primário para rapidamente alcançar uma temperatura a mais próxima possível da temperatura alvo de 55°C. Observam que uma combinação de microondas e ar quente ou microondas e banho-maria significativamente reduz o tempo necessário para se alcançar à temperatura alvo e promove uma redução de 5 logs em menos tempo do que foi necessário para se alcançar uma redução de 3 log,

¹⁹ VAN LITH, L.A.J.T.; PUTIRULAN, F.F.; MULDER, R.W.A.W. Pasteurization of table eggs to eliminate *Salmonella*. *Archiv Geflugelkd*, v.59, n.2, no prelo.

tanto no método de ar quente quanto no de banho-maria sozinhos. Analisam que o benefício com o aquecimento em microondas é o aquecimento da gema mais rapidamente que o albúmem, o que é estrategicamente melhor devido à gema ser mais resistente à desnaturação térmica que o albúmem considerando que o aquecimento por condução externa pode desnaturar o albúmem antes da temperatura letal ser atingida na gema. Concluem que, considerando que ovos em casca naturalmente infectados contém somente 10 a 100 ufc de *Salmonella* Enteritidis, os níveis de destruição demonstrados são suficientes para se obter ovos em casca negativos para *Salmonella* Enteritidis em 30 minutos. Por fim indicam que futuras pesquisas deverão se direcionadas no sentido de desenvolver uma melhor distribuição do calor durante o aquecimento em microondas.

O tempo total de manutenção do ovo no banho-maria de 63 minutos desenvolvido neste experimento está em desacordo com o desenvolvido por Schuman et al. (1997), que inocularam 0,5 mL de uma cultura com 8,5 log e observaram que a 57°C, apenas o tempo superior ou igual a 75 minutos foi efetivo na eliminação de todas as *Salmonella* Enteritidis. Isso talvez possa ser explicado pelo fato de neste experimento ter sido utilizado banho-maria com agitação (maior eficiência na transmissão/distribuição do calor), detalhe este que não descrito por Schuman et al. (1997).

Schuman et al. (1997), descrevem que a 57°C a população de células viáveis de *Salmonella* Enteritidis teve uma redução de dois a 2,5 ciclos log durante os primeiros 35 minutos. Após 60 minutos a população de células viáveis de *Salmonella* Enteritidis teve redução superior a 6.8 ciclos log, enquanto que neste experimento com 63 minutos a redução foi de oito ciclos log.

Este experimento seguiu as indicações de Schuman et al. (1997) que utilizaram alguns elementos para dar maior segurança no que se refere a inativação da *Salmonella* Enteritidis. Um desses elementos foi a utilização de cultura na fase estacionária. Segundo Humphrey et al. (1990a), as células se multiplicam a 37°C e após 48 horas alcançam a fase estacionária onde são muito menos termosensíveis que células em multiplicação por 24 horas. O outro elemento foi a inoculação no centro geométrico do ovo. Segundo Schuman et al. (1997), considera-se que o pH da gema próximo da neutralidade e a maior concentração de sólidos e lipídios na gema em relação à clara determinam uma proteção térmica para a *Salmonella* Enteritidis presente na gema.

Schuman et al. (1997) indicam que a questão é o que nível adequado de inativação de *Salmonella* spp. (via aquecimento por imersão ou outro processo de pasteurização) está diretamente relacionado com os níveis médios de *Salmonella* spp. que contaminam os ovos. Indicam que alguns pesquisadores citam que a maioria dos ovos, naturalmente contaminados, analisados, continham menos que uma célula de *Salmonella* spp. por grama. Concluem que, com base nestes estudos, o tratamento de pasteurização de ovos em casca com efeito de valor D de 8.4 a 8.5 de inativação de *Salmonella* Enteritidis, proveria uma larga margem de segurança para o consumidor destes ovos.

De forma semelhante a este experimento, Schuman et al. (1997) tiveram como objetivo simular um caso drástico de condição de contaminação por *Salmonella* spp., e assim fornecer embasamento para a definição do que constitui um nível aceitável de inativação de *Salmonella* Enteritidis em ovos tratados termicamente por imersão.

Schuman et al. (1997), consideram que potenciais usuários finais de ovos em casca pasteurizados incluiriam consumidores domésticos e estabelecimentos de alimentação comercial e desta forma e conteúdo de ovos pasteurizados em casca poderiam ser usados como ingredientes em produtos que não sofrem tratamento suficiente para a eliminação de *Salmonella* spp. minimizando a ocorrência de contaminação por *Salmonella* spp. em alimentos prontos ou em áreas de preparação de alimentos via ovos como ingredientes. Consideram também que a definição do período de vida de prateleira adequado para ovos pasteurizados em casca refrigerados, através de testes físico-químicos, sensoriais e microbiológicos, é o importante capítulo final do desenvolvimento do produto. Sugerem que a frase “mantenha sob refrigeração” e a indicação do prazo de validade, devem constar na parte externa da embalagem. Citam que pesquisas demonstram que a qualidade interna dos ovos (albúmem, pH, unidade haugh, capacidade de formar espuma pelo albúmem) tratados termicamente por imersão (com ou sem óleo) não apresentam sinais de deterioração durante quatro semanas a 7°C ou 22°C. Resultados similares foram obtidos por Pombo (2003) cujo experimento foi utilizado como base neste.

Conforme Miyamoto et al. (1998), alguns procedimentos de pasteurização dos ovos em casca para eliminar o risco de *Salmonella* spp. foram desenvolvidos, mas nenhum destes foi capaz de não provocar alterações nas características sensoriais e funcionais do ovo, o que está em desacordo com o observado por Pombo (2003) em

cujo experimento um dos procedimentos de pasteurização, o qual foi utilizado como base neste experimento, foi capaz de não provocar alterações nas características sensoriais e funcionais do ovo.

Brackett et al. (2001) citam que a legislação em vários países outros que não os EUA correntemente proíbem a lavagem, por spray ou imersão, de ovos em casca voltados para o consumo direto. Por esta razão sugerem que pesquisas adicionais para se identificar a possibilidade de processamento de pasteurização de ovos em casca sem o uso de imersão é de interesse. Sendo assim, usando um sistema de aquecimento por convecção com umidade controlada, nos primeiros 40 minutos de processamento, observaram uma redução de 2 log de *Salmonella* spp. viáveis. Aquecendo os ovos a 57,2°C por um tempo total de 60 a 70 minutos, neste sistema, observaram a destruição de 6 e 7 log ufc / g de *Salmonella* spp. respectivamente. Não recuperaram qualquer célula viável de *Salmonella* spp. dos ovos aquecidos por 70 minutos. Analisam que os valores de D foram consistentes com os valores de D relatados por Schuman et al. (1997) para ovos intactos pasteurizados usando o processo de imersão em água. Citam que estes pesquisadores relataram um valor D de seis minutos para cepas de *Salmonella* Enteritidis inoculadas no centro de ovos em casca aquecidos por imersão a 57°C em banho-maria com agitação. Observam que apesar de Stadelman et al. (1996) e Hou et al. (1996) não especificamente terem calculado o valor D, estes grupos de pesquisadores subtenderam ou apresentaram um valor D para *Salmonella* Enteritidis de aproximadamente 4,5 minutos quando aquecido a 57°C em ovos intactos. Concluem que, no entanto, um valor D preciso pode ser difícil de se determinar neste tipo de pesquisa, já que ovos inoculados são tipicamente submetidos a um tempo longo de elevação da temperatura (24 a 35 minutos), e a variabilidade introduzida pelo uso de “cocktail” de várias *Salmonella* spp. atrapalham o cálculo de um valor D preciso. Citam que o FDA em conjunto com o USDA e o *Agricultural Marketing Service*, estabeleceram o requerimento de que para ser designado como “pasteurizado”, ovos em casca intactos devem ser objeto de processamento que determine um mínimo de redução de 5 log de células viáveis de *Salmonella* spp., Neste experimento obteve-se uma redução de 8 log em um tempo total de 63 minutos, o que possibilita considerar o procedimento de pasteurização desenvolvido neste experimento como mais eficiente que o desenvolvido por Brackett et al. (2001) e efetivo para se possibilitar a

designação dos ovos processados desta forma como “pasteurizados” como estabelecido pelo *FDA* em conjunto com o *USDA* e o *Agricultural Marketing Service*.

Mermelstein (2001) cita que o *FDA* recomenda que ovos em casca pasteurizados substituam ovos em casca frescos na preparação de alimentos tais como molhos (“*caesar salad*” e “*hollandaise sauce*”), maioneses, gemadas, sorvetes e bebidas fortificadas com ovos que não são completamente cozidos. Cita também duas patentes de tecnologia de processamento de ovos em casca por imersão em água quente, usadas industrialmente, que segundo seus autores, proporcionam a obtenção de ovos “pasteurizados” atendendo o requerimento do *USDA* e *FDA*.

Grijspjeerd e Herman (2003), consideram que os processos de pasteurização de ovos em casca pesquisados são excessivamente demorados e podem resultar em algumas alterações na qualidade e propriedades do conteúdo do ovo. Eles analisam que se a contaminação intrínseca é reduzida ou eliminada via melhores programas de vacinação e criação, tal tratamento necessita somente ser aplicado no exterior do ovo. Mas levando-se em consideração o risco, mesmo que pequeno, da presença de *Salmonella* Enteritidis no interior do ovo e as conseqüências para a saúde de quem vai consumi-lo, é inadmissível aceitar uma inocuidade relativa baseada apenas em melhores programas de vacinação e criação. Foi comprovado neste experimento, que não obstante o tempo de processamento possa ser considerado longo, ele é efetivo na obtenção de ovos isentos de *Salmonella* Enteritidis, sem provocar alterações significativas das qualidades e propriedades do conteúdo do ovo. Mermelstein (2001), informa que a *Pasteurized Eggs Corp's* que, segundo eles produzem ovos em casca “pasteurizados” que atendem os requerimentos do *USDA* e *FDA*, testaram outros métodos de pasteurização de ovos em casca e concluíram que o método de imersão em água quente que eles utilizam é o método mais natural e econômico, também discordando da posição de Grijspjeerd e Herman (2003).

Fleishchman et al. (2003) consideram que a pasteurização de ovos em casca foi demonstrada como sendo um caminho viável para a eliminação de bactéria patogênica sem danificar a casca. Afirmam que os métodos de pasteurização de ovos em casca visam o ovo inteiro e por esta razão as camadas mais externas do ovo são superprocessadas para que seja transmitida uma dose adequada de calor até o centro do ovo. Se não se conhece onde a bactéria está localizada, este é o caminho mais seguro. Entretanto, se é sabido que a bactéria está ausente em certas

partes do ovo, deve ser possível modificar estes processamentos para se reduzir a energia térmica necessária para se obter um ovo em casca pasteurizado. Afirmam também que a emergente questão da infecção do ovo por *Salmonella* Enteritidis sugere que esta ocorre inicialmente no albúmem, com a gema sendo susceptível em alguns momentos após a ovoposição. Afirmam também que existem conclusivas evidências da migração de *Salmonella* Enteritidis em ovos com mais de uma semana. Analisam que, entretanto, no momento exatamente após a ovoposição, quando a pasteurização poderia ocorrer, não se sabe conclusivamente se a membrana vitelínica é susceptível a migração por *Salmonella* Enteritidis. Sendo assim, desenvolveram um experimento com o objetivo de determinar se ocorre a migração da *Salmonella* Enteritidis na gema de ovos relativamente frescos. Concluíram, tendo como base conjuntamente os resultados obtidos no experimento deles e em outros, que o albúmem é o local inicial da infecção por *Salmonella* Enteritidis, com a membrana vitelínica funcionando como barreira contra a penetração da *Salmonella* Enteritidis no interior da gema. Concluíram também que apesar da eventual migração de *Salmonella* Enteritidis para a gema não ocorrer, dependendo da idade da membrana e da temperatura de estocagem, isso não parece ser uma ameaça se ovos são pasteurizados após algumas horas da ovoposição. Sendo assim, afirmam que o confinamento inicial da *Salmonella* Enteritidis no albúmem deve permitir uma diminuição da severidade do processo de pasteurização, não significando com isso, *a priori*, que uma pasteurização mais light deveria ser utilizada, pois, por exemplo, deve ser possível que o tratamento térmico por si só sensibilize a membrana, permitindo a *Salmonella* Enteritidis penetrar na gema e talvez sobreviver, apesar de a primeira vista, isso não parecer provável. Concluem, no entanto, que isso é uma saída, possivelmente entre outras, que requerirá futuros estudos. Da mesma forma que se analisou as conclusões de Grijspjeerd e Herman (2003), levando-se em consideração o risco, mesmo que pequeno, da presença de *Salmonella* Enteritidis no interior do ovo e as conseqüências para a saúde de quem vai consumi-lo, é inadmissível aceitar uma inocuidade relativa baseada em dados estatísticos da possível localização da *Salmonella* spp no ovo e na expectativa de um procedimento mais econômico no que se refere ao consumo de energia. Foi comprovado neste experimento, que não obstante que o tempo de processamento possa ser considerado longo determinando um maior gasto de energia, ele é efetivo na destruição da *Salmonella* Enteritidis até

no local mais afastado da casca, a gema, onde esta apresenta melhores condições de termorresistência, determinando assim uma condição de inocuidade inequívoca sem provocar alterações significativas das qualidades e propriedades do conteúdo do ovo.

A metodologia de pesquisa de *Salmonella* spp. usada no experimento está de acordo Valentin-Bon et al. (2003), que se referindo ao *FDA*, especificam a utilização de pré-enriquecimento, enriquecimento seletivo e plaqueamento seletivo para isolamento de *Salmonella* spp. em alimentos e citam que uma vantagem deste método é a capacidade de permitir a recuperação de células injuriadas e a detecção de pequenas quantidades de células.

Jones et al. (2003), descrevem que os Procedimentos Operacionais de Sanitização Padrão foram primeiramente implementados nas indústrias de carnes e aves através das regulamentações do *FDA*, e tudo indica que esses procedimentos serão implementados na indústria processadora de ovos. Foi sugerido que a indústria de ovos em casca não necessita do mesmo nível de requerimentos de sanidade em comparação com as indústrias de carnes e aves, desde que a indústria de ovos produza ovos isentos de contaminação. Afirmam que correntemente não existem dados básicos para dar suporte ou combater este argumento. Este experimento comprova que é possível se obter ovos isentos de contaminação, mas não se considera isso uma justificativa para se relaxar nos níveis de requerimentos de sanidade nas indústria processadoras de produtos de ovos e produtos de ovos.

Segundo a *NATIONAL PASTEURIZED EGGS* (2005) a *ThermalPureTM* é a patente de um processo natural de eliminação de *Salmonella* spp. em ovos em casca, obtendo-se ovos seguros e com características sensoriais e funcionais idênticas aos ovos frescos. Segundo esta empresa, somente os ovos processados sob esta patente satisfazem o requerimento do *FDA* que determina que somente ovos pasteurizados devem ser servidos aos grupos de risco. Esta patente, independente da comprovação da sua eficácia, confirma a viabilidade do processamento testado neste experimento juntamente com a observação de Fleishchman et al. (2003) que consideram a pasteurização de ovos em casca como um caminho viável para a eliminação de bactéria patogênica sem danificar a casca, e contradiz Grijspjeerd e Herman (2003), que consideram que os processos de pasteurização de ovos em casca pesquisados são excessivamente demorados podendo resultar em algumas alterações na qualidade e propriedades do conteúdo

do ovo e que poucos pesquisadores tem investigado a aplicabilidade do tratamento com água quente para a pasteurização da superfície de ovos em casca com algum sucesso.

6 CONCLUSÕES

A ausência de *Salmonella* spp. na gema de 96 ovos (oito dúzias) dos 384 (32 dúzias) analisados indica ser baixa a ocorrência desta bactéria na gema dos ovos produzidos pela granja analisada.

O método utilizado para inoculação da gema foi efetivo na colocação das células de *Salmonella* Enteritidis (ATCC 13076) no conteúdo das gemas de ovos em casca, sem provocar danos que interferissem no desenvolvimento do experimento.

A cultura de *Salmonella* Enteritidis (ATCC 13076) com 48 horas de incubação (fase estacionária) à 35°C é sensível a temperatura de 57°C por 20 minutos na gema de ovo.

É possível elevar a temperatura da gema de ovos classificados pela granja como tipo extra branco classe A (BRASIL, 1990), através da imersão destes em água com agitação, de 24,5°C ± 2°C até 57°C em 43 minutos, viabilizando a manutenção destas a temperatura de 57°C por 20 minutos.

O tratamento de ovos em casca por imersão em água com agitação, mantendo-se a temperatura da gema a 57°C por 20 minutos é efetivo na destruição total (8 log) de *Salmonella* Enteritidis (ATCC 13076) presente nesta.

A destruição total (redução de oito ciclos log) da cultura de *Salmonella* Enteritidis (ATCC 13076) inoculada na gema indica que o método é seguro para obtenção de ovos isentos desta bactéria.

A redução obtida neste experimento foi suficiente para caracterizar os ovos processados como pasteurizados.

É possível obter ovos isentos de contaminação.

Este tratamento pode ser considerado como um processamento higiênico sanitário de ovos em casca com o objetivo torná-los inócuos aos consumidores.

7 SUGESTÕES

Levando em consideração a importância dos ovos como alimento, a possibilidade da presença de *Salmonella* Enteritidis na superfície e/ou conteúdo dos ovos, a possibilidade do consumo de ovos não aquecidos ou insuficientemente aquecidos (quanto a destruição da *Salmonella* Enteritidis), a possibilidade da ocorrência de DTA causada pela *Salmonella* Enteritidis através do consumo de ovos, os prejuízos determinados por essas DTA para os consumidores, os prejuízos determinados por essas DTA para o governo, os prejuízos determinados por essas DTA para as indústrias processadoras de ovos ou que usam ovos como matéria prima ou ingrediente, as conclusões formuladas a partir da análise dos resultados obtidos no experimento além da revisão da bibliografia, sugere-se:

1º) a formulação, por parte do Ministério da Agricultura, Pecuária e abastecimento e do Ministério da Saúde, de um programa de educação do público consumidor em geral, em especial aqueles mais sensíveis (crianças, idosos e imunodeprimidos), quanto a importância da correta manipulação e processamento dos ovos a nível doméstico, no que se refere a necessidade de manutenção destes sob refrigeração, e efetivo aquecimento (completa coagulação da gema) antes do consumo;

2º) a formulação, por parte do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e do Ministério da Saúde, de um programa de educação dos responsáveis pelos estabelecimentos produzam alimentos em cuja composição haja a presença de ovos, que direta ou indiretamente manipulam alimentos, em especial aqueles que atendem as populações mais sensíveis (crianças, idosos e imunodeprimidos), quanto a importância da correta manipulação e processamento dos ovos no que se refere a necessidade de manutenção destes sob refrigeração e efetivo aquecimento

(completa coagulação da gema) antes do consumo, ou utilização de ovos em casca certificadamente pasteurizados;

3º) o investimento do governo no desenvolvimento de tecnologias de pasteurização de ovos em casca em larga escala e nível industrial;

4º) O incentivo de pesquisas sobre delinamento da vida útil do ovo em casca pasteurizado;

5º) A revisão do Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal no que se refere ao processamento de ovos estabelecendo que todos os ovos que não sejam encaminhados para o processamento de produtos de ovos sejam obrigatoriamente pasteurizados, selados, identificados, embalados e mantidos a 7,2°C na estocagem, transporte e comercialização.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foi comprovado que a obtenção de ovos em casca inócuos para a saúde do consumidor é possível. Mas não devemos considerar que esta condição não é por si só sustentável, necessitando, para isso, de uma manipulação adequada caracterizada principalmente pela selagem dos ovos logo após o tratamento térmico, manipulação cuidadosa e manutenção em refrigeração a temperatura de 7,2°C que, como comprovado por outros pesquisadores possibilita a manutenção da inocuidade e das características sensoriais e funcionais adequadas do ovo por até seis meses.

A inocuidade e a durabilidade do ovo em casca quando se imagina a possibilidade da utilização destes em produtos especiais é de suma importância. Deve-se considerar a adoção deste produto em programas sociais do governo, possibilitando a utilização de um alimento altamente nutritivo, na sua condição natural, e por isso de fácil introdução na dieta das populações carentes.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AVICULTURA INDUSTRIAL. O ovo numa fria. Crônica: Vilões como o colesterol e a salmonela estão descaracterizando as qualidades nutricionais do ovo. [online] Disponível:

http://www.aviculturaindustrial.com.br/site/dinamica.asp?tipo_tabela=produtos&id=3809&categoria=avicultura_postura. Arquivo capturado em junho de 2005.

APINCO. Vacinação contra *Salmonella*. Pesquisadora alemã destaca a eficácia da vacina viva no controle das *Salmonella* Enteritidis e Typhimurium na Conferência Apinco. [online] Disponível:

http://www.aviculturaindustrial.com.br/site/dinamica.asp?tipo_tabela=especiais&id=4403&categoria=coberturas_on_line. Arquivo capturado em junho de 2005.

ASSOCIAÇÃO PAULISTA DE AVICULTURA. Ovos: dicas para o consumo saudável. Cuidados como refrigeração e cozimento garantem que a ingestão do alimento traga resultados positivos para a saúde, alerta a APA. [online] Disponível: http://www.aviculturaindustrial.com.br/site/dinamica.asp?tipo_tabela=produtos&id=8738&categoria=avicultura_postura. Arquivo capturado em junho de 2005.

ARAÚJO, E.; PACHECO, M.A.S.R.; BONI, R.F.; FONSECA, Y.S.K.; GELLI, D.S.; FERNANDES, S.A.; TAVECHIO, A.T. Surtos alimentares por *Salmonella* Enteritidis associados ao consumo de alimentos à base de ovos, em Sorocaba, SP. *Revista Higiene Alimentar*, v.9, n.40, p.24-26. 1995.

BAKER, R.C. Survival of *Salmonella* Enteritidis on and in shelled eggs, liquid eggs, and cooked egg products. *Dairy, Food and Environmental Sanitation*, v.10, n.5, p.273-275. 1990.

BARNES, G.H.; EDWARDS, A.T. An investigation into an outbreak of *Salmonella* Enteritidis phage-type 4 infection and the consumption of custard slices and trifles. *Epidemiology and Infection*, v.109, p.397-403. 1992.

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

BICHLER, L.A; NAGARAJA, K.V.; HALVORSON, D.A. *Salmonella* Enteritidis in eggs, cloacal swab specimens, and internal organs of experimentally infected white leghorn chickens. *American Journal of Veterinary Research*, v.57, n.4, p.489-495. 1996.

BINKIN, N.; SCUDERI, G.; NOVACO, F.; GIOVANARDI, G.L.; PAGANELLI, G.; FERRARI, G.; CAPPELLI, O.; RAVAGLIA, L.; ZILIOLO, F.; AMADEI, V.; MAGLIANI, W.; VIANI, I.; RICCÒ, D.; BORRINI, B.; MAGRI, M.; ALESSANDRINI, A.; BURSI, G.; BARIGAZZI, G.; FANTASIA, M.; FILETICI, E.; SALMASO, S. Egg-related *Salmonella* Enteritidis, Italy, 1991. *Epidemiology and Infection*, v.110, p.227-237. 1993.

BLACKBURN, C.W.; CURTIS, L.M.; HUMPHESON, L.; BILLON, C.; MCCLURE, P.J. Development of thermal inactivation models for *Salmonella* Enteritidis and *Escherichia coli* O157:H7 with temperature, pH and NaCl as controlling factors. *International Journal of Food Microbiology*, v.38, p.31-44. 1997.

BOARD, H.R. Review article: the course of microbial infection of the hen's egg. *Journal of Applied Bacteriology*, v.44, p.319-341. 1966.

BOYCE, T.G.; KOOD, D.; SWERDLOW, D.L.; GOMES, T.M.; SERRANO, B. NICKEY, L.N.; HICKMAN-BRENNER, F.W.; MALCOLM, G.B.; GRIFFIN, P.M. Recurrent outbreaks of *Salmonella* Enteritidis infections in a Texas restaurant: phage type 4 arrives in the United States. *Epidemiology and Infection*, v.117, p.29-34. 1996.

BRACKETT, R.E.; SCHUMAN, J.D.; BALL, H.R.; SCOUTEN, A.J. Thermal inactivation kinetics of *Salmonella* spp. within intact eggs heated using humidity-controlled air. *Journal of Food Protection*, v.64, n.7, p.934-938. 2001.

BRADSHAW, J.G.; DHIRENDRA, B.S.; FORNEY, E.; MADDEN, J.M. Growth of *Salmonella* Enteritidis in yolk of shell eggs from normal and seropositive hens. *Journal of Food Protection*, v.53, n.12, p.1033-1036. 1990.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Defesa Animal. Coordenação de Laboratório Animal. *Métodos de Análise Microbiológica para Alimentos*. Capítulo 28. Soluções e reagentes. p.1-21, 2000.

_____. _____. _____. _____. Instrução Normativa SDA nº 62, de 26 de agosto de 2003. *Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água*, Anexo IV. Procedimentos para Contagem de Colônias. p.138-148, 2003a.

_____. _____. _____. _____. Instrução Normativa SDA nº 62, de 26 de agosto de 2003. *Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água*, Capítulo I. Contagem Padrão de Microrganismos Mesófilos Aeróbios Estritos e Facultativos Viáveis. p.1-2, 2003b.

_____. _____. _____. _____. Instrução Normativa SDA nº 62, de 26 de agosto de 2003. *Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água*, Capítulo XV. Pesquisa de *Salmonella*. p.63-72, 2003c.

_____. _____. _____. Instrução Normativa SDA nº 22, de 12 de agosto de 1999. *Normas Técnicas para Controle e Certificação de Núcleos e Estabelecimentos Avícolas como Livre de *Salmonella Gallinarum* e de *Salmonella Pullorum* e Livre ou Controlado para *Salmonella Enteritidis* e para *Salmonella Typhimurium**. Diário Oficial

da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, p. 17, 19 de agosto de 1999. Seção 1.

_____. _____. _____. Divisão de Inspeção de Carnes e Derivados – DICAR. Portaria Nº 01, de 21 de Fevereiro de 1990. *Normas Gerais de Inspeção de Ovos e Derivados*. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, n.44, p. 4321, 6 de mar. 1990. Seção 1.

BUCK, J.D.; IMMERSEEL, F.V.; MEULEMANS, G.; HAESBROUCK, F.; DUCATELLE, R. Adhesion of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis isolates to chicken isthmal glandular secretions. *Veterinary Microbiology*, v.93, p.223-233. 2003.

BURKE, W.H. Reprodução das aves. In: SWENSON M.J. & REECE W.O. DUKES. *Fisiologia dos Animais Domésticos*. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. cap. 38. p.660-680.

CAFFER, M.I.; EIGUER, T. *Salmonella* Enteritidis in Argentina. *International Journal of Food Microbiology*, v.21, p.15-19. 1994.

CDC. Epidemiologic notes and reports update: *Salmonella* Enteritidis infections in the northeastern United States. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, v.36, n.13, p.204-205. 1987.

_____. Outbreaks of *Salmonella* Enteritidis infection associated with consumption of raw shell eggs, 1991. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, v.41, n.21, p.369-372. 1992.

_____. Outbreaks of *Salmonella* Serotype Enteritidis infection associated with consumption of raw shell eggs – United States, 1994-1995. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, v.49, n.4, p.73-79. 2000.

_____. Outbreaks of *Salmonella* Serotype Enteritidis infection associated with eating raw or undercooked shell eggs – United States, 1996-1998. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, v.45, n.34, p.737-742. 1996.

_____. Outbreaks of *Salmonella* Serotype Enteritidis infection associated with eating shell eggs – United States, 1999-2001. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, v.51, n.51-52, p.1149-1152. 2003.

_____. Update: *Salmonella* Enteritidis Infections and grade A shell eggs – United States. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, v.37, n.32, p.490-496. 1988.

_____. Update: *Salmonella* Enteritidis Infections and shell eggs – United States, 1990. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, v.39, n.50, p.909-912. 1990.

CHANG, Y.H. Research note. Prevalence of *Salmonella* spp. In poultry broilers and shell eggs in Korea. *Journal of Food Protection*, v.63, n.5, p.655-658. 2000.

CHANTARAPANONT, W.; SLUTSKER, L.; TAUXE, R.V.; BEUCHAT, L.R. Factors influencing inactivation of *Salmonella* Enteritidis in hard-cooked eggs. *Journal of Food Protection*, v.63, n.1, p.36-43. 2000.

CHEN, H.; RAMASWAMY, C.; ANANTHESWARAN; KNABEL, S.J. Optimization of iron supplementation for enhanced detection of *Salmonella* Enteritidis in eggs. *Journal of Food Protection*, v.64, n.9, p.1279-1285. 2001.

CLAY, C.E.; BOARD, R.G. Growth of *Salmonella* Enteritidis in artificially contaminated hens shell eggs. *Epidemiology and Infection*, v.106, p.271-281. 1991.

COGAN, T.A.; DOMINGUE, G.; LAPPIN-SCOTT, H.M.; BENSON, C.E.; WOODWARD, M.J.; HUMPHREY, T.J. Growth of *Salmonella* Enteritidis in artificially contaminated eggs: the effects of inoculum size and suspending media. *International Journal of Food Microbiology*, v.70, p.131-141. 2001.

COHEN, M.L.; BLAKE, P.A. Trends in foodborne salmonellosis outbreaks: 1963-1975. *Journal of Food Protection*, v.40, p.798-800. 1977.

COWDEN, J.M.; CHISHOLM, D.; O'MAHONY, M.; LYNCH, D. Two outbreaks of *Salmonella* Enteritidis phage type 4 infection associated with the consumption of fresh shell-egg products. *Epidemiology and Infection*, v.103, p.47-52. 1989.

COX, N.A.; BAILEY, J.S.; MAULDIN, J.M.; BLANKENSHIP, L.C.; WILSON, J.L. Research note: Extent of *Salmonellae* contamination in breeder hatcheries. *Poultry Science*, v.70, p. 416-418. 1991.

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

CUNNINGHAM, F.E. Egg-Product Pasteurization. In: STADELMAN, W. J. & COTTERILL, O. J. *Egg Science and Technology*. 4. ed. Binghamton: New York, 1995. cap. 12, p. 289-321.

DAVIS, R.H.; BRESLIN, M. Effects of vaccination and other preventive methods for *Salmonella* Enteritidis on commercial laying chicken farms. *Veterinary Record*, v.153, p. 673-677. 2003a.

_____.; _____. Environmental contamination and detection of *Salmonella enterica* serovar *Enteritidis* in laying flocks. *Veterinary Record*, v.149, p. 699-704. 2001.

_____.; _____. Observations on *Salmonella* contamination of commercial laying farms before and after cleaning and disinfection. *Veterinary Record*, v.152, p. 283-287. 2003b.

DERA-TOMASZEWSKA, B.; WYSOCKI, J.; KUNILOWSKA, H.D.; GLOSNIICKA, R. Hsp60 specific antibodies in egg yolks from laying hens naturally infected with *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar *Enteritidis*. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*, v.26, p.37-45. 2003.

DESMIDT, M.; DUCATELLE, R.; HAESBROUCK, F.; DE GROOT, P.A.; VERLINDEN, M.; WIJFFELS, R.; HINTON, M.; BALE, J.A.; ALLEN, V.M. Detection of antibodies to *Salmonella* Enteritidis in sera and yolks from experimentally and naturally infected chickens. *Veterinary Record*, v.138, n.10, p.223-236. 1996.

DIBB-FULLER, M.P.; WOODWARD, M.J. Contribution of fimbriae and flagella of *Salmonella* Enteritidis to colonization and invasion of chicks. *Avian Pathology*, v.29, p.295-304. 2000.

DHILLON, A.S.; SHIVAPRASAD, P.R.; ALISANTOSA, B.; SCHABERG, D.; BANDLI, D.; JOHNSON, S. Pathogenicity of environmental origin *Salmonella* in specific pathogen-free chicks. *Poultry Science*, v.80, p.1323-1328. 2001.

FDA. Food labeling, safe handling statements, labeling of shell eggs; refrigeration of shell eggs held for retail distribution. Food and Drug Administration, HHS. Final Rule. *Fed. Regist*, v.65, p.76092-76114. 2000.

FELLOWS, P. *Tecnología del procesado de los alimentos: principios y prácticas*. Zaragoza: Acribia, 1994. 549p. cap. 10. p. 209-220.

FIORENTIN, L. Informe Embrapa Redação AI (Edição 1085/Anuário 2001). *Salmonella* Enteritidis - Um caso interessante de dinâmica de populações bacterianas. [online] Disponível: http://www.aviculturaindustrial.com.br/site/dinamica.asp?tipo_tabela=cet&id=83&categoria=saude_animal. Arquivo capturado em 22 de dezembro de 2000.

FLEISCHMAN, G.J.; NAPIER, C.L.; STEWARD, D.; PALUMBO, S.A. Effect of temperature on the growth response of *Salmonella* Enteritidis inoculated onto the vitelline membranes of fresh eggs. *Journal of Food Protection*, v.66, n.8, p.1368-1373. 2003.

FUZHARA, T.O.; NUNES, S.M.; DAL COL, R. Surtos de toxinfecção por *Salmonella* Enteritidis. In: Congresso Brasileiro de Microbiologia, 18°, Santos, 1995. Anais, p.104.

GAST, R.K. Evaluation of direct plating for detecting *Salmonella* Enteritidis in pools of egg contents. *Poultry Science*, v.72, p. 1611-1614. 1993.

_____; BEARD, C.W. Isolation of *Salmonella* Enteritidis from internal organs of experimentally infected hens. *Avian Diseases*, v.34, p. 991-993. 1990a.

_____; _____. Production of *Salmonella* Enteritidis contaminated eggs by experimentally infected hens. *Avian Diseases*, v.34, p. 438-446. 1990b.

_____; _____. Detection and Enumeration of *Salmonella* Enteritidis in Fresh and Stored Eggs Laid by Experimentally Infected Hens. *Journal of Food Protection*, v.55, n.3, p.152-156. 1992.

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

_____; _____. Differences in the multiplication of *Salmonella* Enteritidis strains in liquid whole egg: implication for detecting contaminated eggs from commercial laying flocks. *Poultry Science*, v.74, p.893-897. 1995a.

_____. Influence of the level and localization of contamination on the multiplication of *Salmonella* Enteritidis at different storage temperature in experimentally inoculated eggs. *Poultry Science*, v.79, p.559-563. 2000.

_____. Iron supplementation to enhance the recovery of *Salmonella* Enteritidis from pools of egg contents. *Journal of Food Protection*, v.58, n.3, p.268-272. 1995b.

_____.; PETTER, J.G.; HOLT, P.S. Characteristics of *Salmonella* Enteritidis contamination in eggs after oral, aerosol, and intravenous inoculation of laying hens. *Avian Diseases*, v.46, p.629-635. 2002.

_____.; _____.; _____. Effect of prior serial in vivo passage on the frequency of *Salmonella* Enteritidis contamination in eggs from experimentally infected laying hens. *Avian Diseases*, v.47, p.633-639. 2003.

_____.; POTTER, J.G.; HOLT, P.S. Applying tests for specific yolk antibodies to predict contamination by *Salmonella* Enteritidis in eggs from experimentally infected laying hens. *Avian Diseases*, v.41, p.195-202. 1997.

GIRARD-SANTOSUOSSO, O.; MENANTEAU, P.; DUCHET-SUCHAUX, M.; BERTHELOT, F.; MOMPART, F.; PROTAIS, J.; COLIN, P.; GUILLOT, J.F.; BEAUMONT, C.; LANTIER, F. Variability in the resistance of four chicken lines to experimental intravenous infection with *Salmonella* Enteritidis phage type 4. *Avian Diseases*, v.42, p.462-469. 1998.

GRIJSPEERDT, K. Modeling the penetration and growth of bacteria in eggs. *Food Control*, v.12, p. 07-11. 2001.

_____.; HERMAN, L. Inactivation of *Salmonella* Enteritidis during boiling of eggs. *International Journal of Food Microbiology*, v.82, p. 13-24. 2003.

HALL, R.L. Foodborne illness: implications for the future. *Emerging Infectious Diseases*, v.4, n.4, p.555-559. 1997.

HAMMACK, T.S.; SHERROD, P.S.; VERNEAL, R.; BRUCE, G.A.; SATCHELL, F.B.; ANDREWS, W.H. Research note. Growth of *Salmonella* Enteritidis in grade A eggs during prolonged storage. *Poultry Science*, v.72, p.373-377. 1993.

HARA-KUDO, Y.; KUMAGAI, S.; MASUDA, T.; GOTO, K.; OHTSUKA, K.; MASAKI, H.; TANAKA, H.; TANNO, K.; MIYAHARA, M.; KONUMA, H. Detection of *Salmonella* Enteritidis in shell and liquid eggs using enrichment and plating. *International Journal of Food Microbiology*, v.64, p.395-399. 2001a.

_____.; SAKAKIBARA, Y.; KONUMA, H.; SAWADA, T.; KUMAGAI, S. Laying season and egg shell cracks on the growth of *Salmonella* Enteritidis in the egg albumen during storage. *Journal of Food Protection*, v.64, p.1134-1137. 2001b.

HIMATHONGKHAM, S.; RIEMANN, H.; ERNST, R. Efficacy of disinfection of shell eggs externally contaminated with *Salmonella* Enteritidis, implications for egg testing. *International Journal of Food Microbiology*, v.49, p.161-167. 1999.

HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.A.; STALEY, J.T.; WILLIAMS, S.T. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9th. Baltimore, Maryland; Willians and Wilkins, 1994. 787p. v.2.

HOLT, P.S. Effect of induced molting on the susceptibility of white leghorn hens to a *Salmonella* Enteritidis infection. *Avian diseases*, v.87, p.412-417. 1992.

_____.; MACRI, N.P.; PORTER, R.E. Microbiological analysis of the early *Salmonella* Enteritidis infection in molted and unmolted hens. *Avian diseases*, v.39, p.55-63, 1995.

_____.; STONE, H.D.; GAST, R.K.; PORTER, R.E. Growth of *Salmonella* Enteritidis (SE) in egg contents from hens vaccinated with an SE bacterin *Food Microbiology*, v.13, p.417-426. 1996.

HOPPER, S.A; MAWER, S. *Salmonella* Enteritidis in a commercial layer flock. *Veterinary Record*, v.123, p.351. 1988.

HOU, H. SINGH, R.K.; MURIANA, P.M.; STADELMAN, W.J. Pasteurization of intact shell eggs. *Food Microbiology*. v.12, p.93-101. 1996.

HUMPHREY, T.J. Contamination of egg shell and contents with *Salmonella* Enteritidis: a review. *International Journal of Food Microbiology*, v.21, p.31-40. 1994.

_____.; BASKERVILLE, A; MAWER, S.; ROWE, B.; HOPPER, S. *Salmonella* Enteritidis phage type 4 from the contents of intact eggs: a study involving naturally infected hens. *Epidemiology and Infection*, v.103, p.415-423. 1989a.

_____.; CHAMPMAN, P.A.; ROWE, B.; GILBERT, R.J. A comparative study of the heat resistance of *Salmonella* in homogenized whole egg yolk, egg yolk or albumen. *Salmonella* Enteritidis. *Epidemiology and Infection*, v.104, p.237-241. 1990a.

_____.; GREENWOOD, M.; GAWLER, A.H.L.; HENLEY, A.; ROWE, B. Numbers of *Salmonella* Enteritidis in the contents of naturally contaminated hens' eggs. *Epidemiology and Infection*, v.106, p.489-496. 1990b.

_____.; _____.; GILBERT, R.J.; ROWE, B.; CHAPMAN, P.A. The survival of *Salmonella* in shell eggs cooked under simulated domestic conditions. *Epidemiology and Infection*, v.103, p.35-45. 1989b.

_____.; WHITEHEAD, A. Egg age and the growth of *Salmonella* Enteritidis in egg contents. *Epidemiology and Infection*, v.111, p.209-219. 1993.

_____.; _____.; GAWLER, A.H.L.; HENLEY, A.; ROWE, B. Numbers of *Salmonella* Enteritidis in the contents of naturally contaminated hens' eggs. *Epidemiology and Infection*, v.106, p.489-496. 1991.

INSTITUTOHUEVO. Setor económico - historia. [online] Disponível: <http://www.institutohuevo.com/scripts/historia.asp>. Arquivo capturado em 15 de Novembro de 2002a.

_____. El huevo en la alimentación y la salud. [online] Disponível: <http://www.institutohuevo.com/scripts/saludable.asp> Arquivo capturado em 15 de Novembro de 2002b.

IRINO, D.; FERNANDES, S.A.; TAVECHIO, A.T. NEVES, B.C.; DIAS, A.M.G. Progression of *Salmonella* Enteritidis phage type 4 strains in São Paulo State, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v.38, p.193-196. 1996.

JAMES, C.; LECHEVALIER, V.; KETTERINGHAM, L. Surface pasteurization of shell eggs. *Journal of Food Engineering*, v.53, p.193-197. 2002.

JAY, J.M. *Microbiologia moderna de los alimentos*. 3ed. Zaragoza: Editorial Acribia, 1994a. 803p. Capítulo 14. p.399-422.

JAY, J.M. *Microbiologia moderna de los alimentos*. 3ed. Zaragoza: Editorial Acribia, 1994b. 803p. Capítulo 22. p.651-684.

JONES, D.R.; NORTHCUTT, J.K.; MUSGROVE, M.T.; CURTIS, P.A.; ANDERSON, K.E.; FLETCHER, D.L.; COX, N.A. Survey of shell egg processing plant sanitation programs: Effects on egg contact surfaces. *Journal of Food Protection*, v.66, n.8, p.1486-1489. 2003.

KAKU, M.; PERESI, J.T.M.; TAVECHIO, A.T.; FERNANDES, S.A.; BATISTA, A.B.; CASTANHEIRA, I.A.Z.; GARCIA, G.M.P.; IRINO, K.; GELLI, D.S. Surto alimentar por *Salmonella* Enteritidis no noroeste do Estado de São Paulo, Brasil. *Revista de Saúde Pública*, v.29, p.127-131. 1995.

KELLER, L.H.; BENSON, C.E.; KROTEK, K.; ECKROADE, R.J. *Salmonella* Enteritidis colonization of the reproductive tract and forming and freshly laid eggs of chickens. *Infection and Immunity*, v.63, n7. p.2443-2449. 1995.

KINDE, H.; READ, D.H.; CHIN, R.P.; BICKFORD, A.A.; WALKER, R.L.; ARDANS, A.; BREITMEYER, R.E.; WILLOUGHBY, D.; LITTLE, H.E.; KERR, D.; GARDNER, I.A. *Salmonella* Enteritidis, phage type 4 infection in a commercial layer flock in southern California: bacteriological and epidemiologic findings. *Avian Diseases*, v.40, p.665-671. 1996.

KUO, F.; CAREY, J.B.; RICKE, S.C. UV irradiation of shell eggs: Effect on populations of aerobes, molds, and inoculated *Salmonella* Typhimurium. *Journal of Food Protection*, v.60, n.6, p.639-643. 1997.

LE MINOR, L. Genus *Salmonella* In: KRIEG, N.R.; HOLT, J.G. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore, the William and Wilkins Co. v.II, 1984.

LINDELL, K.A.; SAEED, A.M.; MACCABE, G.P. Evaluation of resistance of four strains of commercial laying hens to experimental infection with *Salmonella* Enteritidis phage type eight. *Poultry Science*, v.73, p.757-762. 1994.

LU, S.; KILLORAN, P.B.; RILEY, L.W. Association of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis YafD with resistance to chicken egg albumen. *Infection and Immunity*, v.71, n.12, p.6734-6741. 2003.

MADDEN, J.M. *Salmonella* Enteritidis contamination of whole chicken eggs. *Dairy, Food and Environmental Sanitation*, v.10, n.5, p.268-270. 1990.

MASON, J. *Salmonella* Enteritidis control programs in the United States. *International Journal of Food Microbiology*, v.21, p.155-169. 1994.

MCGRUDER, E.D.; RAMIREZ, G.A.; KOGUT, M.H.; MOORE, R.W.; CORRIER, D.E.; DELOACH, J.R.; HARGIS, B.M. In ovo administration of *Salmonella* Enteritidis immune lymphokines confers protection to neonatal chicks against *Salmonella* Enteritidis organ infectivity. *Poultry Science*, v.74, n1. p.18-25. 1995.

MEAD, P.S.; SLUTSKER, L.; DIETZ, V.; MCCAIG, L.F.; BRESEE, J.S.; SHAPIRO, P.M.; GRIFFIN; TAUXE, R.V. Food-related illness and death in the United States. *Emerging Infectious Diseases*, v.5, p.607-625. 1999.

MENDES, A.A. Alimento perfeito. *Avicultura Industrial*. n.3, p. 32-33. 2002.

MERMELSTEIN, N.H. Pasteurized of Shell egg. *Food Technology*, v.55, n.12, p.72-73,79. 2001.

MESSENS, W.; DUBOCCAGE, L.; GRIJSPEERDT, K.; HEYNDRICKX, M.; HERMAN, L Growth of *Salmonella* serovars in hens' egg albumen as affected by storage prior to inoculation. *Food Microbiology*, v.21, p.25-32. 2004.

_____.; GRIJSPEERDT, K.; HERMAN, L. A survey on institutional users of shell eggs and egg products in Flanders. *Journal off Food Safety*, v.22, p.273-290. 2002.

METHNERA, U.; BARROWB, P.A.; MARTINA, G.; MEYERA, H. Prevenção contra *Salmonella* Um estudo comparativo do efeito protetor contra a colonização por *Salmonella* em pintos SPF recém-nascidos, usando vacina viva de variantes atenuadas de *Salmonella*, variantes tipo selvagem ou produto de exclusão competitiva. [online] Disponível: http://www.aviculturaindustrial.com.br/site/dinamica.asp?tipo_tabela=cet&id=1652&categoria=saude_animal. Arquivo capturado em junho de 2005.

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

_____.; HORIE, T.; BABA, E.; SASAI, K.; FUKATA, T.; ARAKAWA, A. *Salmonella* penetration through eggshell associated with freshness of laid eggs and refrigeration. *Journal of Food Protection*, v.61, n.3, p.350-353. 1998.

MOLBAK, K.; NELMANN, J. Risk factors for sporadic infection with *Salmonella* Enteritidis, Denamark, 1997-1999. *American Journal of Epidemiology*, v.156, p.654-661. 2002.

MORSE, D. L.; BIRKHEAD, G. S.; GUARDINO, J.; KONDRACKI, S. F. Outbreak and sporadic egg-associated cases of *Salmonella* Enteritidis: New York's experience. *American Journal of Public Health*, v.84, n.5, p.859-860, 1994.

MOTA, C.C.S.; VIEIRA, H.R.A.; PUZYNA, I.P.; KALACHE, J.; KONOLSAISEN, J.F.; CAMARGO, N.J. Toxi-infecção alimentar por *Salmonella* Enteritidis: relato de um surto ocorrido em Curitiba-PR, Brasil/julho de 1981. *Revista Higiene Alimentar*, v.2, n.3, p.123-131. 1983.

MUMMA, G.A.; GRIFFIN, P.M.; MELTZER, M.I.; BRADEN, C.R.; TAUXE, R.V. Egg quality assurance programs and egg-associated *Salmonella* Enteritidis infections, United States. *Emerging Infectious Diseases*, v.10, n.10, p. 1782-1789. 2004.

NASCIMENTO, V.P.; CRANSTOUN, S.; SOLOMON, S.E. Relationship between shell structure and movement of *Salmonella* Enteritidis across the eggshell wall. *British Poultry Science*, v.33, p.37-48. 1992.

NATIONAL PASTEURIZED EGGS. [online] Disponível: <http://www.safeeggs.com/index.html> Arquivo capturado em junho de 2005.

OKAMURA, M.; MIYAMOTO, T.; KAMIJIMA, Y.; TANI, H.; SASAI, K.; BABA, E. Differences in abilities to colonize reproductive organs and to contaminate eggs in intravaginally inoculated hens and in vitro adherences to vaginal explants between *Salmonella* Enteritidis and other *Salmonella* serovars among. *Avian Diseases*, v.45, p.962-971. 2001.

PALMER, S.; PARRY, S.; PERRY, D.; SMITH, R.; EVANS, M.; NEHAUL, L.; ROBERTS, R.; WALAPU, M.; WRIGHT, D. The role of outbreaks in developing food safety: population based surveillance of *Salmonella* outbreaks in Wales 1986-1998. *Epidemiology and Infection*, v.125, p.467-472. 2000.

PARRY, S.M.; PALMER, S.R.; SLADER, J.; HUMPHREY, T. Risk factors for *Salmonella* food poisoning in the domestic kitchen – a case control study. *Epidemiology and Infection*, v.129, p.277-285. 2002.

PERESI, J.T.M.; ALMEIDA, I.A.Z.C.; LIMA, S.I.; MARQUES, D.F.; RODRIGUES, E.C.A.; FERNANDES, S.A.; GELLI, D.S.; IRINO, K. Surtos de enfermidades transmitidas por alimentos causados por *Salmonella* Enteritidis. *Revista de Saúde Pública*, v.32, p.477-483. 1998.

PISSANI, B.; ROCHA, M.M.M.; SIMÕES, M.; PRANDI, M.A.G.; BONWOART, P.A.G.; IRINO, K.; NEVES, B.C.; BEVILACQUA, A.R.P.A. *Salmonella* Enteritidis: elucidação de surtos ocorridos na região de Campinas, de setembro de 1994 a junho de 1995. In: Congresso Brasileiro de Microbiologia, 18º, Santos, 1995. *Anais*. p.80.

POMBO, C.R. *Efeito do Tratamento Térmico de Ovos Inteiros na Perda de Peso e Características de Qualidade Interna*. 2003. 74 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária - Área de Concentração em Ciência, Higiene e Tecnologia de Alimentos) - Faculdade Medicina Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ. 2003.

POTTER, N. N.; HOTCHKISS, J. H. Food Science. *Food Science*. 5.ed. Estados Unidos da América: Chapman & Hall, 1995. cap. 14. p. 316- 344.

POPOFF, M. Y.; LE MINOR, L. Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars, 7th revision. Paris. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. Institut Pasteur, Paris, France, 1997.

PRESIDENT'S COUNCIL ON FOOD SAFETY. Egg Safety from production to consumption: an action plan to eliminate *Salmonella* Enteritidis Illnesses due to Eggs. 1999. [online] Disponível: <http://www.foodsafety.gov/~fsg/cegs.html>. Arquivo capturado em junho de 2003.

PROTAIS, J.; COLIN, P.; BEAUMONT, C.; GUILLOT, J.F.; LANTIER, F.; PARDON, P.; BENNEJEAN, G. Line differences in resistance to *Salmonella* Enteritidis PT4 infection. *British Poultry Science*, v.37, p.329-339. 1996.

RABSCH, W.; HARGIS, B.M.; TSOLIS, R.M.; KINGSLEY, R.A.; HINS, K.; TSCHAPE, H.; BAUMLER, A. Competitive exclusion of *Salmonella* Enteritidis by *Salmonella* Gallinarum in poultry. *Emerging Infectious Diseases*, v.6, n.5, p.443-448. 2000.

RADKOWSKI, M. Short communication. Occurrence of *Salmonella* spp. in consumption eggs in Poland. *International Journal of Food Microbiology*, v.64, p.189-191. 2001.

REIBER, M.A.; CONNER, D.E. Effect of mating activity on the ability of *Salmonella* Enteritidis to persist in the ovary and oviduct of chickens. *Avian Diseases*, v.39, p.323-327. 1995.

_____; _____; BILGILI, S.F. *Salmonella* colonization and shedding patterns of hens inoculated via semen. *Avian Diseases*, v.39, p.317-322. 1995a.

_____; MCINROY, J.A.; CONNER, D.E. Enumeration and identification of bacteria in chicken semen. *Poultry Science*, v.74, p.795-799. 1995b.

RODRIGUE, D.C.; CAMERON, D.N.; PUHR, N.D. Comparison of plasmid profiles, phage types, and antimicrobial resistance patterns of *Salmonella* Enteritidis isolates in the United States. *Journal of Clinical Microbiology*, v.30, n.4, p.854-857. 1992.

_____; TAUXE, R.V.; ROWE, B. International increase in *Salmonella* Enteritidis: a new pandemic? *Epidemiology and Infection*, v.105, p.21-27. 1990.

SAEED, M.A.; KOONS, C.W. Growth and Heat Resistance of *Salmonella* Enteritidis in Refrigerated and Abused Eggs. *Journal of Food Protection*, v.56, n.11, p.927-931. 1993.

SANDERS, E.; SWEENEY, F.J.; FRIEDMAN, E.A.; BORING, J.R.; RANDALL, E.L.; POLK, L.D. An outbreak of hospital-associated infections due to *Salmonella* derby. *Journal Of The American Medical Association*, v.186, p.984-986. 1964.

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.

SCHUMAN, J.D.; SHELDON, B.W.; VANDEPOPULIERE, J.M.; BALL, H.R. Immersion heat treatments for inactivation of *Salmonella* Enteritidis with intact eggs. *Journal of Applied Microbiology*, v.83, p.438-444. 1997.

SEO, K.H.; HOLT, P.S.; GAST, R.K. Comparison of *Salmonella* Enteritidis infection in hens molted via long-term feed withdrawal versus full-fed wheat middling. *Journal of Food Protection*, v.64, n.12, p.1917-1921. 2001.

SERRANO, L.E.; MURANO, E.A.; SHENOY, K.; OLSON, D.G. D-values of *Salmonella* Enteritidis isolates and quality attributes of Shell eggs and liquid whole eggs treated with irradiation. *Poultry Science*, v.76, p.202-205. 1997.

SHARP, J.C.M. Salmonellosis and eggs: more information needed, meanwhile avoid raw egg. *British Medical Journal*, v.297, p.1557-1558. 1988.

SILVA, E.N.; DUARTE, A. *Salmonella* Enteritidis em aves: Retrospectiva no Brasil. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*, v.4, n.2, p.85-100. 2002.

STADELMAN, W.J. The Preservation of Quality in Shell Eggs. In: STADELMAN, W. J. & COTTERILL, O. J. *Egg Science and Technology*. 4. ed. Binghamton: New York, 1995. cap. 4, p. 67-79.

STADELMAN, W.J.; SINGH, R.K.; MURIANA, P.M.; HOU, H. Pasteurization of eggs in the shell. *Poultry Science*, v.75, p.1122-1125. 1996.

ST. LOUIS, M.E.; MORSE, D.L.; POTTER, M.E. The emergence of grade A eggs as a major source of *Salmonella* Enteritidis infections: new implications for the control of salmonellosis. *Journal of the American Medical Association*, v.259, p.2103-2107. 1988.

TAUXE, R.V. Emerging Foodborne Diseases: An evolving Public Health Challenge. *Emerging Infectious Diseases*, v.3, n.4, p.425-434. 1997.

TAVECHIO, A.T.; GHILARDK, A.C.R.; PERESI, J.T.M.; FUZIHARA, T.O.; YONAMINE, E.K.; JAKABI, M.; FERNANDES, S.A. *Salmonella* serotypes isolated from nonhuman sources ins São Paulo, Brazil, from 1996 through 2000. *Journal of Food Protection*, v.65, n.6, p.1041-1044. 2002.

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

_____; _____; TUREK, J.; ASEM, E.K. In vitro attachment and invasion of chicken ovarian granulose cells by *Salmonella* Enteritidis phage type 8. *Infection and Immunity*, v.64, n.12, p.5015-5021. 1996.

THORNE, G.C. *Salmonella*: The chickens and the eggs. *Clinical Microbiology Newsletter*, v.13, n.9, p.65-68. 1991.

TODD, E. C. D. Poultry-associated foodborne disease-its occurrence, cost, source and prevention. *Journal of Food Protection*, v.43, n.2, p.129-139. 1980.

TRABULSI, L.R.; Microbiologia. 2 ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 1996. Cap. 27, p. 157-160: *Salmonella – Shigella*.

VALENTIN-BOM, I.E.; BRACKETT, K.H.; SEO, K.H.; HAMMACK, T.S.; ANDREWS, W.H. Preenrichment versus direct selective agar plating for the detection of *Salmonella* Enteritidis in shell eggs. *Journal of Food Protection*, v.66. n.9, p.1670-1674. 2003

VIEIRA, S. Consumo de ovos e qualidade de vida. *Revista Higiene Alimentar*, v.15, n.88, p.16, 2001.

WALFORD, D.; NOAH, N. Emerging Infectious Diseases – United Kingdom. *Emerging Infectious Diseases*, v.5, n.2, p.189-194. 1999.

WANG, H.; SLAVIK, M.F. Bacterial penetration into eggs washed with various chemicals and stored at different temperatures and times. *Journal of Food Protection*, v.61, n.3, p.276-279. 1998.

WATKINS, B.A. The nutritive value of the egg. In: STADELMAN, W. J. & COTTERILL, O.J. *Egg Science and Technology*. 4. ed. Binghamton, New York, 1994. 591p. cap. 7, p. 177-194.

WEGENER, H.C.; HALD, T.; WONG, D.L.F.; MADSEN, M.; KORSGAARD, H.; BAGER, F.; GERNER-SMIDT, P.; MOLBAK, K. *Salmonella* control programs in Denmark. *Emerging Infectious Diseases*, v.9, n.7, p.774-780. 2003.

10 APÊNDICES



Apêndice 1. Visão parcial da Câmara onde se realizou o processamento das amostras



Apêndice 2. Visão parcial da Câmara onde se realizou o processamento das amostras.



Apêndice 3. Visão parcial da Câmara onde se realizou o processamento das amostras.



Apêndice 4. Ovos identificados e organizados em quatro grupos.



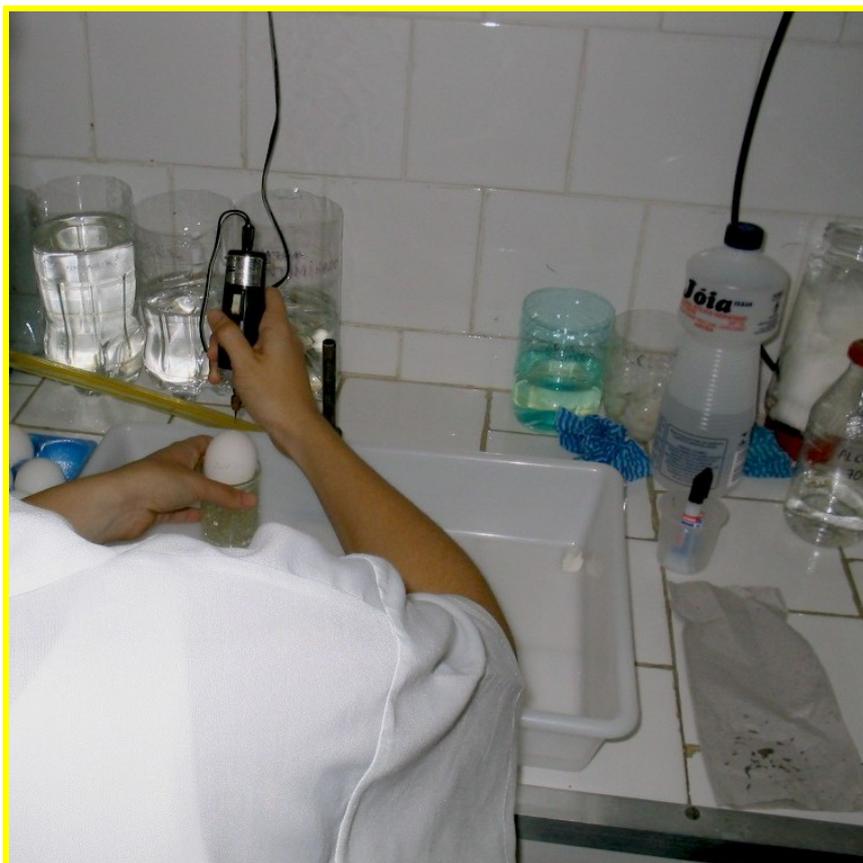
Apêndice 5. Preparação da seringa de inoculação.



Apêndice 6. Desinfecção do local de perfuração.



Apêndice 7. Desinfecção da broca do “mini drill”.



Apêndice 8. Perfuração do ovo.



Apêndice 9. Inoculação do ovo.



Apêndice 10. Colocação do selante no orifício.



Apêndice 11. Ovos na cesta plástica.



Apêndice 12. Aquecimento dos ovos.



Apêndice 13. Pasteurização de ovos inoculados.



Apêndice 14. Desinfecção do ovo para abertura.



Apêndice 15. Quebra do ovo.



Apêndice 16. Retirada de alíquotas da gema.



Apêndice 17. Colocação de alíquotas da gema no envelope de *stomacher*.



Apêndice 18. Gemas homogeneizadas no *stomacher*.



Apêndice 19. Inoculação do frasco de SSPT.



Apêndice 20. Inoculação do frasco de SSP.



Apêndice 21. Meios inoculados para a contagem padrão de bactérias mesófilas e pesquisa de *Salmonella* spp.



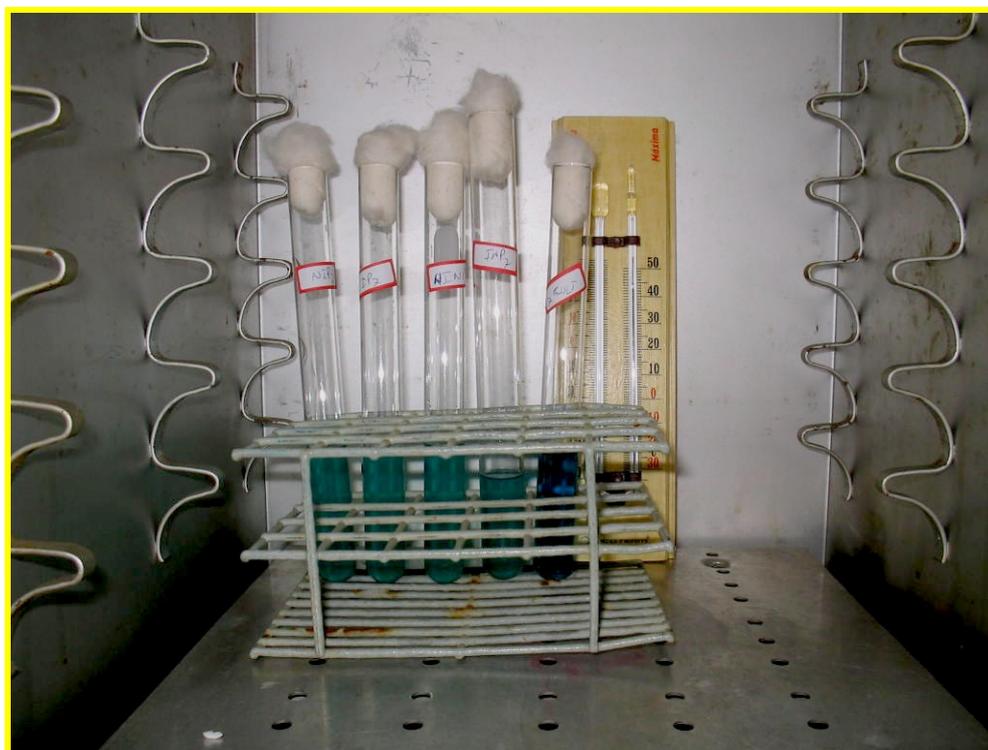
Apêndice 22. Inoculação das placas para contagem padrão de bactérias mesófilas



Apêndice 23. Vazagem do APC nas placas inoculadas para contagem padrão de bactérias mesófilas



Apêndice 24. Pré-enriquecimento não seletivo na pesquisa de *Salmonella* spp.

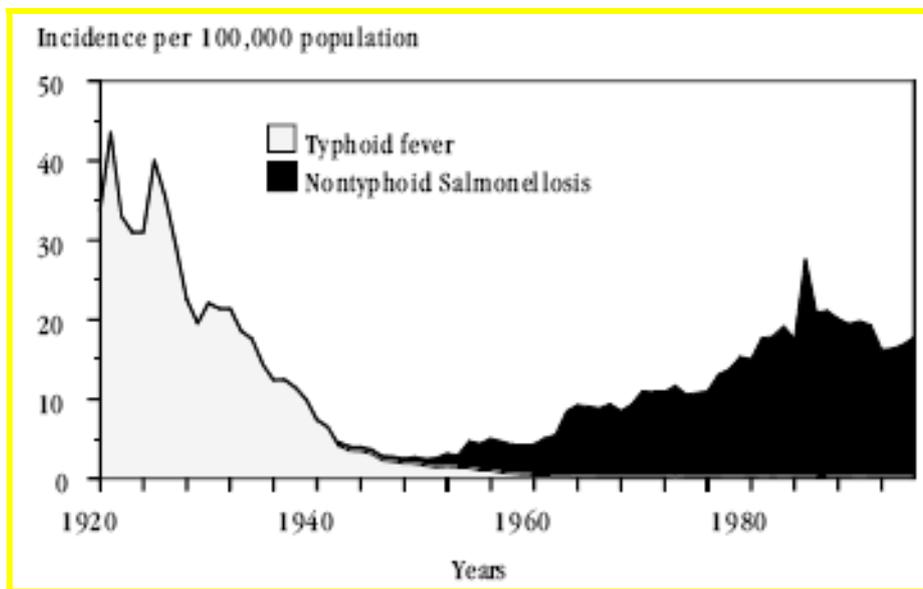


Apêndice 25. Enriquecimento seletivo na pesquisa de *Salmonella* spp.

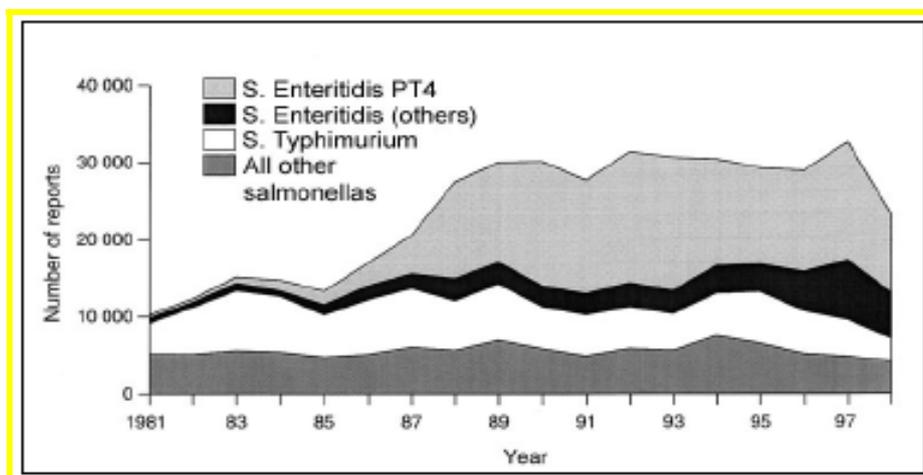


Apêndice 26. Inoculação para plaqueamento seletivo na pesquisa de *Salmonella* spp.

11 ANEXOS



Anexo 1 - Incidência de salmoneloses tifóide e não tifóide nos EUA de 1920 até 1995
FONTE: TAUXE (1997)



Anexo 2- Infecções por *Salmonella* spp., 1981-1998
FONTE: WALFORD e NOAH (1999)



Anexo 3. Processo de pasteurização em casca – Caixas engradados de ovos classe A e AA (USDA) frescos que chegam continuamente ao equipamento de pasteurização em uma correia de transporte.
FONTE: *NATIONAL PASTEURIZED EGGS* (2005)



Anexo 4. Processo de pasteurização em casca - Depois de um computador cuidadosamente pesar cada ovo uma esteira transportadora encaminha os ovos para uma série de tanques ultra-limpas com água aquecida.
FONTE: *NATIONAL PASTEURIZED EGGS* (2005)



Anexo 5. Processo de pasteurização em casca - Computadores automaticamente ajustam o tempo do processo de pasteurização e fixam a temperatura de acordo com o tamanho do ovos sendo processados.
FONTE: *NATIONAL PASTEURIZED EGGS* (2005)



Anexo 6. Processo de pasteurização em casca - A combinação do tempo e temperatura de água aquece o ovo até a temperatura exata necessária para destruir todas as bactérias (redução de 5 log) sem cozinhar o ovo.
FONTE: *NATIONAL PASTEURIZED EGGS* (2005)



Anexo 7. Processo de pasteurização em casca - Após o período de resfriamento os ovos são embalados com uma cera natural aprovada pelo FDA para se prevenir contaminação de fontes externas e preservar o frescor.
FONTE: *NATIONAL PASTEURIZED EGGS* 2005)



Anexo 8. Processo de pasteurização em casca - Após a pasteurização, os ovos são transportados através de um “candler” (uma máquina que identifica e remove ovos danificados).
FONTE: *NATIONAL PASTEURIZED EGGS* (2005)



Anexo 9. Processo de pasteurização em casca - Todos os ovos são carimbados com a letra P dentro de um círculo para indicar que eles foram pasteurizados de acordo com as especificações do FDA.

FONTE: *NATIONAL PASTEURIZED EGGS* (2005)



Anexo 10. Processo de pasteurização em casca - Os ovos são embalados, rotulados e estocados sob refrigeração e uma temperatura precisa e ideal de 7,22°C.

FONTE: *NATIONAL PASTEURIZED EGGS* (2005).