UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

SALMONELA EM OVOS: PREVALÊNCIA, INFLUÊNCIA DAS CONDIÇÕES AMBIENTAIS NA PENETRAÇÃO E MULTIPLICAÇÃO ATRAVÉS DA CASCA E EFEITO DE SANIFICANTES NO CONTROLE DA CONTAMINAÇÃO EXTERNA

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por Daniela Daltrini de Oliveira, aprovada pela Comissão Julgadora em 05 de abril de 2000.

Campinas, 05 de abril de 2000.

Prof. Dr. Edir Nepomuceno da Silva
Presidente da Banca

Daniela Daltrini de Oliveira
Orientada

Prof. Dr. Edir Nepomuceno da Silva
Orientador

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos

Campinas, SP

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

000101135

UNIDADE BC
N.º CHAMADA :
T/UNICAMP
OL4s
V. Ex.
TOMBO BC/ 41813
PROC. 278/00
C [ ] D [X]
PREÇO R$ 11,00
DATA 05-08-00
N.º CPD

CM-00143102-1

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. - UNICAMP

OL4s

Oliveira, Daniela Daltrini de
Salmonela em ovos:prevalência, influência das condições ambientais na penetração e multiplicação através da casca e efeito de sanificantes no controle da contaminação externa / Daniela Daltrini de Oliveira. –Campinas, SP: [s.n.], 1999.

Orientador: Edir Nepomuceno da Silva
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Salmonela. 2.Temperatura. 3.Ovos. 4.Sanitização. I.Silva, Edir Nepomuceno. II.Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.Título.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Edir Nepomuceno da Silva

Prof. Dr. Arnaldo Y. Kuaye

Prof. Dr. Mauro Faber F. Leitão

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Prof. Dr. José Luis Pereira

Campinas, de de 1990.

A meus pais e irmãos,

pelo incentivo, ajuda e compreensão

que propiciaram a minha formação

Gostaria de agradecer à **Dirce Yorika Kabuki, Maria Raquel Manhani e Jacinta Rodrigues de Oliveira Franco**, funcionárias do Laboratório de Higiene dos Alimentos do Departamento de Tecnologia da Faculdade de Engenharia de Alimentos (UNICAMP), sem o qual o auxílio e paciência este trabalho não teria sido realizado.

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. Edir Nepomuceno da Silva, orientador,

- À Márcia Pulzatto, pela amizade e cooperação sempre presente,

- À todos os professores, amigos e funcionários do Departamento de Tecnologia de Alimentos –FEA – Unicamp,

- À todos os funcionários da Secretaria de Pós-Graduação – principalmente a pessoa do Sr. Cosme,

- À todas as pessoas que direta, ou indiretamente, cooperaram para a realização deste trabalho

Meu muito obrigada

ÍNDICE GERAL

Página

ÍNDICE DE TABELAS v

ÍNDICE DE FIGURAS vi

RESUMO vii

SUMMARY ix

1. INTRODUÇÃO 01

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 03

2.1. Salmonelose e Gênero *Salmonella* 03

2.2. Salmonela em aves 04

2.2.1. Fontes de Contaminação 05

2.2.2. *Salmonella* Enteritidis (SE) em aves 06

2.3. Ovos 13

2.3.1. Generalidades 13

2.3.2. Estrutura do ovo 14

2.3.3. Microbiota dos ovos 15

2.3.4. Fontes de contaminação 16

2.3.5. Contaminação dos ovos 17

2.3.5.1. Penetração de SE através da casca 18

2.3.5.2. Contaminação dos conteúdos 19

2.3.5.3. Ovos quebrados 22

2.3.5.4. Influência da temperatura 22

2.4. *Salmonella* Enteritidis fagotipo 4 (SE FT 4) 25

2.5. Implicações em Saúde Pública.....27
2.6. Prevenção e Controle.....41

3. MATERIAIS E MÉTODOS.....46
3.1. Materiais.....46
3.1.1. Cultura Bacteriana.....46
3.1.2. Ovos.....47
3.1.3. Equipamentos.....47
3.1.4. Outros.....47
3.2. Métodos.....48
3.2.1. Recuperação e contagem de SE-Nal^R das amostras.....48
3.2.2. Experimento 1. Ocorrência de *Salmonella* sp em ovos comerciais de galinhas coletadas em pontos de vendas.....48
3.2.3. Experimento 2. Estudo da contaminação de ovos por SE-Nal^R via maravalha artificialmente contaminada.....51
3.2.3.1 Preparo da maravalha e contaminação dos ovos.....51
3.2.3.2. Contagem da cepa SE-Nal^R em ovos e na maravalha artificialmente contaminada.....51
3.2.4. Experimento 3. Efeito da temperatura de armazenagem sobre a translocação de SE-Nal^R da casca para a gema, em ovos artificialmente contaminados.....52
3.2.5. Experimento 4. Sobrevivência de SE-Nal^R em clara, clara batida e glacê de ovos de galinhas submetidas a diferentes temperatura de armazenagem.....53
3.2.6. Experimento 5. Uso de sanificantes na redução de SE-Nal^R da casca de ovos artificialmente contaminados.....54

4 .RESULTADOS E DISCUSSÃO.....56

5 . CONCLUSÕES.....70

6 . REVISÃO BIBLIOGRÁFICA......71

ÍNDICE DE TABELAS

Página

TABELA 1 - Surtos de infecção por *Salmonella* Enteritidis, por região nos E.U.A, 1985-1992.....29

TABELA 2 - Número de *Salmonella sp. Salmonella* Enteritidis e isolada de homens e alimentos (Itália, 1982-1992).....33

TABELA 3 - Porcentagem de *Salmonella* Enteritidis e outros sorotipos de salmonela em humanos na Polônia.....35

TABELA 4 - Surtos de *Salmonella* Enteritidis na Argentina, 1986 a 1993.....36

TABELA 5 - Salmonelas isoladas da casca e gema de ovos de galinha obtidos no comércio varejista de Campinas -SP, no período de janeiro a março de 1995.....57

TABELA 6 - Sobrevivência de *Salmonella* Enteritidis (SE) em ovos experimentalmente contaminados via casca e mantidos sob temperatura ambiente.....59

TABELA 7 - Sobrevivência de *Salmonella* Enteritidis (SE) em ovos experimentalmente contaminados via casca e mantidos sob temperatura de refrigeração.....61

TABELA 8 - Sobrevivência de Salmonella Enteritidis (SE) em clara de ovos e preparações experimentalmente contaminadas e mantidas sob temperatura ambiente.....63

TABELA 9 - Sobrevivência de *Salmonella* Enteritidis (SE) em clara de ovos e preparações experimentalmente contaminadas e mantidas sob temperatura de refrigeração.....65

TABELA 10 - Sanitização por imersão por 30 segundos em solução a 45°C contendo compostos de cloro e quartenário de amônia de ovos artificialmente contaminados via casca com *Salmonella* Enteritidis (SE).....67

ÍNDICE DE FIGURAS

Página

FIGURA 1 - Os principais elementos que contribuem para a prevalência de *Salmonella* em animais de fazenda e seus produtos.....06

FIGURA 2 - Diagrama da metodologia utilizada no isolamento de *Salmonella* sp de ovos comerciais de galinhas coletadas nos pontos de venda.....50

RESUMO

Salmonella Enteritidis (SE) tem sido o sorovar mais comum isolado dos casos de salmonelose humana em várias partes do mundo. Sua incidência em surtos humanos tem aumentado, na última década, em várias partes do mundo. Estes surtos têm sido associados, na maioria das vezes, com o consumo de ovos ou pratos preparados a base dos mesmos. A partir de 1993, o Instituto Adolfo Lutz de São Paulo começa a relatar um grande aumento de surtos de salmonelose humana envolvendo ovos e derivados. Até o momento, não há relato da presença de SE em ovos comerciais, embora sua ocorrência já tenha sido detectada em galinhas reprodutoras. As condições de comercialização de ovos no Brasil não exigem sanitização, resfriamento dos ovos logo após a postura, nem há controle do tempo entre a produção e seu consumo. Fatores estes, importantíssimos na prevenção de salmonelose humana via ovos. Desta maneira, o projeto foi delineado para verificar a ocorrência de salmonelas em ovos de galinha (casca e gema analisadas separadamente) obtidos no comércio varejista de Campinas -SP no período de janeiro a março de 1995; estudo da contaminação de ovos por SE via maravalhas artificialmente contaminadas; efeito da temperatura de armazenagem sobre a translocação de SE da casca para gema, em ovos artificialmente contaminados; sobrevivência de SE em clara, clara batida e glacê de ovos de galinha submetidas a diferentes temperatura de armazenagem; e por último, uso de sanitizantes na redução de SE da casca de ovos artificialmente contaminados. Nos experimentos com contaminação artificial foi utilizada uma mutante de SE resistente ao ácido nalidíxico isolada de galinhas clinicamente doentes. Dos resultados obtidos, constatou-se elevada ocorrência de salmonelas em ovos de galinha (9,6% positivo das 124 amostras examinadas). SE foi, basicamente o único sorovar isolado. A presença de salmonelas era maior na casca (9,6%) que na gema (3,2%) entre a amostragem dos ovos examinados. SE permaneceu viável na casca artificialmente contaminada pelo período de 21 dias, nos ovos mantidos tanto em temperatura ambiente, como na de refrigeração. A migração da salmonela da casca para a gema ocorreu a partir de 24 horas de armazenagem, nas duas condições de temperatura. A refrigeração dos ovos não impediu a migração de salmonela da

casca para a gema; apenas reduziu um pouco a sua multiplicação. Clara de ovos, clara batida e glacê não se mostraram substrato apropriados para o crescimento de salmonelas, uma vez que, praticamente, não houve multiplicação nem redução da SE nestes alimentos artificialmente contaminados e mantidos em temperatura ambiente (observação por 24 horas) e de refrigeração (observação por sete dias). Na verdade, houve redução de um ciclo logaritmo da contaminação original nas preparações de glacês mantidas nas duas condições e tempo de armazenagem. Tanto compostos a base de cloro como quartenários de amônia utilizados na sanitização de ovos por imersão por 30 segundos em solução a 45°C foram eficientes na redução dacarga de mesófilos totais e de SE da casca de ovos artificialmente contaminados. No processo utilizado, o composto de quartenário de amônia foi mais efetivo que o composto clorado na sanitização da casca dos ovos. Os surtos de infecção alimentar humana por salmonelas podem ser devidos a contaminação dos ovos tanto na casca como na gema. Processos de produção de ovos livres de salmonelas, higienização após postura e refrigeração são pontos críticos de controle para redução dos surtos de salmonelose humana de origem alimentar.

SUMMARY

Salmonella Enteritids (SE) has been the commonest isolated sorovars in the reported cases of human salmonelosis in several regions of the world. Its incidence has been increasing during the last decades in various parts of the world. These outbreaks have been associated in, most cases, to the consumption of eggs or dishes prepared with them. Since 1993, Instituto Adolfo Lutz in São Paulo has been reporting a significant increase of human salmonelosis involving eggs and its derivatives. Up to now, there has been no reports about the presence of SE in "commercial" eggs, although its presence has been reported in reproducer hens. The commercialization of eggs in Brazil does not require the sanitation and the cooling of the eggs right after laying, besides there is no control of the time between the production and the consumption. Such factors are extremely important for the prevention of human salmonelosis via eggs. In this way, the project was designed to evaluate the incidence of salmonella in hen eggs (the eggshell and the egg yolk were analysed separatedly) bought from retailing stores in Campinas, state of São Paulo; from January to March of 1995. The study included the analysis of the contamination of the eggs by SE via artificially contaminated fragments; the effect of the storage temperature on the migration of the SE to the egg yolk of artificially contaminated eggs; the survival of the SE on the eggs white, beaten eggs white and glace made of hen eggs submitted to different storage temperatures; and finally, the use of sanitation products in the reduction of salmonellas on artificially contaminated eggshells. A mutant of the SE isolated from sick hens and resistant to nalidixic acid was used in the experiments with artificial contamination. The results showed a high incidence of salmonellas in hen eggs (9,6% in the 124 examined samples).The SE was, basically, the only isolated serovar. The presence of salmonellas was higher on the eggshells (9,6%) than on the egg yolks (3,2%) among the examined samples. The SE remained present on the artificially contaminated eggshells during the 21 days period, on the eggs kept at room temperature as well as those kept at refrigeration. The migration of salmonellas from the eggshells to the egg yolks occured after 24 hours of storage, at both temperature

conditions. The refrigeration of the eggs did not avoid the migration of the salmonellas from eggshells to the egg yolks; it only reduced its multiplication a little. The egg white, the beaten egg white and the glace did not seem to be adequate substrates to the multiplication of salmonellas. Since, there was, pratically neither a multiplication nor a reduction of SE in these artificially contaminated and kept at room temperature (24 hours) and at refrigeration nutriments (7 days). In fact, there was a reduction of a logarythm cycle of the original contamination in glaces kept at both conditions and time storage. The chlorine solution as well as the ammonia quartenaries used in the sanitation of the eggs through a 30 seconds immersion in a 45°C solution were efficient to the reduction of the overall rate of mesophiles and the SE rate on artificially contaminated eggshells. In this process, the ammonia quartenary solution was more efficient than chlorine solution for the sanitation of the eggshells. The outbreaks of alimentary human infection by salmonellas may be caused by the contamination of the eggshells as well as the contamination of the egg yolk. The production of salmonella free eggs, the use of a sanitation process after laying and the refrigeration are essential to control the reduction of alimentary human salmonellosis.

1- INTRODUÇÃO

Salmonelas são microrganismos que pertencem a Família *Enterobacteriaceae*, sendo consideradas patogênicas ao homem. São descritos mais de 2.000 sorotipos de salmonelas. A *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis (SE) tem sido o mais comum nos casos de salmonelose humana em várias partes do mundo.

A incidência de surtos humanos causados por SE tem aumentado nos últimos anos em muitos países como Estados Unidos, Grã-Bretanha e outros países da Europa. A associação entre o consumo de ovos e surtos de SE tem-se tornado um grande problema internacional, tanto na área econômica como em relação a saúde pública. No Brasil, os surtos humanos por SE vêm aumentando dramaticamente a partir de 1993. Grande parte destes surtos tem sido relacionados com o consumo de ovos ou pratos preparados a base dos mesmos.

A distribuição de ovos no Brasil é realizada através dos supermercados (40%) e do comércio varejista de alimentos (60%). Não há exigência de sanitização da casca dos ovos destinados ao comércio, tampouco, de refrigeração desde a produção até os pontos de venda.

A presença de SE em galinhas foi constatada em 1989, no Brasil. O isolamento foi feito de matrizes pesadas jovens que apresentavam sintomas clínicos e mortalidade. Não existem relatos da presença de SE em poedeiras e seus ovos.

A contaminação dos ovos por salmonelas se dá, inicialmente, na maioria das vezes, através da casca. Ela ocorre pelo contato com fezes contaminadas, durante a postura, na passagem do ovo pela cloaca da galinha ou, no contato externo com material contaminado. No caso de galinhas reprodutoras, geralmente, é a maravalha de madeira utilizada como forro dos ninhos a fonte de contaminação.

Tempo e temperatura de armazenagem são fatores fundamentais para que as salmonelas passem da superfície da casca para estruturas mais internas dos ovos, podendo até atingir a gema.

A sanitização e o resfriamento dos ovos logo após a postura são procedimentos adotados, em vários países, na redução da carga microbiana contaminante e de sua multiplicação, como processo auxiliar na redução do problema de salmonelose humana, prática esta não adotada no Brasil.

O crescimento microbiano na albumina do ovo é limitado por componentes naturais como: ausência ou indisponibilidade de água livre ou nutrientes, presença de agentes antimicrobianos naturais como a lisozima, e o pH alcalino. Contudo, pratos preparados a base de clara, com adição de açúcar, por exemplo, poderiam romper este equilíbrio e favorecer a multiplicação de salmonelas nos mesmos.

Os experimentos realizados pretendem verificar a ocorrência de salmonelas na casca e gema de ovos distribuídos em vários pontos de venda, o processo de contaminação da casca de ovos pelo contato com maravalha contaminada, a influência de tempo e condições de armazenagem na multiplicação e contaminação das estruturas internas dos ovos, a sobrevivência de SE em clara *in natura* e sua preparações, e finalmente a eficiência de sanitizantes.

2 - REVISÃO DE LITERATURA

Nesta última década, mundialmente, os pesquisadores tem mostrado maior interesse em relação as doenças de origem alimentar.

A percepção por *Salmonella* como um problema na indústria aviária tem feito a própria indústria modificar seu comportamento. Outros fatores incluem uma maior preocupação pela saúde pública e a qualidade dos alimentos. A aquisição de uma maior informação sobre a microbiologia de salmonela e a epidemiologia da infecção nas aves e homens não permite, com algumas exceções, eliminar salmonela da cadeia animal e dos alimentos (BARROW, 1993).

Surtos associados com consumo de ovos tem-se tornado um sério problema de saúde pública e na economia internacional.

A *Salmonella* Enteritidis (SE), é um patógeno humano e é o mais significante agente causador de enfermidade transmitida por alimentos (ANON, 1993 citado por LEVER & WILLIANS, 1996).

2.1. Salmonelose e Gênero *Salmonella.*

Salmonelas são microrganismos que pertencem a Família *Enterobacteriaceae*. Normalmente, os membros desta família são Gram negativos, não esporogênicos, anaeróbios facultativos, crescem entre 5° e 45°C, crescem em atividade de água em torno de 0,945 - 0,999 e podem sobrevivem em pH abaixo de 4.

Sabe-se que há mais de 2.300 sorotipos de salmonelas e poucos deles parecem ser hospedeiro específicos, como por exemplo *Salmonella typhi* causadora da febre tifóide no

homem e *Salmonella gallinarum* causadora do tifo aviário. Dentro desses sorotipos existem uns mais virulentos do que os outros.

As salmonelas são encontradas no trato intestinal dos homens e animais, com ciclos de infecção entre animais, homens e meio ambiente. Os produtos de origem animal, como carnes, ovos e alimentos derivados podem conter a bactéria, sendo que recebem destaque os alimentos ricos em proteínas e carboidratos, apresentando maior vulnerabilidade (REED, 1993).

As salmonelas são consideradas sempre patogênicas para os homens e animais.

A susceptibilidade à salmonelose difere de pessoa para pessoa, sendo mais severa em pessoas jovens e idosas. O período de incubação é em torno de 6-72 horas, com uma média de 12-36 horas; a duração da doença é de um a quatro dias. Os sintomas são gastroenterite aguda, incluindo dores abdominais, diarréia e usualmente náuseas, vômitos, febre moderada e dor de cabeça

2.2. Salmonela em aves.

As aves são investidas por três tipos de patogenias que são causadas por salmonelas. A pulorose, causada pela *Salmonella pullorum*, que ocorre em pintinhos principalmente na primeira semana de vida; o tifo aviário causado pela *Salmonella gallinarum* geralmente acomete as aves adultas e os demais paratifos aviários que são causados por outras salmonelas que não sejam a *S. pullorum* e *S. gallinarum*. (BERCHIERI, 1990).

O paratifo na sua forma clínica, é mais freqüente em pintinhos de primeira semana de vida, podendo inclusive ser confundido com pulorose. Em outras épocas de vida das aves pode ocorrer devido a uma debilidade orgânica. A severidade da doença depende de vários

fatores como idade da ave, virulência da cepa, grau de infestação, qualidade da ave e condições de manejo (BERCHIERI, 1990; GAST, 1994).

2.2.1. Fontes de contaminação

Geralmente, os ovos, meio ambiente e a ração são as principais fontes de contaminação por salmonela em aves. Vetores como ratos, insetos, homem, animais domésticos, pássaros, são veículos que favorecem a propagação da bactéria no ambiente e para outras áreas. (Figura 1)

Os estudos a respeito da fonte de introdução do microrganismo em plantéis avícolas são necessários para que possam ser tomadas medidas de controle contra a infecção dos animais e do homem.

A superfície externa da casca dos ovos pode contaminar-se por salmonela durante a postura e a penetração através dos poros ganhando acesso pela cutícula, sendo favorecida pela umidade, temperatura morna, tempo de exposição e qualidade da casca. Essas condições durante a incubação são favoráveis para o rápido crescimento da população bacteriana. Após a penetração, a bactéria não causa decomposição extensiva do ovo.(OPITZ & SINGER, 1992; NOORDHVIZEN & FRANKENA, 1994; HOUH et alii, 1996).

Se a contribuição desses fatores para a ocorrência da infecção pudesse ser quantificada através de métodos epidemiológicos modernos, a prevenção seria possível.

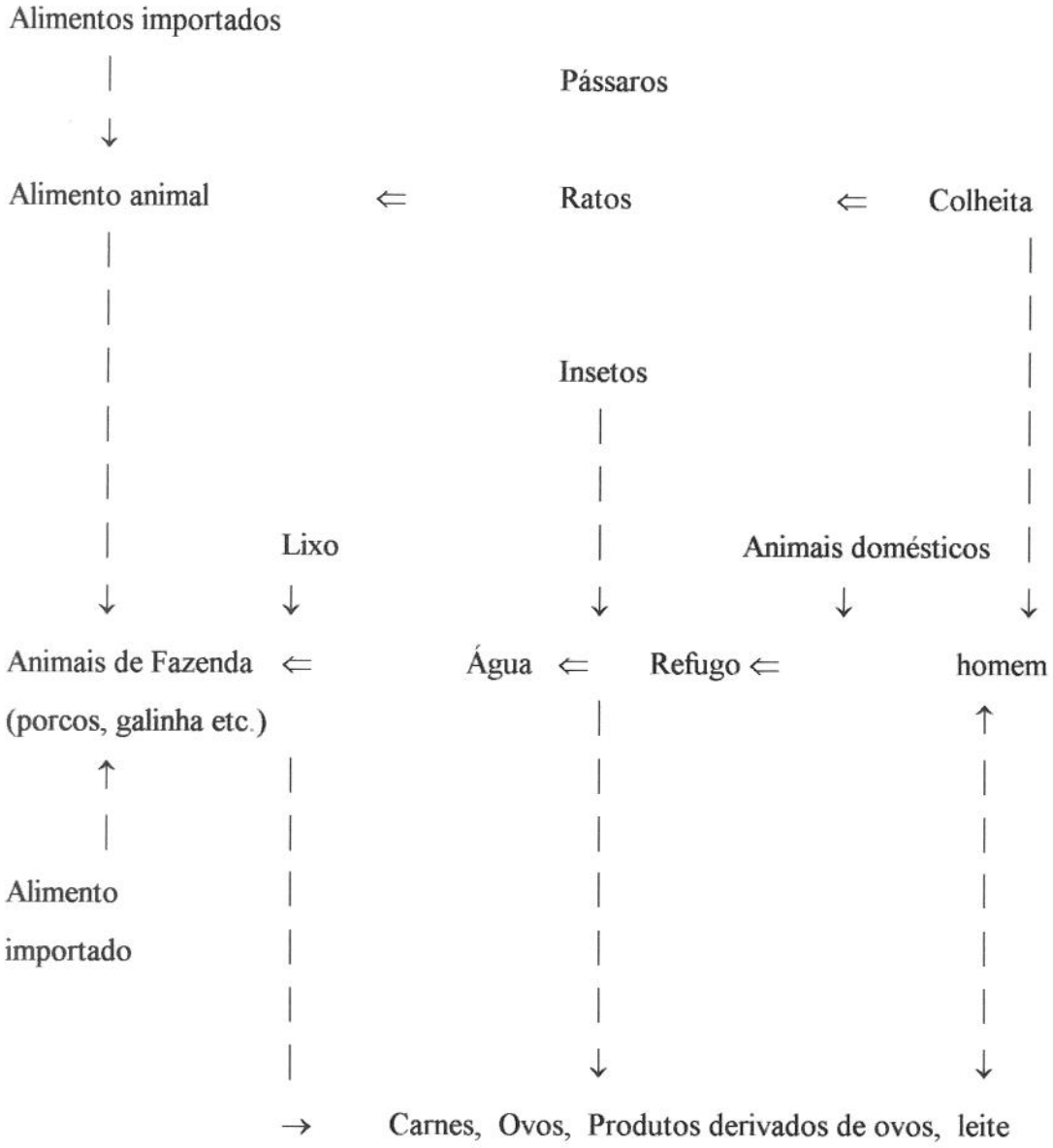

FIGURA 1: Os principais elementos que contribuem para a prevalência de *Salmonella* em animais de fazenda e seus produtos (NOORDHVIZEN & FRANKENA, 1994).

2.2.2. *Salmonella* Enteritidis (SE) em aves.

Salmonella Enteritidis (SE) é um patógeno comum para muitas espécies de mamíferos e aves, sendo que estes últimos são altamente susceptíveis à infecção. Antes dos anos 80, SE era raramente isolada de aves e, recentemente, a incidência de SE tem

aumentado na Grã-Bretanha, Estados Unidos, Holanda e outros países. Portanto, tem-se tornado um dos patógenos mais importante para o homem e para a indústria aviária. Devido a tudo isso é importante analisar o comportamento do organismo em galinhas para prevenir e eliminar a enfermidade transmitida por alimentos (SUZUKI, 1994; GAST, 1994; GIESSEN et alii.1994 e NOORDHUIZEN et alii., 1994).

Na Malásia em estudos relatados por RUSUL et alii, 1996, mostram que cinco sorotipos são os mais encontrados em carcaças de frangos, sendo eles *Salmonella* Enteritidis (79,9%), o mais comum seguida pela *Salmonella blokey* (8,5%), *Salmonella bradford* (6,8%), *Salmonella kentucky* (3,4%) e *Salmonella agona* (1,7%). A SE também foi o sorotipo predominante dos conteúdos intestinais.

a) SE infecção em galinhas

O curso de infecção da SE é similar ao associado com muitas outras salmonelas paratifoides, pela qual é iniciada pela colonização intestinal e em algumas vezes seguida pela invasão e disseminação para órgãos internos (GAST, 1994 e SUZUKI, 1994). Em geral, os surtos agudos de infecção por SE ocorre em pássaros jovens e em pássaros sob extremo stress, e raramente em aves adultas sob condições naturais (SUZUKI, 1994).

A resposta da infecção por SE é diferente para aves jovens. A infecção raramente causa mortalidade em aves com menos de um mês de idade. A resistência a salmonelose em galinhas geralmente aumenta em proporção à idade; isso se deve possivelmente ao desenvolvimento da microbiota do intestino e do sistema imune (CORRIER et alii., 1991; SMITH & TUCKER, 1980; ZIPRIN et alii. 1989 citado por SUZUKI, 1994). Em muitos experimentos realizados, com inoculação de SE observou diarréia, depressão, anorexia, redução na produção de ovos e ou mortalidade de galinhas poedeiras.

De acordo com o relato de GAST (1994), o curso e conseqüências de infecções experimentais em galinhas não tem fornecido um ponto de referência para diferenciar SE de outros sorotipos de salmonela. Quando galinhas inoculadas oralmente com SE, os resultados (colonização intestinal e fecal e freqüente invasão para órgãos internos), são similares as observadas a outros sorotipos como *Salmonella typhimurium*. Por outro lado, ocorre diferença significante entre as cepas, ou fagotipos dentro do sorotipo *enteritidis*.

b) Invasão

A habilidade da bactéria invadir as células do hospedeiro é um dos fatores de virulência do organismo. SE é um patógeno muito invasivo causando infecção sistêmica em galinhas (SUZUKI, 1994; GAST, 1994; GIESSEN et alii, 1994). Em estudos realizados por HINTON et alii (1990) citado por GAST, 1994, na administração de ração em galinhas, mostrou que o fagotipo 4 foi o mais isolado do que os tipos 7, 8 e 13a.

O fagotipo 4 também foi o mais invasivo do que os tipos 6, 8 e 13a, embora todos os tipos mostraram ser altamente invasivos em células vero (BARROW, 1991 citado por SUZUKI, 1994).

c) Patologia

Em experimentos realizados com galinhas contaminadas com SE foram observadas pericardites, necrose hepática através de palpação da parede abdominal (BARROW, 1991; O'BRIEN, 1988 citado por SUZUKI, 1994). No pós mortem de galinhas infectadas revelaram a presença de ovários e óvulos deformados, diminuídos, descolorados e ou congestionados, folículos grandes ou pequenos e mal formados com ligação por um quisto cheio de fluido; maciez dos ovos e ou peritonites nos mesmos, sugerindo assim a infecção transovariana da SE (COOPER et alii, 1989; HOPPER & MAWER, 1988; LISTER, 1988 citado por SUZUKI, 1994).

De acordo com HUMPHREY et alii (1989,1991) citado por SUZUKI, (1994) e GAST, (1994), relataram que lesões não macroscópicas ou microscópicas estão presentes nos órgãos viscerais de muitas galinhas infectadas, muitas aves mostraram peritonites e numerosos cistos pequenos e pálidos no fígado e rins, sugerindo com isso que SE pode causar infecção sistêmica em pintinhos e galinhas.

d) Vias de contaminação

SE pode propagar-se através de transmissão vertical e horizontal. Através da transmissão vertical, criadoras e poedeiras são envolvidas e freqüentemente não apresentam sinais clínicos. Na transmissão horizontal, a infecção se espalha através de granjas, nas plantas de abate, pelo ar, contato (exemplo: através da casca do ovo) e também por deficiência da desinfecção (NOORHVIZEN & FRANKENA, 1994).

A SE pode entrar dentro da granja através da compra de aves contaminadas ou por vários vetores como o homem, equipamentos, água e ração. Pássaros, moscas, animais silvestres, principalmente os roedores de modo especial, os ratos (OPTIZ & SINGER, 1992; NOORDVIZEN & FRANKENA, 1994; BERCHIERI, 1990). SE, pode ser encontrada no ar, podendo-se assim relacionar a infecção em aves controladas (LEVER & WILIAM, 1996)

Em estudo relatado por, OPITZ & SINGER (1992), existe uma influência muito importante de ratos e roedores na contaminação do ambiente. Os ratos são seletivamente mais sensíveis a SE do que a qualquer outro tipo de salmonela paratifóide. Em estudo relatado, a SE representa 18% de todas as salmonelas isoladas do meio ambiente e 75,3% dos ratos. Por isso, os ratos tem sido identificados como amplificadores mais significativos da contaminação do ambiente nas granjas avícolas.

As rações fabricadas a partir de farinha de origem animal (carne, ossos, pescado, vísceras, penas, ostras, sangue etc.) são consideradas veículos de contaminação e responsáveis pela introdução de salmonela nos plantéis.

Outra fonte em potencial é a compra de pintinhos provenientes de reprodutoras contaminadas (OPITZ, 1992).

e) Controle de SE em aves

A contribuição de diferentes rotas de infecção pode diferir de país para país. Com isso a indústria avícola de muitos países tem adotado numerosas medidas de controle para evitar os problemas de contaminação em alimentos, desenvolvendo programas de controle para assegurar a produção de um produto final livre desse microrganismo.

Vários meios de controle de SE tem sido utilizados através dos anos em diferentes partes do mundo.

• Controle genético e através de ração: De acordo com BARROW (1993), existe um componente genético no mecanismo de resistência contra as salmonelas em galinhas. Linhagens resistentes a SE também o são à *Salmonella typhimurium*, *Salmonella pullorum* e *Salmonella gallinarum*. Linhagens susceptíveis a SE também são susceptíveis a todas as outras. A adição de 5% da cama usada e de lactose como parte da ração das aves, diminui significativamente a colonização por SE nos cecos e outros órgãos de pintinhos, mas não em aves adultas (CURRIER et alii, 1993 citado por SILVA, 1993). Essa adição altera a espessura da lâmina própria dos cecos, diminui o pH do lúmem intestinal e aumenta a concentração de ácidos orgânicos como o ácido acético, propiônico, butírico e lático. Capsaicina, um composto vasoativo e irritante encontrado em pimenta do gênero Capsicum, reduz a infecção de poedeiras quando são alimentadas com ração contendo 18 ppm do produto (TELLES et alii, 1993 citado por SILVA, 1993).

• Tratamentos quimioterapêuticos: A quimioterapia tem sido de grande auxílio para diminuir as perdas causadas por aves infectadas. Mas, o uso periódico de antibióticos induz não somente a criação de resistência por parte da salmonela, mas também a formação de aves portadoras crônicas que eliminam a salmonela no meio ambiente e são, quem sabe, o principal foco de disseminação dentro de um plantel avícola .

• Exclusão competitiva: Se embasa na administração da flora bacteriana normal a aves jovens. Esta flora diminui ou interfere com o crescimento normal ou colonização de alguns organismos como *Salmonella* e *Campylobacter*. Este fenômeno foi descrito primeiramente pelo Professor Esko Nurmi, portanto também é conhecido como "Conceito de Nurmi" (FOWLER, "s.d.")

A prática de se administrar conteúdo intestinal sem que se submeta a nenhum tratamento, deve ser evitada pois tem ocorrido casos onde se tem disseminado algumas cepas de salmomelas provenientes de aves adultas de onde se obteve a flora intestinal. Este método de exclusão competitiva tem ganho aceitação em alguns locais devido a presença de probióticos, produtos que contém diferentes organismos provenientes da flora normal das aves .

De acordo com BISGAARD (1992), o uso de antibióticos e a aplicação do conceito de Nurmi não são recomendados por causa do efeito negativo no sistema de monitoramento bacteriológico e o risco da resistência ao antibiótico.

• Imunização: A imunização tem sido utilizada como uma arma no controle de alguns tipos de *Salmonella* sp.

Existe um grande interesse no desenvolvimento de uma vacina que possa reduzir a incidência de infecção por SE. Vacinas com adjuvantes oleosos contra SE tem sido utilizados em galinhas (ESKELUND, 1992 citado por SILVA, 1993).

• Biosseguridade: É o método ideal utilizado em muitas empresas avícolas. Este sistema não pode ser substituído pelo uso de antibióticos ou produtos imunizantes. Significa a proteção de organismos vivos. No caso da produção avícola, significa salvaguardar as aves que cria-se nas granjas contra a contaminação por microrganismos causadores de enfermidades. Todos os procedimentos e normas de biosseguridade adotados visam evitar o contato das aves com agentes patogênicos formando assim, a primeira linha de defesa contra enfermidades nas unidades de produção. É uma tarefa permanente que deve ser realizada 24 horas por dia, 365 dias no ano. Manter aves reprodutoras e poedeiras livres de salmonelas é uma meta que muitas empresas tem realizado.

Segundo, OPITZ & SINGER (1992), o controle requer um método integrado por todos os setores da indústria avícola. Os métodos de controle devem ser ajustados para cada granja individualmente e é possível que não seja efetivo em todas as granjas. A proposta é a seguinte:

1- Uso de métodos mais sensíveis para detectar bactérias no ambiente;

- realizar ensaios em ninhadas reprodutoras;

- realizar um monitoramento regular de sanidade da incubadora;

- realizar um monitoramento do ambiente e dos galpões das poedeiras e frangos.

2- Só coloque frangos e poedeiras que venham de uma granja sem contaminação.

3- Só coloque os frangos e as poedeiras em galpões limpos e desinfetados. Galpões previamente contaminados devem ser analisados para assegurar que são negativos para salmonela.

4- Controle efetivo e contínuo de roedores.

5- As aves de reposição que irão a galpões previamente contaminados devem ser vacinadas com vacinas inativadas.

6- Todo equipamento que tenha estado em contato com aves infectadas tem de ser desinfetado. Isto é muito importante em caso de equipamentos de transporte.

2.3 - OVOS

2.3.1. Generalidades

De acordo com FOSTER (1969), a associação de salmoneloses com os alimentos foi constatada na época da Segunda Guerra Mundial, quando ocorreram surtos na Grã-Bretanha causados por ovos desidratados provenientes dos Estados Unidos e Canadá.

Durante as duas décadas seguintes à 2ª Guerra Mundial, ocorreu um crescimento de doenças associadas com salmonelas em alimentos e medidas sérias mas não efetivas de controle foram instituídas em muitos países da Europa.

Por volta de 1966 começou a crise por SE na indústria de alimentos, quando o órgão de saúde Food and Drug Administration (FDA) dos Estados Unidos, aumentou o seu interesse sobre o problema de *Salmonella* sp relacionado ao comércio interestadual de alimentos, embora não se saiba o motivo específico deste interesse.

Nos últimos anos, a associação de ovos com surtos de SE em humanos tem-se tornado uma questão importante com sérias conseqüências na saúde pública internacional e na economia. Investigações epidemiológicas de surtos de SE, em muitas ocasiões traçam os

ovos e produtos de ovos como fontes de infecções em muitos países (GAST & BEARD, 1992).

Conforme as observações da Organização Mundial da Saúde (OMS) sobre casos de salmonelose humana, entre 1979-1987 indicam que o isolamento de SE tem aumentado na Europa e América. SE foi o primeiro sorotipo relatado em nove dos vinte e um países descritos pela OMS em 1987 comparado com dois dos 21 em 1979 (ALTEKRUSE et alii, 1993).

Os ovos são um dos poucos alimentos que são usados a nível mundial, tornando assim, a indústria de ovos um importante segmento da indústria alimentícia. É utilizado em casa, restaurantes e instituições, sozinho ou como ingrediente em preparações alimentícias cruas ou cozidas. Devido ao excelente ambiente nutricional para o crescimento bacteriano, há necessidade do controle microbiológico na produção e uso de ovos.

Segundo TODD (1996), ovos quebrados são considerados perigosos, porque os seus conteúdos estão expostos a bactérias patogênicas, e podendo ser utilizados indevidamente em alimentos não totalmente cozidos.

2.3.2. Estrutura do ovo.

A composição do ovo influencia o tipo de microrganismo que irá se desenvolver, como ocorre em outros alimentos. Como as partes dos ovos diferem entre si na composição, a susceptibilidade para deteriorar ou para o crescimento de patógenos difere em cada parte.

Segundo, STADELMAN (1977), a gema dos ovos é formada em três estágios: 1) a parte formada durante o desenvolvimento embrionário; 2) o desenvolvimento lento do ovo desde o tempo de postura até atingir o ponto de maturidade sexual nos dez dias antes da ovulação e 3) o crescimento acelerado durante os dez últimos dias antes da ovulação, dentro

do oviduto. No oviduto, a clara é secretada em torno da gema e finalmente as membranas da casca e a casca são depositadas para completar o processo de formação.

A gema compreende cerca de 30-33% do peso total do ovo. Ela contém 52% de sólidos, dos quais 31,0% é proteína, 64,0% lipídeos, 2,0% carboidratos e 3,0% cinzas. O pH da gema fresca é de 6,0 e ocorre pouca mudança durante o sua comercialização (STADELMAN, 1977 e FRONING et alii., 1992)

A clara ou albúmen, representa cerca de 60,0% do peso total dos ovos, contendo de 10,5 a 11,5% de sólidos, dos quais 86,0% são proteínas, 9,0% açúcar e 5,0% de cinzas. Muitas dessas proteínas apresentam atividade biológica que retarda o crescimento bacteriano através da lise da bactéria ou por restringir certos nutrientes. O pH apresentado pela clara na postura é menor do que 8,0, mas aumenta rapidamente para 9,0 quando já se encontra na fase de comercialização. Este aumento de pH é devido a perda de CO_2 da clara (FRONING et alii 1992)

A casca compreende cerca de 9 a 12% do peso total dos ovos. Ela é relativamente porosa e consiste de 94,0% de carbonato de cálcio. A cor da casca é devido a pigmentos depositados na superfície da mesma. Ela é formada de membranas com poros para a troca de gás. Ainda que os poros sejam parcialmente vedados pela proteína (queratina), eles permitem que dióxido de carbono e umidade escapem do ovo. Sob estas condições, os poros permitem a penetração bacteriana através da membrana da casca (STADELMAN, 1977 e FRONING et alii 1992)

2.3.3. Microbiota dos ovos

Durante a postura os ovos e seus conteúdos se apresentam estéreis ou abrigo natural de poucos microrganismos (FRONING et alii 1992). Devido a existência dos poros, como já citado anteriormente, a casca é uma barreira insuficiente para os microrganismos, ou seja, os

poros permitem a difusão gasosa que são também a causa de perda de água e a passagem pelo qual o microrganismo infecta o ovo (FRONING et alii, 1992). O albúmen contribui, particularmente antes e durante os primeiros dias de incubação quando fornece defesa química e física contra a infecção microbiana da gema.

De acordo com FRONING et alii (1992) a flora contaminante é principalmente de cocos Gram positivos, mas as bactérias Gram negativas estão presentes em baixo número e elas são responsáveis pela deterioração dos ovos.

Em experimentos realizados por BRUCE & JOHNSON (1978), demonstrou-se que os dois tipos de ovos (ovos férteis e os ovos de consumo) podem influenciar o grau e o tipo de contaminação. Os resultados mostraram que os níveis de contaminação em ovos de incubação variaram de 3 a 30% com uma média de 12,7%. A flora foi composta predominantemente de *Micrococcus* sp e *Enterobacteriaceae*, com outros grupos em menores proporções.

Os conteúdos dos ovos podem tornar-se contaminados devido as condições de higiene empregado, ou seja, lavagens impróprias e métodos de estocagem.

2.3.4. Fontes de contaminação

Os animais de criação e aves são as mais importantes fontes de contaminação por salmonela em humanos.

O ciclo de infecção é muito complexo. Os organismos podem ser transmitidos através da ração, planta de processamento, da prole através da contaminação do ovo e disseminação através da incubadeira e de um plantel para outro, através do meio ambiente contaminado. Ratos, fezes, animais selvagens e insetos também são fontes em potencial de SE (KRADEL, 1989; OPITZ, 1992, PURCHASE, 1989).

Em experimento realizado por BOARD (1966), mostra a função dos ninhos limpos e a maneira pela qual os ovos são manuseados após a postura. ROSSER (1942) citado por BOARD (1966) verificou que o nível de contaminação de ovos manuseados com luvas foi menor do que aqueles manuseados normalmente.

2.3.5. Contaminação dos ovos

HAINES (1939) citado por BOARD (1966), menciona que os ovos possuem defesas químicas e físicas contra infecção microbiana, e sugeriu que estas defesas serviriam para proteger o embrião durante a incubação e no caso de ovos de consumo, o apodrecimento ocorre quando as defesas estão inativadas.

A contaminação dos ovos com *Salmonella* pode ocorrer por penetração do organismo através da casca ou por infecção transovariana.

De acordo com MAULDIN "s.d.", a bactéria, incluindo a *Salmonella* pode penetrar através da casca do ovo, logo após os primeiros trinta minutos de postura.

A penetração da bactéria através dos poros é facilitada devido a temperatura morna e a umidade relativa do ovo.

Durante a incubação (temperatura e umidade) as condições são favoráveis ao rápido crescimento bacteriano.

Pesquisas tem sido realizadas em galinhas infectadas experimentalmente ou naturalmente, produzindo ovos contaminados com SE.

Salmonella pullorum e *Salmonella gallinarum* comumente se localizam no ovário produzindo assim a infecção transovariana; poucas salmonelas, como *Salmonella* Enteritidis,

Salmonella heidelberg e *Salmonella typhimurium* podem ocasionalmente serem transmitidas transovariamente em galinhas, perus e patos (SHIVAPRASAD et alii, 1990; KRADEL, 1989).

A habilidade de SE penetrar na mucosa intestinal cai rapidamente com a idade avançada da ave e com a região intestinal onde é comum os sítios de infecção (HUMPHREY, 1990; SHIVAPRASAD et alii, 1990). A gema ou albúmen são presumidamente contaminada quando os ovos postos por galinhas infectadas movem-se do ovário através do oviduto antes de ser cobertos pela casca.

De acordo com experimento realizado por THIAGARAJAN et alii (1994), "in vivo", SE contamina a gema por invasão da célula granulosa, residindo neste local e quando o folículo se rompe durante a ovulação, algumas células granulosas carregam o organismo podendo desprendê-lo, resultando na contaminação do ovo.

De acordo com GAST (1994); HINTON & BALE (1994); SHIVAPRASAD (1990); BARROW (1993); BARROW & LOVEL (1991), a contaminação é mais comum como resultado da deposição de SE na casca do que por infecção transovariana.

2.3.5.1. Penetração de SE através da casca.

O exato mecanismo de defesa das membranas da casca ainda é incerto. Cada membrana é composta por fibras com uma capa de glicoproteínas que contém dois aminoácidos. Esta natureza fibrosa tem a função de servir como filtro para as bactérias.

Os ovos normais apresentam cerca de 7.000 a 17.000 poros, que são aberturas em forma de funil, formando canais não interligados, que penetram a espessura da casca. Não estão uniformemente distribuídos sobre a superficie, concentrando-se em maior número na porção equatorial e câmara de ar. Os poros são parcialmente vedados pela cutícula, o que

não impede trocas gasosas e de umidade do ovo para a atmosfera. Sob determinadas condições, os poros podem permitir a penetração microbiana através das membranas das cascas.

A estrutura demonstra ser um instrumento seguro para medir a habilidade da casca limitando a penetração microbiana. De acordo com SAUTER & PETERSEN (1974) citado por NASCIMENTO et alii (1992), os ovos com qualidade de casca excelente são mais resistentes a penetração por várias salmonelas do que aqueles com baixa qualidade de casca. NASCIMENTO et alii (1992) em experimento realizado mostrou que a qualidade da casca diminui com a idade. O que ocorre é que a estrutura da casca é deteriorada de acordo com a idade da ave e isto ocorrendo há um aumento da penetração bacteriana.

Segundo FROMM & MONROE (1960), a qualidade física interna e a contaminação bacteriana são influenciadas pela perda de permeabilidade da casca do ovo. A relação entre a permeabilidade da casca e a qualidade física interna pode ser atribuída a perda de dióxido de carbono do albúmen. A perda de peso da permeabilidade da casca e a perda de dióxido de carbono estão correlacionadas. Portanto, as diferenças entre a qualidade do albúmen provavelmente esta relacionada com a perda de dióxido de carbono no qual afeta o nível de permeabilidade da casca.

Contudo, fatores de stress físico como mudança de temperatura ambiente, umidade ligadas com a etapa de lavagem do ovo pode ser uma diferença na permeabilidade da casca do ovo o suficiente para facilitar a contaminação microbiana dos ovos.

2.3.5.2. Contaminação dos conteúdos

HAINES (1939) citado por BOARD (1966), diz que foram conduzidas investigações sobre as substâncias contidas na clara do ovo que são impedientes para o crescimento microbiano desde as décadas de 1880-1890. Muitos dos constituintes presentes na clara são

inibidores para o crescimento como: alto pH, lisozima, avidina, ovomucoidina, conalbumina (YADAV & VADEHRA, 1977; GARIBALDI, 1959; BOARD, 1966).

Em experimento realizado por STEPHENSON et alii (1991), mostrou-se que a contagem de SE inoculada em albúmen diminuiu três unidades logarítmicos, enquanto, que nas gemas não houve mudança significativa. Contudo, os organismos inoculados dentro da gema apresentaram aumento, indicando possível crescimento de SE. Então confirma-se o que já foi descrito acima, que o albúmen possui inibidores para o crescimento. Por causa do aparente stress da *Salmonella* no albúmen é necessário fazer um pré-enriquecimento para ressuscitar as células injuriadas, só sendo recomendado examinar as gemas para a presença desse patógeno.

Segundo HINTON & BALE (1994), as gemas de aves infectadas raramente contém salmonela, embora elas cresçam rapidamente em temperatura ambiente. Similarmente é impossível recuperá-las do albúmen, embora seja possível cultivá-las da mistura de gema e clara. Isso é devido as salmonelas estarem localizadas na membrana vitelina que envolve a gema, o qual não é cultivada quando gema e clara são amostradas separadamente; as salmonelas estão presentes no albúmen mas não crescem rapidamente devido ao pouco ferro disponível e por causa de substâncias antibacteriana presente, como por exemplo, lisozima, sendo que esta só é neutralizada quando a gema e clara são misturadas formando a melange.

Para explicar esses fenômenos experimentos foram citados por HUMPHREY (1994), revelando que a idade do ovo tem um impacto na habilidade de SE passar rapidamente no albúmen para a gema. Durante as primeiras vinte e quatro horas da postura do ovo quando o pH inicial era em torno de 7,0 chegando a aproximadamente 9,0, ocorreu um aumento de dez ciclos logarítmicos no número de salmonelas. Como o albúmen é um meio restrito em ferro e a fase inicial de crescimento que envolve a bactéria usando a reserva de ferro parece ser suficiente para que ocorra quatro gerações. Quando a reserva de ferro

for exaurida as células entram na fase lag, existindo pouca ou nenhuma mudança no número de microrganismos. A duração desta fase é dependente da temperatura.

Portanto, o que se pode explicar em relação a gema e o albúmen, é que os conteúdos da gema são ricos em ferro, mas células de SE não podem utilizá-los devido a presença da membrana vitelina de ovos frescos que não permitem o ingresso da bactéria na gema ou a liberação do ferro para o albúmen. Durante a estocagem a membrana vitelina quebra-se e em algum ponto torna-se permeável para a entrada do microrganismo na gema. Uma vez que isso ocorre, é possível haver um rápido crescimento e a *Salmonella* pode ser encontrada tanto na clara como na gema.

JONES et alii (1995), analisaram ovos de vários estágios de processo de ovos. *Salmonella* foi isolada de 72% de todas as amostras coletadas. As instalações de onde se isolou foram: lavador com jato de água, do ventilador, esteira e coletor de ovos, sendo (amostras positivas/total de amostras): 2/2, 4/4, 16/22, e 14/22 respectivamente. A contaminação foi detectada em sete das 90 amostras analisadas antes do processo e 1 ovo de 90 analisados depois do processo, mas nenhuma salmonela foi isolada das 180 amostras dos conteúdos internos analisados. Nenhuma *Salmonella* Enteritidis foi isolada tanto nas instalações como nos ovos examinados. Os sorotipos isolados das instalações foram: *S. agona, S. typhimurium, S. infantis, S. derby, S. heidelberg, S. california, S. montevideo, S. mbandaka,* e atípica. As isoladas dos ovos antes do processo foi *S. heidelberg e S. montevideo* e as isoladas após o processo foi *S. heidelberg.* De acordo com os resultados os pesquisadores concluíram que embora 1% dos ovos comerciais sejam contaminados com *Salmonella*, a contaminação dos conteúdos internos é rara.

2.3.5.3 Ovos quebrados

De acordo com TODD (1996), os ovos quebrados são considerados perigosos, devido ao seu conteúdo estar exposto a contaminação por bactérias patogênicas, sendo que esses ovos podem ser utilizados em alimentos crus ou cozidos.

Sete agentes microbianos são associados com as aves, ovos e água de lavagem, sendo considerados potencialmente perigosos em ovos quebrados. Destes sete microrganismos a *Salmonella*, tem sido a causa de surtos associadas a este tipo de produto. Os demais microrganismos são: *Bacillus cereus, Campylobacter, E. coli* O157:H7 ou outras verotoxigênicas, *Listeria spp, Staphylococcus aureus* e *Yersinia enterocolitica*.

Bacillus, Campylobacter, Samonella, S. aureus e Yersinia tem sido encontrados no meio ambiente ou nas aves podendo vir a contaminar os ovos através da casca. *E. coli* O157:H7/VTEC e *L. monocytogenes* não parecem ser comuns, embora existam poucos trabalhos a respeito delas, porém se forem depositadas na casca de ovos quebrados, são capazes de alcançar as membranas.

2.3.5.4. Influência da temperatura

O número de *Salmonella* que pode estar presente em ovos frescos infectados é inacessíveis. Contudo, a incidência de gastroenterites causadas por este microrganismo tem aumentado durante o verão. A dose inicial é provavelmente aumentada através do abuso de temperatura durante a estocagem e transporte dos mesmos. Freqüentemente são encontradas temperaturas acima de 40°C em muitos pontos comerciais durante o verão o que pode permitir alcançar uma contagem de organismo a um nível capaz de causar doenças. Em experimento realizado em ovos de galinha normais e aves soropositivas inoculados com uma unidade formadora de colônia por grama (ufc/g) foram constatados os seguintes resultados:

ovos de galinhas normais, o organismo multiplicou-se uma geração no tempo de 25 minutos, alcançando 10^8 ufc/g em 12 horas à 37°C. Atingiu uma geração no tempo de 3,5 horas incubados a temperatura de 15,5°C, temperatura esta normalmente utilizada para estocar ovos. Nenhuma multiplicação foi observada em ovos incubados à 7°C por 94 dias. Em ovos inoculados em aves soropositivas, quando incubados a 37°C, o organismo multiplicou-se com uma geração no tempo de 35 minutos, alcançando mais que 10^6 ufc/g em 12 horas (BRADSHAW et alii 1990; SHAH et alii 1991).

GAST & BEARD (1992), sugeriram que ovos postos por galinhas infectadas geralmente contém baixo número de *Salmonella*, a presença desta significa um risco em potencial que aumenta durante a estocagem prolongada em temperaturas não refrigeradas. Em relação a rápida multiplicação de SE em ovos HUMPHREY (1990a), publicou que ela ocorre em temperaturas entre 10-15°C.

De acordo com experimento realizado por HAMMACK et alii (1993), sobre a migração de SE através da clara para a gema e subseqüente crescimento na gema, foi examinado. Os ovos submersos em 1% clorofórmio mais tetracloridrato mercury por uma hora, seguida por submersão em etanol 70% por trinta minutos, resultou na superfície livre de salmonela. Nos ovos inoculados com SE sobre a membrana da casca, observou-se que nas gemas dos ovos armazenados à 26°C, pelo período de dois a dezesseis dias, obteve-se mínimo de 10^3 a máxima de 10^8 ufc/g. Os ovos armazenados em temperatura de refrigeração entre 2-8°C, no mesmo período, mostraram pouco ou nenhum crescimento de SE. Duas possibilidades pode explicar o crescimento nas gemas: migração da bactéria da casca através da clara para a gema e a mudança da gema próximo ao inóculo, durante a estocagem. Os resultados demonstram a possibilidade que ovos naturalmente contaminados com baixos números de salmonela pode aumentar este número a altos níveis se mantido em temperaturas ambiente por dois dias ou mais.

IANIERI et alii (1994), também demonstraram que o emprego da temperatura entre 8-10°C na comercialização de ovos reduz ao mínimo o risco de toxinfecção alimentar por ovo.

A duração do tempo antes dos ovos serem capazes de suportar o rápido crescimento de salmonelas no albúmen em volta da gema é governada pela temperatura de estocagem. Quando os ovos foram estocados sob temperaturas entre 18 e 30°C, simulando o que ocorre em cozinhas domésticas e comerciais, um rápido crescimento foi possível, na maioria dos ovos examinados. Por esses resultados obtidos, os ovos devem ser estocados sob refrigeração, ou seja abaixo de 8°C, depois de adquiridos pelos consumidores (HUMPHREY, 1994a).

Em relação a todos esses problemas, esta existindo um aumento a procura da indústria de ovos líquido e com isso cresce a preocupação em relação a contaminações. Com isso foi realizado nos Estados Unidos um estudo em diferentes regiões, revelando uma presença muito elevada de SE em ovos líquidos, antes da pasteurização. A investigação envolveu vinte plantas processadoras de ovos. Coletou-se as amostras de cada partida de ovo líquido antes de ser enviada ao trocador de calor (equipamento similar ao usado em laticínios). Do total de 1002 amostras 52% foram positivas para *Salmonella* sp e 13% positivas para SE pertencentes a diferentes tipos de fagos (8, 13, 13A, 14B, 23, 28, 34). Segundo este estudo, demonstrou-se a importância da refrigeração dos ovos que são destinados a essas indústrias processadoras (EBEL et alii, 1993).

Ocorre também uma influência do pH e temperatura no crescimento de *Salmonella* sp. MATCHES & LISTON (1972) citado por FERREIRA (1987), mostraram que *Salmonella heidelberg* não cresce no meio com pH 4,0 e temperatura entre -1 e 15,5°C por sete dias. Para que ocorresse o crescimento neste mesmo meio o pH teve que ser ajustado para 5,0 e a temperatura a 9,5°C e para um pH de 7,0 a temperatura mínima foi de 5,2°C. Em outro experimento utilizando temperaturas entre 2-12°C e incubadas em politermostato

por vinte e oito dias, *Salmonella heidelberg, Salmonella typhimurium, Salmonella deby* não cresceram em pH 4,0 ou 5,0, mas foi observado crescimento em pH 6,0.

Em estudo realizado por FERREIRA et alii (1987), mostrou-se que vários sorotipos de salmonela são capazes de iniciar o seu crescimento num meio de cultura de pH 3,8-4,2 quando incubados a 30 ou 20°C. Em casos de experimentos incubados a 10°C e pH entre 4,4-4,8 existe o risco de crescimento.

As diferenças de resultados entre MATCHE & LISTON (1972) e FERREIRA et alii (1987), devem ser em razão da diferença do meio de cultura e em parte na restrição de fornecimento de oxigênio no meio líquido.

2.4. *Salmonella* Enteritidis fagotipo 4 (SE FT4)

Em alguns países ocorre a predominância de certos tipos de fagos mais do que os outros. O fagotipo 4, segundo relatos foi o mais predominante na Grã-Bretanha, sendo raro nos Estados Unidos e Canadá. O fagotipo 8 e 13 são predominantes nos Estados Unidos (HINTON & BALE, 1994).

De todos os sorotipos, os mais comuns associados a casos humanos são *Salmonella typhimurum, Salmonella* Enteritidis *e Salmonella virchow* (SPACKMAN, 1989). Mas desde 1988, *Salmonella* Enteritidis tem se mostrado ser a maior causa de envenenamento alimentar, sendo que o fagotipo 4 merece maior atenção em relação a casos em humanos (SPACKMAN, 1989; HINTON et alii, 1990; BARROW, 1993).

Segundo HINTON et alii (1990), estudos mostram que o fagotipo 4 é o mais predominante em humanos. As galinhas são as principais reservas de FT4 e a carne de aves e ovos tem se mostrado ser um importante veículo de transmissão deste. O FT4 apresenta ser

mais invasivo do que os tipos pertencentes ao fago 7,8,13A e sugere-se que o FT4 possa realçar a virulência em galinhas.

HINTON & BALE (1994), relatam que em estudos não publicados mostrou-se que *Salmonella* Enteritidis é menos invasiva em galinhas jovens do que *Salmonella typhimurium*, embora possa a vir causar doenças em galinhas jovens, sendo a pericardite uma doença um tanto quanto incomum.

Esse sorotipo tem o comportamento de invadir o ovário, peritônio e camada do oviduto podendo resultar em um número significante de ovos contaminados ou contaminar a superfície da gema. Neste local as salmonelas são pouco inibidas devido ao fator quelante do ferro da ovotransferina presente no albúmen, podendo crescer mais rapidamente se os ovos não forem refrigerados. Estima-se uma contaminação de um ou menos ovos em 1.000 (SNOEYENBOS, "s.d.").

Segundo a Public Health Laboratory Service, os ovos implicados em casos ou surtos de infecção por SE PT4, mostraram que o organismo foi positivo em 0,1% nos conteúdos dos ovos (ANNON, 1989 citado por HUMPHREY, 1990).

Em comum com outros tipos de salmonela, este organismo quando presente nas gemas dos ovos artificialmente contaminados pode sobreviver em cozimentos comuns em cozinhas domésticas e comerciais. O grau de sobrevivência irá depender do tamanho do inóculo e do tipo de cozimento. Essa habilidade de SE sobreviver em ovos cozidos deve ser devida ao fato de ser mais termo-resistente do que as outras salmonelas associadas às aves domésticas (HUMPHREY, 1990).

Ainda de acordo com HUMPHREY (1990a), em relação a temperatura, o comportamento desse organismo é similar às outras salmonelas. Estudos mostraram que a salmonela, incluindo a SE PT4 pode crescer em ovos a temperatura ambiente, isto se deu

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

pelo fato de ter ocorrido um aumento de cinco células por gema para 10^{12} células por gema em dois dias de armazenamento.

2.5- Implicações em Saúde Pública

Doenças de origem alimentar, como por exemplo, doenças devido a alimentos contaminados tem sido um dos maiores problemas no mundo contemporâneo. As intoxicações ou infecções são causadas naturalmente ou por agentes, o qual entra no corpo através da ingestão de alimentos ou água contaminados. Esses agentes podem ser químicos, como os resíduos de pesticidas e metais tóxicos ou biológicos como os microrganismos patogênicos. Os alimentos contaminados pelos agentes biológicos são as maiores causas de doenças. Todo o ano a World Health Organization (WHO) recebe relatos de doenças de todo o mundo. Esses relatos tem indicado um aumento nos últimos anos de contaminação dos alimentos por origem biológica (NOTERMANS & HOOGENBOOM-VERDEGAAL, 1992).

De acordo com SPACKMAN (1989), a SE em 1988 foi relatada por ser a maior causa de surtos por de *Salmonella*, segundo a Public Health Laboratory Service. Embora, tenha se isolado de aves domésticas foi feito também a associação dos casos humanos com ovos e produtos contendo ovos crus ou levemente cozidos, sendo que na Grã-Bretanha foram os de maior destaque. Os produtos envolvidos foram maionese ou creme para salada e mousses onde a preparação e o cuidado após a preparação foram duvidosos. O mesmo assunto também foi abordado na WPSA Congress in Amsterdã, onde a ênfase foi o fato do alastramento de SE na indústria de ovos da Grã-Bretanha e como o organismo se espalhou pela Europa e Estados Unidos (FAIRBROTHER, 1993).

A preocupação das doenças causadas por salmonelas é muito importante em relação a saúde pública, não somente em países desenvolvidos mas também em países subdesenvolvidos. Isso ocorre principalmente devido a mudanças no hábito alimentar; a

maneira como os alimentos são comercializados e por causa das deficiências durante a produção, estocagem e distribuição dos produtos (CAFFER & EIGUER,1994).

Desde 1978, SE foi responsável pelo aumento de casos de intoxicações na Espanha. Em 1977 *Salmonella typhimurium* causou cerca de 8% dos surtos, e em 1984 ela permaneceu estável e SE foi responsável por 40% dos surtos. Na região de Basque, SE foi responsável por 78% dos surtos sendo que ovos e produtos de ovos foi o veículo para 90% dos surtos causados por salmonela. A situação pode ser explicada pelas práticas culinárias na Espanha, como preparação de maionese caseira ou em restaurantes ou ainda o consumo de omeletes levemente cozidos. Quando amostrados 1.000 ovos, não sabendo se eram incriminados nos casos de salmoneloses humana, foram encontrados SE em seis ovos. Em estudos realizados nos casos de salmoneloses foi isolado o mesmo sorotipo e fagotipo da clara e gema tanto dos alimentos e como também das fezes dos pacientes (PERALES & AUDICANA, 1988).

Nos Estados Unidos (E.U.A), de acordo com o CDC (Centers For Diseases Control), desde 1985 ocorreram 340 surtos de intoxicação alimentar envolvendo SE. O veículo alimentar foi determinado em 151 (48%) surtos, sendo que 125 (83%) surtos foi relacionado a ovos (OPITZ, 1992).

De 1976 a 1991, a proporção de relatos isolados de salmonela nos E.U.A. teve um aumento de 5 para 20%; SE ficou em 2° lugar seguida da *Salmonella typhimurium*, exceto em 1989 e 1990 quando SE foi o sorotipo mais relatado (EWERT, 1993).

Durante 1985-1992 nos E.U.A., por região foram relatados 430 surtos por SE, o qual 162 casos de doenças, 1734 hospitalizações e 53 mortes. (Tabela 1).

TABELA 1: Surtos de infecção por *Salmonella* Enteritidis , por região nos E.U.A., 1985-1992

	NORDESTE		OUTRAS REGIÕES		TOTAL	
ANO	N°	%	N°	%	N°	%
1985	21	81	09	19	26	06
1986	39	81	09	19	48	11
1987	40	77	12	23	52	12
1988	24	60	16	40	40	09
1989	58	77	17	23	75	17
1990	32	48	35	52	67	16
1991	34	51	33	49	67	16
1992	39	71	16	29	55	13
TOTAL	287	67	143	33	430	100

Fonte: EWERT, 1993

Segundo MASON (1994), em 1988 o CDC relatou em Atlanta, Georgia um aumento alarmante no número de surtos e casos de salmonelose humana, causada por SE. Entre 1985 a 1989, ocorreram 217 surtos envolvendo 7370 pacientes do qual morreram 44. Pode-se constatar que ocorreu um aumento de surtos de vinte e seis (26) em 1985 para setenta e sete (77) em 1989, sendo que em 1989 foram associados 2394 casos e 14 mortes. E os alimentos feitos com ovos frescos pareceram estar envolvidos na maioria dos incidentes.

Durante quatro meses do ano de 1993 ocorreram três surtos causados por SE na Califórnia, como relatado a seguir (EWERT, 1993):

Em Janeiro de 1993, no município de Los Angeles, foram identificado quatro casos de salmoneloses em pessoas que haviam se alimentado em um restaurante local. Todas as

quatro pessoas haviam comido pratos baseados em ovos (omeletes, saladas) no restaurante durante 26-12-1992 e 06-01-1993.

Em fevereiro de 1993, 23 pessoas que se alimentaram em um restaurante do município de San Diego desenvolveram dores abdominais e diarréia sendo que duas pessoas foram hospitalizadas. Molho holandês, preparado com uma dúzia de ovos crus foi o principal veículo.

No município de Santa Clara, em março de 1993, 22 pessoas que se alimentaram de sanduíche durante os dias 28 de fevereiro e 04 de março desenvolveram diarréia e dores abdominais. Através da cultura de fezes das pessoas doentes, apresentou SE. O sanduíche foi identificado como o veículo de transmissão, sendo que a maionese foi o único ingrediente que continha produto de origem animal cru.

O caso que poderia ter se tornado uma catástrofe para a indústria de ovos ocorreu na Grã-Bretanha em 1988. Em uma entrevista dada para a televisão a Ministra do Departamento de Saúde da Grã-Bretanha disse que a maioria da produção de ovos do país estava infectada com salmonela. Com isso houve um declínio no consumo de ovos entre 50-60%.

Após a renúncia da ministra e as explicações dada pelo ministério da Agricultura, o comércio de ovos começou a recuperar-se.

Pesquisas na produção de ovos britânicos falharam ao identificar o culpado. Apesar disso, as autoridades da saúde pública e outras autoridades insistiram num programa extremamente caro, para minimizar o nível de SE na cadeia alimentar (HUNTON, 1991).

No Canadá, a incidência de infecção por SE em humanos tem aumentado ligeiramente durante os últimos 2-3 anos. O isolamento de SE variou entre 4,2 e 9,2 % de

todas as salmonelas isolada entre 1976 e 1989 (KHAKHRIA et alii 1991 citado por POPPE, 1994). Essa porcentagem aumentou para 12,5% em 1991 e a SE ficou em segundo lugar logo após *S. typhimurium* (20,3%).

O aumento da incidência de SE em pessoas no Canadá não tem sido tão significativo como na Europa, Estados Unidos e América do Sul. Um dos relatos ocorreu entre pacientes e funcionários de um hospital regional de Ontário, o qual foi confirmado 95 surtos por SE fagotipo 13. O veículo de transmissão foi um liqüidificador de difícil limpeza usado para misturar ovos, carne moída e recheio de sanduíche (POPPE, 1994).

Em relação a predominância de fagotipos no Canadá, segundo LIOR & KHAKHRIA (1992) citado por POPPE (1994), SE isolada de pessoas foram dos tipos 8 (56,8%); 4 (18,3%) e 13a (5,1%), existindo indicações que o fagotipo 4 senão todos , mas a maioria tenha sido adquirido fora do país.

Em um estudo detalhado de 318 cepas de SE, estimou-se a prevalência de SE e outras sorotipos de Salmonella em aves e no seu meio ambiente no Canadá, apresentando os fagotipos 8, 13 e 13a (55,9; 25 e 4,4% respectivamente). Somente dois dos 318 SE era fagotipo 4 (POPPE et alii 1993a citado por POPPE, 1994).

Nos últimos anos SE tem sido um dos maiores problemas de saúde pública na Itália bem como em outros países da Europa.

Nos períodos entre 1978-1988 SE justificou 5,45% dos 118.685 de *Salmonella* sp isolada do homem e 2,65% dos 3.315 de *Salmonella* sp isolada da comida italiana. Do mesmo período foi isolado SE em 7,4% das 568 *Salmonellas* sp isolada de ovos e aves domésticas, sendo isolado também de 88 amostras de alimentos, dos quais 42 (47,7%) foram feitos com aves e ovos.

Segundo FANTASIA & FILETICI (1994), durante o período que compreende de 1982 a 1992, o número e porcentagem de SE aumentou de 2,4% para 57,1% em humanos e 0,5% para 22,8% em alimentos. (Tabela 2).

Dos 98 alimentos isolados geralmente correlacionados a surtos 60,2% foram isolados de ovos e seus produtos e 15,3% de carne de galinha; também foram isolados de carnes e vegetais.

Em 1989, o National Centre for Enteric Pathogens relatou um aumento de SE, sendo que SE foi envolvida em pelo menos 18 surtos, 14 no Centro e 4 no Norte da Itália. Destes quatro do Norte e cinco do Centro foram associados com o consumo de ovos e seus produtos (FANTASIA et alii, 1991).

O estudo realizado por FANTASIA et alii (1992), em conseqüência de quarenta e dois (42) surtos ocorrido em 1991 mostrou que produtos contendo ovos crus ou mal cozidos foram as principais fontes implicados nestes surtos. Os veículos mais comuns foi tiramissu (27% dos surtos), maionese (14%) pasta feita com ovos (11%). O fagotipo mais isolado foi o 4 (76% de fonte humana e 62,5% de não humana).

TABELA 2: Número de *Salmonella sp* e *Salmonella* Enteritidis isoladas de homens e alimentos (Itália, 1982-1992)

ANO	ISOLADO HOMEM			ISOLADO ALIMENTO		
	Salmonella sp	SE		*Salmonella sp*	SE	
	n	n	%	n	n	%
1982	9530	225	2,4	208	1	0,5
1983	8668	358	4,1	394	8	2,0
1984	10484	499	4,8	398	6	1,5
1985	13861	837	6,0	539	13	2,4
1986	12991	885	6,8	364	20	5,5
1987	7863*	545*	6,9	874*	12*	1,4
1988	15041	1112	7,4	2290	109	4,8
1989	5759	1084	18,8	1732	103	5,9
1990	405*	160*	39,5	105*	10 *	9,5
1991	985*	312*	31,6	420*	61*	14,5
1992	9615	5492	57,1	2687	612	22,8

*Dados parciais

Fonte: FANTASIA & FILETICI, 1994

De acordo com os autores DERA-TOMASZEWSKA (1984); GLÓSNICKA, (1986, 1992) citado por GLÓSNIKA & KUNIKOWSKA, (1994) as infecções de origem alimentar causadas por salmonela tem sido um problema por muitos anos na Polônia e desde 1978, vem ocupando o primeiro lugar entre as infecções bacteriana em humanos.

As porcentagens de SE vem se destacando em relação aos demais sorotipos chegando em 1991 a 93,8% das infecções e infectando cerca de 503.559 pessoas e ocorrendo assim uma diminuição em relação aos outros sorotipos como *S. typhimurium* e *S. agona* (Tabela 3).

A primeira epidemia de SE ocorrida na Polônia foi entre 1962 a 1976 e afetou 59.513 pessoas. A infecção de SE difundiu-se principalmente em crianças hospitalizadas (idade 0-14), que estavam doentes e trazidas para os hospitais como pacientes e espalhavam a infecção pelo meio.

MACIAK & KUBINSKI (1990) citado por GLÓSNIKA & KUNIKOWSKA (1994), examinando produtos feitos a base de ovos concluíram que 15% de 20 amostras de "egg-pulp" eram contaminadas com SE e *Salmonella gallinarium*; 24,61% das 65 amostras de ovos em pó foram contaminadas e que somente SE foi isolada.

Em relação ao fagotipo predominante na Polônia, 2100 cepas isoladas entre 1980-1990, foram fagotipados por GLÓSNICKA et alii (1990) citado por GLÓSNICKA & KUNIKOWSKA (1994) e a maioria pertenciam aos fagotipos 7, 1 e 6.

Umas das causas do número de casos na Polônia é devido ao estado de pobreza da população. Os produtos predominantes envolvendo a intoxicação alimentar são os ovos, mas não se descarta as carnes e produtos de carne (GLÓSNICKA & KUNIKOWSKA, 1994).

TABELA 3 :Porcentagem de *Salmonella* Enteritidis e outros sorotipos de salmonela em humanos na Polônia.

ANO	sorotipo %				
	S. enteritidis	*S. typhimurium*	*S. agona*	Outros	Total pessoas 100%
1975	14,2	29,5	9,1	47,2	15173
1976	11,7	40,2	14,4	33,7	8896
1977	6,9	49,9	19,6	23,6	11643
1978	9,7	45,2	24,4	20,7	19229
1982	35,5	39,2	21,6	3,7	26522
1983	40,7	36,4	14,9	8,0	29069
1984	57,9	23,9	12,9	5,3	47799
1985	64,4	18,1	11,2	6,3	65045
1986	79,0	13,2	4,3	3,5	69585
1987	76,2	12,9	3,2	7,7	74651
1988	88,1	7,5	1,2	3,2	95160
1989	89,9	6,8	0,8	2,5	78664
1990	91,9	5,0	0,2	2,9	72131
1991	93,8	2,8	0,2	3,2	76891

Fonte: GLÓSNICKA & KUNIKOWSKA, 1994

CAFFER & EIGUER (1994), descrevem que nos últimos trinta anos a Argentina tem dado maior interesse em relação a incidência de *Salmonella*. Até 1969 os casos de salmonela foram comparados a outros agentes enteropatogênicos e *Salmonella typhimurium* e *Salmonella oranienburg* foram os sorotipos prevalentes.

A partir de 1986 houve um aumento de incidência de SE, o qual era raramente isolado até então (CAFFER et alii 1992).

Segundo os relatos entre 1987 e 1990, SE foi o sorotipo de maior prevalência isolado de humanos. Durante 1991, ficou em segundo lugar precedida por *S. typhimurium* e em 1992 permaneceu no mesmo lugar mas foi precedida por *S. infantis* (CAFFER & EIGUER, 1994).

De 1986 aos primeiros seis meses de 1993 ocorreram 150 surtos, causados por SE, envolvendo 6230 pessoas (tabela 4). As principais fontes de infecção foram os alimentos que continham ovos crus ou mal cozidos como maionese feita em casa, sorvetes e molhos (CAFFER & EIGUER, 1994).

TABELA 4: Surtos de *Salmonella* Enteritidis na Argentina, 1986 a 1993.

ANO	SURTOS	POSITIVOS FEZES	LAB ALIMENTO	INDIVÍDUOS AFETADOS
1986	5	4	1	150
1987	17	12	9	1100
1988	17	12	13	1130
1989	24	17	13	660
1990	31	22	16	1420
1991	32	19	15	970
1992	9	7	2	380
1993*	15	14	2	420
Total	150	107	71	6230

*Primeiros seis meses

Fonte: CAFFER & EIGUER, 1994.

Na Austrália existem poucos casos de surtos onde o alimento incriminado seria as aves. O último caso de surto foi determinado devido ao inadequado cozimento e manuseio.

A indústria de carne de aves na Austrália possui um programa ativo para minimizar a contaminação de seus produtos por microrganismos, por isso o motivo da baixa incidência de contaminação.

Na Holanda, a epidemiologia de *Salmonella* tem sido estudada em detalhes. Estudos nos finais dos anos 60 e início dos 70 indicaram amostras positivas entre 13 a 73% em aves congeladas e 9 a 37% para ovos não pasteurizados (van SCHOTHORST & van LEUSDEN, 1975 citado por van SHOTHORST, 1986).

De acordo com van GIESSEN et alii (1994), a porcentagem de SE isolada de humanos tem aumentado como ocorre em outros países, sendo de 3,9% em 1987 para 34,4% em 1991 e em 1992 atingindo 35,5%.

De acordo com a estimativa publicada nos E.U.A., sugere que mesmo em áreas de grande incidência menos do que um ovo em 10000 poderia ser infectado naturalmente, e no Canadá em 1989 pesquisas realizadas concluíram que menos do que um ovo em um milhão poderia ser infectado (HUNTON, 1991). Esses dados devem ser revistos pois a incidência envolvendo SE tem aumentado cada vez mais, principalmente quando envolve alimentos consumidos fora de casa.

Como sabe-se o ovo é um alimento com proteína de alto valor biológico e acessível, com relação ao preço à população mesmo as de baixa renda, por esse motivo está se dando no Brasil o maior interesse aos problemas de microrganismos que podem causar intoxicações alimentares ou infecções gastrointestinais graves.

No Brasil, a SE foi isolada recentemente de galinhas reprodutoras que apresentavam sinais clínicos de salmonelose aviária e mortalidade considerável (FERREIRA et alii, 1990).

Em 1990, em pesquisa realizada por TOLEDO et alii, em amostras de ovos comerciais no município de Recife, não encontrou *Salmonella* nas amostras.

Segundo LANGONI & PRADO (1995), foram examinados 612 ovos obtidos em diversos estabelecimentos comerciais de Botucatu - S.P, isolando-se de 102 amostras (612 ovos) 59 (57,84%) positivas para pelo menos um microrganismo. Em relação a salmonela, encontrou-se resultados positivos em quatro amostras (24 ovos), correspondendo a 3,92%, sendo 1,96% pertencentes ao sorotipo enteritidis, 0.98% ao sorotipo virchow e 0,98% ao typhimurium.

Em Teresina, P.I., devido aos ovos serem estocados a temperatura ambiente foram realizados experimentos em ovos comerciais para se verificar a presença de salmonela. Foram analisada 16 amostras com 18 ovos cada, e estes foram divididos em sub-lotes com nove ovos e estocados a temperatura ambiente e de refrigeração por nove dias e depois feito as análises para presença de salmonela. Isolou-se salmonela em 100% das amostras, mesmo as que foram mantidas sob refrigeração (MURATORI et alii, 1995).

Uma das toxinfecções alimentares causadas por SE, ocorreu em Curitiba em julho de 1981, em um restaurante no bairro de Santa Felicidade. Dos alimentos analisados (12 tipos) cinco se encontravam contaminados por bactérias do grupo coliforme fecal e duas amostras de frango cru temperados em pedaços contaminados por *Staphylococcus aureus*. A investigação epidemiológica permitiu a identificação do alimento contaminado, a maionese (MOTA et alii, 1983).

Em Araraquara -S.P., em 1983, uma refeição suspeita foi servida a 922 pessoas em um refeitório de uma indústria e 561 operários apresentaram problemas gastrointestinais.

Não foi possível fazer um levantamento dos alimentos ingeridos. As coproculturas foram positivas para *Salmonella bredeney* e para todos os pacientes a fonte de infecção foi a mesma. Então, o veículo do agente etiológico envolvido neste caso deve ter sido um ou mais dos alimentos servidos (LANDGRAF et alii, 1985).

De acordo com PICCOLO et alii (1992), outro surto ocorreu em uma cantina escolar no dia 31/8/91, onde foram servidos: macarrão com molho de tomate, salada de legumes com molho de maionese (feita com ovos crus), frango assado e filé de carne bovina. Conseguiu-se colher amostras de todos os alimentos servidos menos da maionese pronta (molho mais os legumes), mas adquiriu-se os ovos

O resultado mostrou que o causador do surto foi *Salmonella* sp e o alimento veiculador foi a salada de maionese. O fator que contribuiu para a ocorrência do surto foi a contaminação cruzada, pois no frango cru analisado encontrou-se a *Salmonella berta* e no mesmo local onde foi preparado o frango também foi manipulada a salada de maionese, e a conservação foi por tempo e temperatura inadequados.

Descartou-se a hipótese dos ovos estarem contaminados, pois devido aos dados obtidos posteriormente além das análises dos ovos e do molho não acusarem presença da bactéria, eles foram utilizados em sanduíches que não causaram doenças.

Em publicação do Jornal do Grande ABC no dia 26 de janeiro de 1995, relatou que a salmonela intoxicou cerca de 222 pessoas no mês. Cerca de 150 funcionários de uma fábrica em São Bernardo do Campo foram intoxicados. Outro caso foi um bolo com recheio de nozes servido por um buffet em São Caetano do Sul. E em um restaurante também em São Bernardo do Campo, pelo menos 42 pessoas passaram mal. De todos esses surtos foram mandados amostras para o Instituto Adolfo Lutz, para se fazer análises para salmonela.

Salmonella Enteritidis também foi responsável por quatro surtos ocorridos na cidade de Sorocaba - S.P. a partir de novembro de 1994, nos seguintes estabelecimentos: restaurante self-service, em domicílio, em ceia de Natal de uma indústria.

Todos os surtos envolveram no total 298 expostos, sendo 90 (33,22%) afetados, 38 (38.38%) coproculturas realizadas sendo 30 (78,94%) positivas para SE.

SE foi isolada de várias amostras, principalmente, de maionese caseira e também de outros alimentos cozidos, o que vem a crer ter ocorrido uma contaminação cruzada (ARAÚJO et alii, 1995).

De acordo com o inquérito epidemiológico realizado entre setembro de 1994 a junho de 1995 por PISANI et alii (1995), apontou-se os alimentos veiculadores mais freqüentes como: maionese (84,6%), maionese com frango (7,7%), mousse (7,7%), porém não foi possível esclarecer qual o alimento suspeito em dois desses surtos. 624 pessoas foram afetadas e ocorreu um óbito. Em 11 surtos (73,3%) isolou-se SE das fezes; em 3 (20%) dos alimentos consumidos e fezes e 1 (6,7%) apenas nos alimentos.

Outros surtos ocorridos em outra cidade do interior de São Paulo, foram relatados por PERESI et alli (1995). No período de julho de 1993 a maio de 1995 foram relatados 12 surtos na região. O número de pacientes afetados foram 615, o número de pacientes hospitalizados foram 192. Os alimentos envolvidos foram maionese caseira e molhos feitos com ovos crus e carne de frango, sendo verificada a presença de SE nos alimentos. As coproculturas também foram positivas para SE.

Em artigo apresentado pelo jornal a Folha de São Paulo (1995), ocorreu uma intoxicação em uma fábrica em Jaraguá do Sul, Santa Catarina. O alimento causador foi a maionese servida no almoço, onde após feito análise foi encontrada a bactéria salmonela.

Segundo LÍRIO et alii (1995), foram isolados de 01/1992 a 05/1995 quarenta e duas (42) cepas de *Salmonella* em alimentos na Secção de Microbiologia, do Departamento de Inspeção Municipal de Alimentos. Os sorotipos identificados foram: Enteritidis (33,3%); Agona (11,9%); Anatum (9,5%); Brandenburg (9,5%) e Hadar (7,4%). Os alimentos que originaram maior número de isolamentos foram frango cru (42,8%) e lingüiça crua (28,6%). Os alimentos envolvidos em surtos representaram cerca de 21,4% dos isolados sendo que a Enteritidis foi o sorotipo mais predominante (89%).

De acordo com FERNANDES et alii (1995) e IRINO et alii (1995), caracterizaram pela fagotipagem as cepas isoladas no Estado de São Paulo. A freqüência de SE nos períodos 1975-1992 variou de 0,2 a 2%. No período de 1975-1992 houve um predomínio do fagotipo 8 (PT8), correspondendo a 90,6% das cepas de origem humana e 60,0% de fontes não humanas. A partir de 1993 o fagotipo 4 (PT4) passa a ser predominante, correspondendo a 10,1% das salmonelas de origem humana e 1,8% de fontes não humanas. Atualmente este sorotipo corresponde a 56,2% e 43,4% das salmonelas de origem humana e não humana, respectivamente.

2.6.- Prevenção e Controle

O controle de *Salmonella sp* em alimentos deve envolver a seleção de produtos crus não contaminados, destruição de salmonela, prevenção de contaminação e/ou prevenção de multiplicação. (SIMONSEN et alii, 1983).

A coleta de ovos, a espécie, fumigação e desinfecção de certos equipamentos são pontos críticos de controle nas fazendas produtoras.

De acordo com a metodologia, Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP), os ovos devem ser coletados freqüentemente, de preferência automaticamente para minimizar a contaminação fecal e os ovos quebrados e sujos não devem ser usados na incubadeira; todos

devem ser fumigados com formaldeído logo após a coleta e as bandejas de ovos devem ser lavadas e desinfetadas depois do uso (SIMONSEN et alii, 1983).

Não é possível produzir ovos limpos portanto, a desinfecção dos ovos deve ser efetuada logo após a postura, pois se houver demora dessa desinfecção os germes podem penetrar pela casca do ovo e a desinfecção por agentes químicos não terá nenhuma eficácia (SCHRIKE, 1973).

Segundo, STADELMAN (1977), a lavagem é o método mais simples e efetivo para remover sujeiras e manchas da superfície dos ovos. Porém, com a lavagem existe a possibilidade de penetração da bactéria pela casca. De acordo com MOUNTEY (1976) os poros da casca e a expansão e contração dos conteúdos dos ovos durante a lavagem pode causar problemas. Os ovos frios em contato com água quente expande-se muito rápido, ocorrendo a ruptura da casca. Portanto, o interior do ovo através desse mecanismo pode contrair a bactéria .

Para minimizar os problemas pode-se fazer a limpeza dos ovos por "spray" com água usando um sanitizante com detergente para limpá-los, enxaguando com água morna e finalmente secando os ovos.

Devido aos problemas existentes o Departamento da Agricultura dos E.U.A., criou algumas recomendações para a lavagem do ovo: lavar os ovos logo após ser coletado; não tentar limpar os ovos excessivamente sujos; não imergir os ovos mais do que cinco minutos; não reutilizar a água de lavagem exceto quando for um lavador contínuo; a temperatura da água de lavagem deve ser de 32°C; manter a água de lavagem na temperatura mais morna do que os ovos; o "spray" de enxaguagem deve ser de água morna potável e conter um sanitizante apropriado; os ovos devem ser secos antes de encaixotá-los ou quebrá-los.

GAST (1992), realizou um experimento imergindo ovos em água quente por cinco segundos para reduzir a incidência e o nível de SE nas cascas dos ovos. O tratamento foi altamente efetivo na redução dos números de SE em ovos artificialmente contaminados.

O uso de sanitizantes adequados na lavagem de ovo é uma prática aceitável. O mais utilizado são os compostos de cloro. O cloro quando usado acima de 50 ppm, pode colorir de leve a casca, isso é provavelmente a reação entre o cloro e algum aminoácido da cutícula da casca. Esse problema é minimizado utilizando escovas de lavagem (STALDEMAN, 1977).

RISK et alii (1966) citado por AFONSO (1994), pesquisou ovos artificialmente contaminados com salmonelas e encontraram que vários sanitizantes à base de cloro e compostos quartenários de amônio (Q.A.C.) foram efetivos na remoção dos microrganismos presentes na casca, não demonstrando efetividade contra os que conseguiram penetrar no interior do ovo.

De acordo com o experimento realizado por WORLEY et alii (1992), ele comparou a eficácia de compostos com N-halamina com cloro livre (hipoclorito de sódio). Os resultados obtidos mostraram que os compostos de N-halamina foram mais eficientes, não se difundindo através da casca, quando comparado com o cloro.

Segundo HAMMACK et alii (1993), pode-se controlar SE através da refrigeração. A temperatura de armazenamento é fundamental para reduzir a migração de SE da casca e clara para a gema e sua multiplicação no interior do ovo. A temperatura de armazenamento para que a SE praticamente não se multiplique é entre 2-8°C. Portanto, os ovos que não são mantidos sob refrigeração podem apresentar progressivamente um maior risco durante a estocagem.

O risco de infecção adquirida através do consumo de alimentos preparados em cozinhas domésticas pode ser reduzido através da educação dos consumidores retardando o risco de consumir ovos crus ou mal cozidos e através da maior disponibilidade de ovos pasteurizados no varejo. Em hospitais, cozinhas comerciais, devem-se usar ovos pasteurizados, e devido a doenças associadas com salmonelose ocorrer entre crianças, velhos e pessoas de baixa imunidade, essa pessoas não devem se servir de alimentos contendo ovos crus ou mal cozidos (EWERT, 1993).

De acordo com CATALANO & KNABEL (1994) citado por HOU et alii (1996), existem muitos métodos de preservação e sanitização das cascas dos ovos, como lavagem, chilling rápido, irradiação e tratamento ultrasônico, mas com uma ressalva , estes tratamentos não destroem a salmonela que está abrigada dentro do ovo.

Segundo VANTITH et alii (1995) citado por HOU et alii (1996) a ionização por irradiação tem sido usada para produzir ovos livres de salmonela , porém este processo abaixa a qualidade do ovo.

Como já foi citado, a pasteurização é um meio efetivo em ovos líquidos, mas não tem sido aplicado em ovos "in natura" devido ao aquecimento mudar a qualidade dos componentes dos ovos.

HOU et alii (1996) realizaram experimentos para eliminar salmonela usando banho de água quente e sistema de aquecimento e juntamente investigaram a qualidade e as propriedades funcionais dos ovos.

Neste experimento foi utilizado um banho à 57°C, com circulação de água em tempos de 10, 15, 20 e 25 minutos e um sistema a quente à 55°C com circulação de ar forçado por 1,2, e 3 horas, e depois os ovos foram imediatamente refrigerados. De acordo a turbidez, viscosidade e atividade da lisozima apresentaram diferenças significativas.

Segundo VANLITH et alii (1995) citado por HOU et alii (1996) SE, em processo de pasteurização por água quente à 57°C por 30 minutos é ineficiente. Diz-se que a combinação dos dois métodos citados acima resulta em uma redução de 7 ciclos logarítmicos de SE.

De acordo com KUO et alii (1997), realizando uma comparação com a desinfecção dos ovos com água destilada, solução de cloro a 200 ppm e composto de peroxidase catalase (PCC) tanto para *Salmonella typhimurium* e SE todos os tratamentos foram efetivos. A vantagem do PCC é que pode ser uma alternativa em substituição ao cloro devido as reações adversas do mesmo.

Países como o Canadá, Holanda, Suécia, Inglaterra e Estados Unidos fizeram programas estratégicos para controlar SE na produção de ovos. Embora as cinco nações instituíssem controles para SE nos principais pontos da produção de ovos, os programas tem características distintas. Esses programas tem-se tornado mais parecidos em relação ao cooperativismo entre o governo e a indústria (ALTEKRUSE et alii, 1993).

No Estado de Santa Catarina onde ocorreram episódios de intoxicação, a Secretaria da Saúde baixou portaria proibindo a elaboração e comercialização de alimentos que contenham ovos crus em sua composição.(ANON, 1995)

Em Brasília e em São Paulo, onde foram detectados alguns casos ainda nenhuma medida foi tomada ao que se tem conhecimento (OLIVEIRA, 1995).

3- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

3.1.1. Cultura Bacteriana

Para as contaminações experimentais, foi utilizada uma cepa de *Salmonella* Enteritidis *(SE)* isolada de galinhas clinicamente doentes (FERREIRA et alii, 1990). Para facilitar as análises laboratoriais, foi utilizado um mutante desta cepa resistente a concentrações de 100 μg/ml de ácido nalidíxico (SE-Nal^R) em meio TSB. A cepa SE-Nal^R foi fagotipada como fagotipo 28 na Inglaterra (SILVA, E. N. Comunicação Pessoal).

A cultura estoque foi mantida em frascos tipo penicilina, contendo ágar soja triptona[1] (TSA) adicionado de Nal, com repiques periódicos e armazenada em geladeira a temperatura entre 4°C e 8°C. Para os experimentos em que esta cepa era utilizada, todos os meios eram adicionados de 100 μg/ml de Nal.

Para as inoculações experimentais, em todos os testes, a cepa era reativada através do cultivo em caldo triptona de soja[1] (TSB) por 18 a 24 horas à 37°C. A contagem mostrava aproximadamente 10^8 unidades formadoras de colônia (UFC) por ml de cultura e era realizada através de diluições decimais seriadas em água peptonada tamponada[1] (APT) e plaqueamento em duplicata em meio TSA.

---

[1]Difco

3.1.2. Ovos

3.1.2.1. Para a pesquisa de *Salmonella sp.* em ovos comerciais de galinha, as amostras eram coletadas no mercado como feiras-livres, supermercados, quitandas, armazéns nas suas embalagens originais e levadas ao laboratório.

3.1.2.2. Para os experimentos com contaminações e inoculações experimentais da cepa SE-Nal^R, foram utilizados ovos brancos de galinha com casca íntegra obtidos de granja comercial, obtidos na mesma semana de uso. Eles não eram lavados nem sofriam nenhum processo de limpeza prévia. Eram provenientes de um único lote de poedeiras e transportados ao laboratório onde eram mantidos à temperatura ambiente.

3.1.3. Equipamentos

Copos homogeneizadores (Waring Blender);
Separador de clara e gema;
Estufa incubadora para BOD, modelo 347, Fanem;
Homogeneizador de pistões, "Stomacher Lab Blender - Seward Medical";
Refrigerador doméstico - Quality 420 - Frosfree Brastemp

3.1.4. Outros

Materiais e equipamentos de uso corrente em um laboratório de microbiologia.

3.2. Métodos

3.2.1. Recuperação e contagem de SE-Nal^R das amostras.

A recuperação e contagem de SE-Nal^R das amostras era feita através do plaqueamento de 0,1 ml da suspensão e respectivas diluições decimais, em duplicata, por espalhamento na superfície de placas de Petri contendo Ágar MacConkey[2] adicionado de 100 µg/ml de Nal e incubadas à 37°C por 48 horas em estufa BOD[4]. A enumeração dos inóculos foi feita através de diluições decimais seriadas em água peptonada tamponada[1] (APT) e plaqueada em duplicata em TSA. A leitura foi realizada em contador de placas, no aparelho contador de colônias CP 600 .

3.2.2. Experimento 1. Ocorrência de *Salmonella sp.* em ovos comerciais de galinhas coletados em pontos de vendas.

Para este experimento foram coletadas 124 amostras de ovos de galinha em supermercados, feiras, armazéns e mercadinhos, entre os meses de janeiro e março de 1995, totalizando 1.240 ovos analisados. As amostras eram adquiridas no mercado nas suas embalagens de comercialização, polpa de papelão de uma dúzia ou de duas dúzias e meia. As análises eram realizadas no dia posterior a chegada dos ovos ao laboratório. Para a pesquisa de *Salmonella sp.*, cada amostra era constituída de 10 ovos e seguia a seqüência, como determinado no diagrama mostrado na Figura 02.

---

[1] Difco
[2] Merck
[4] Modelo 347 CD da Fanen

Os 10 ovos de cada amostra eram quebrados para a separação da cascas e das gemas dos ovos, tomando-se cuidados de assepsia. O conjunto "pool" de 10 cascas e 10 gemas eram separados para análise bacteriológica. Para a separação e quebra dos ovos foi utilizada pinça estéril e flambada. As cascas eram colocadas em sacos plásticos onde se prosseguia a trituração manual das mesmas. Após esta etapa, eram pesados 25 gramas das cascas, colocados em copos metálicos homogeneizadores[3] com 225 ml APT[1] e realizada a trituração por 1 minuto.

As gemas eram separadas das claras através de separadores de clara e gema estéreis. As gemas eram colocadas em sacos plásticos e realizada a mistura manualmente. Era coletada uma alíquota de 25 gramas desse "pool" mais 225 ml APT[1] e homogeneizado em Stomacker[6] por 15 segundos.

---

[1] Difco
[3] Harmless Chemical
[6] Triturador Mecânico Stomacker - Lab Blender 400

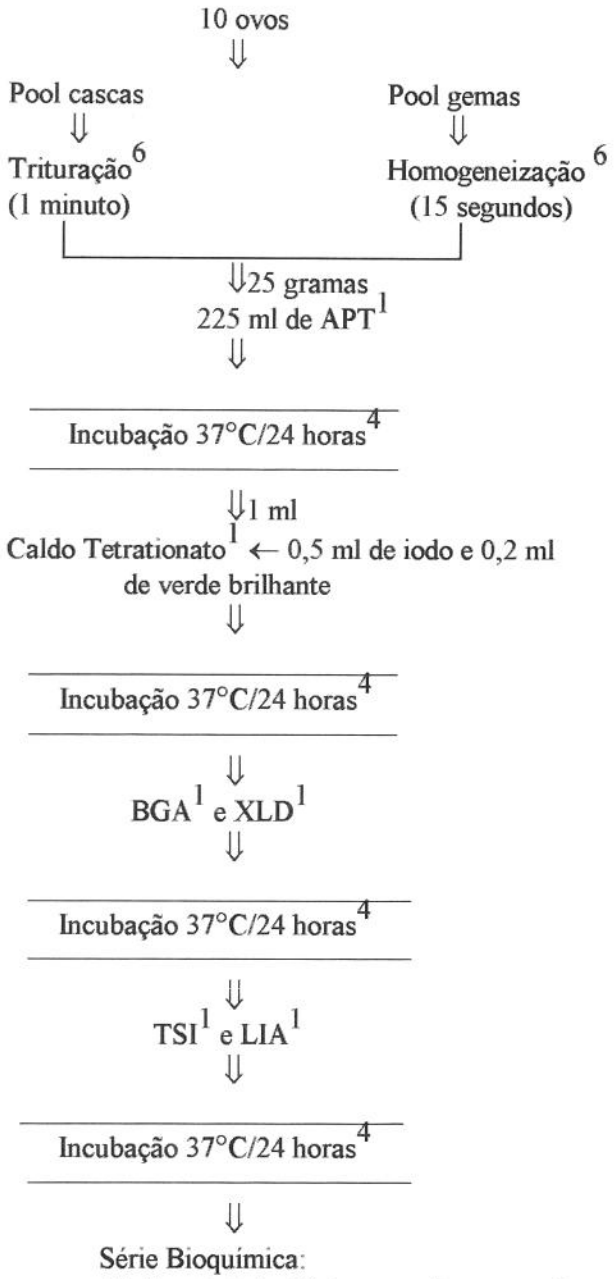

Figura 02 : Diagrama da metodologia utilizada no isolamento de *Salmonella sp.* de ovos comerciais de galinhas coletadas nos pontos de venda.

---

1 Difco
4 Modelo 347 Cd da Fanem
6 Triturador Mecânico Stomacker- Lab Blender 400

3.2.3 Experimento 2. Estudo da contaminação de ovos por SE-Nal^R via maravalha artificialmente contaminada.

3.2.3.1. Preparo da maravalha e contaminação dos ovos.

Em 900 gramas de maravalha mista nova foi adicionado 1.380 ml de água estéril. A maravalha foi colocada em saco plástico . Determinou-se a umidade da maravalha, pesando-se um grama da maravalha úmida, deixando-a em estufa por quatro horas à 105°C. Após este tempo era resfriado em dessecador e depois pesada.

Sobre a maravalha úmida adicionou-se 180 ml da cultura de SE-Nal^R, cultivada em caldo TSB por 24 horas a 37°C e, manualmente homogeneizada. Após a contaminação, foram adicionados 70 ovos dentro do saco de plástico e, estes, foram levemente movimentados nessa maravalha contaminada pelo tempo aproximado de 10 minutos.

Para os experimentos para avaliar a influência da temperatura de armazenagem sobre a sobrevivência de salmonelas, os ovos foram mantidos na temperatura ambiente de 25 a 28°C, em bandejas de papelão e deixados em local fechado. Os ovos refrigerados foram mantidos em geladeira entre 4 e 8°C, também, acondicionados em bandejas de papelão.

Para o experimento de sanificação da casca dos ovos, o procedimento de contaminação foi o mesmo (com maravalha úmida). Somente que, neste caso, o processo de sanitização foi imediato e os ovos não permaneceram armazenados.

3.2.3.2. Contagem da cepa SE-Nal^R em ovos e na maravalha artificialmente contaminada.

A recuperação de SE-Nal^R dos ovos artificialmente contaminados foi feita através da análise individual. De cada ovo, fazia-se o enxágüe da casca em sacos plásticos estéreis

adicionando 5 ml de água peptonada tamponada[1] (APT), homogeneizando por 30 segundos.

Para a enumeração de SE-Nal^R no enxágüe, da suspensão original de aproximadamente 5 ml de APT, eram feitas diluições decimais seriadas em APT e plaqueamento em duplicata em ágar MacConkey[2] e incubada[4] a 37°C por 24 horas. A leitura foi realizada no contador de colônias CP 600. A suspensão original era incubada, também, a 37°C por 24 horas, para verificar a presença ou ausência de células viáveis.

A recuperação e enumeração de SE-Nal^R da maravalha contaminada, foi realizada triturando-se, por 1 minuto, 25 gramas da mesma em copos metálicos estéreis homogeneizadores[3] adicionados de 225 ml de APT[1]. Em ambos os casos eram feitas diluições decimais seriadas em APT e plaqueamento em duplicata ágar MacConkey[2] e incubada[4] a 37°C por 24 horas para as contagens.

3.2.4. Experimento 3. Efeito da temperatura de armazenagem sobre a translocação de SE-Nal^R da casca para a gema, em ovos artificialmente contaminados.

Os ovos foram contaminados artificialmente com a cepa SE-Nal^R conforme descrito anteriormente em 3.2.3.1.

Após a contaminação, os ovos foram divididos em dois grupos com 35 em cada. Um grupo foi mantido em temperatura ambiente (25° a 28°C) e, o outro, sob refrigeração, em refrigerador doméstico[10] (4° a 8°C) Em cada um dos períodos posteriores de 0 (zero), 24,

---

[1] Difco
[2] Merck
[3] Harmless Chemical
[4] Modelo 347 CD da Fanem
[10] Quality 420 - FROSTFREE BRASTEMP

48, 72, 168, 336 e 504 horas era retirada uma amostra de cinco ovos de cada condição de armazenagem para as análises.

A presença quantitativa e qualitativa de SE-Nal^R na casca foi feita pelo método de enxágüe como mencionado em 3.2.3.2. Cada ovo foi analisado individualmente. Para isto, após o enxágüe, o ovo era quebrado. Clara e gema eram separadas assepticamente com o uso de colher e sacos plásticos estéreis. A gema era homogeneizada manualmente no saco por aproximadamente 15 segundos. Após a homogeneização 10 gramas eram pesados e homogeneizados com 90 ml de APT[1] em triturador mecânico[6] por 15 segundos. Alíquotas da suspensão eram utilizadas para a contagem conforme descrito em 3.2.1. A determinação qualitativa da presença de SE-Nal^R foi utilizada para casca e gema pelo método já descrito.

3.2.5. Experimento 4. Sobrevivência de SE-Nal^R em clara, clara batida e glacê de ovos de galinhas submetidas a diferentes temperaturas de armazenagem.

Foram utilizadas "pool" de clara de ovos de galinhas para a realização deste experimento. Para obtenção das claras, os ovos foram imersos em solução de álcool 70% por um minuto. Após a sua remoção e eliminação do álcool residual por drenagem e fogo, os ovos foram assepticamente quebrados e o conteúdo separado através de separador estéril de clara e gema.

Foram utilizados três tipos de preparações com 700 gramas cada: clara *in natura*, clara batida e glacê. As claras foram divididas em três porções de 700 gramas. A primeira não sofreu nenhuma preparação, a segunda foi batida com um misturador manual elétrico[11] até a preparação ficar espumante. Para o glacê foram empregadas as claras e açúcar refinado

---

[1] Difco
[6] Triturador mecânico Stomacker - Lab Blender 400
[11] Batedeira planetária ARNO

na proporção de 1:1 (em peso), utilizando-se o misturador elétrico[11]. Após o preparo, as amostras foram contaminadas com 0,5 ml da cultura SE-Nal^R diluída em APT[1] contendo aproximadamente 10^6 UFC/ml, e armazenadas a temperaturas ambientes e de refrigeração e em tempos diversos.

Cada preparação foi separada em duas porções e armazenadas em recipientes estéreis. Uma porção de cada preparação foi mantida em temperatura ambiente a 25°C, e as outras, sob refrigeração, em refrigerador doméstico[10] entre 4° a 8°C.

As amostras em temperatura ambiente foram analisadas nos períodos de 0 (zero), 5 e 24 horas, enquanto que as amostras sob refrigeração foram analisadas nos períodos de 5, 24, 48, 96 e 168 horas, após o preparo. Suspensões e respectivas diluições decimais foram utilizadas para a contagem e a recuperação da cepa SE-Nal^R conforme em 3.2.1.

Foi feito, também, um controle do crescimento da cepa SE-Nal^R em paralelo, inoculando 0,5 ml da cultura em 70 ml caldo soja triptona[1] (TSB) e 0,5 ml da cultura em 70 ml de salina fosfatada tamponada (Phosphate Buffered Saline - PBS). As condições de armazenagem e tempo para análises foram as mesmas adotadas para as preparações de claras.

3.2.6. Experimento 5. Uso de sanificantes na redução de SE-Nal^R da casca de ovos artificialmente contaminados.

A contaminação artificial dos ovos de galinha por SE-Nal^R foi feita como descrito anteriormente no item 3.2.3.1.

---

[1] [10] Difco
[11] Quality 420 - FROSTFREE BRASTEMP
Batedeira planetária ARNO

Para a higienização da casca dos ovos foram utilizados cloro, na forma de hipoclorito de sódio[12], e compostos quartenário de amônio - CQA (Cleanshell1[3]). Utilizou-se solução contendo 50,2 ppm de cloro livre determinada pela técnica descrita por APHA, 1984, a uma temperatura de aproximadamente 45°C no momento de uso, e uma solução do produto comercial de CQA diluída 1:500 em água, a 400 ppm. Segundo o fabricante, o produto comercial continha 20% (v/v) de princípio ativo. As soluções sanificantes foram preparadas a uma temperatura aproximada de 45°C . Para cada período de higienização foram utilizados três ovos contaminados que eram imersos, separadamente, nas soluções sanitizantes por 30 segundos.

Após a higienização, os ovos eram deixados por trinta minutos a temperatura ambiente para secar antes da realização da contagem total e a enumeração e recuperação da cepa da superfície da casca por enxágüe conforme descrito em 3.2.3.2. Foi feito, também a contagem padrão de bactérias dos enxágües seguindo as recomendações da APHA, 1984.

---

12 Qboa

13 CBM Laboratórios Ltda - Campinas - SP

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Salmonelas isoladas da casca e gema de ovos de galinha obtidos no comércio varejista de Campinas-SP, no período de janeiro a março de 1995.

Na tabela 5, encontram-se os resultados obtidos da ocorrência de salmonelas em ovos comerciais.

Observa-se que 12 amostras de casca e 4 das de gema, das 124 amostras analisadas, eram positivas para salmonela.

GAST & BEARD (1992) citado por SHCHOENI et alii (1995) descreveu que de 132 ovos postos por galinhas infectadas 4 apresentaram SE ao redor de 5,5 ufc/ml.

De acordo com BARROW (1993) a SE tem se mostrado ser a maior causa de envenenamento alimentar.

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), sobre os casos de salmonelose humana, é indicado que SE foi o primeiro sorotipo relatado em nove dos vinte e um países descritos em 1987 (ALTEKRUSE et alii, 1993).

Desde 1988, *Salmonella enteritidis* , tem-se mostrado ser a maior causa de envenenamento alimentar (SPACKMAN, 1989; HINTON et alii, 1990; BARROW, 1993).

Como as partes dos ovos diferem entre si na composição, a suceptibilidade para deteriorar ou o crescimento de patógenos difere em cada parte.

A casca é relativamente porosa e consiste de 94% de carbonato de cálcio. Ainda que os poros sejam vedados pela proteína (queratina), eles permitem que dióxido de carbono e

umidade escapem do ovo e sob estas condições através do poro permitem a penetração bacteriana através da membrana da casca (STALDEMAN, 1977; FRONING et alii, 1992)

Segundo os relatos, indicam que a contaminação é mais comum, como resultado da deposição da SE na casca do que por infecção transovariana (GAST, 1994; HINTON & BALE, 1994; SHIVAPRASAD, 1990; BARROW, 1993; BARROW & LOVEL, 1991)

Estudos realizados no Brasil mostram que de 612 ovos examinados, encontrou-se resultados positivos em quatro amostras, correspondendo a 0,65%, sendo que 1,96% pertenciam ao sorotipo enteritidis e 0,98% ao sorotipo virchow e typhimurium (LANCONI & PRADO, 1995)

Em Teresina, PI, ovos mantidos tanto a temperatura ambiente como de refrigeração, isolou-se salmonela em 100% das amostras (MURATORI et alii, 1995)

Tabela 5. Salmonelas isoladas da casca e gema de ovos de galinha obtidos no comércio varejista de Campinas-SP, no período de Janeiro a Março de 1995

Amostra	Nº analisadas*	Positivos (%)		Sorovar isolado
Casca	124	12	(9,6%)	*Salmonella* Enteritidis (11)
				Salmonella I cepa rugosa (1)
Gema	124	4	(3,2%)	*Salmonella* Enteritidis

*Cada amostra era constituída de "pool" de 10 ovos

4.2. Sobrevivência de *Salmonella* Enteritidis (SE) em ovos experimentalmente contaminados via casca e mantidos sob temperatura ambiente e de refrigeração

As Tabelas 6 e 7 mostram os resultados de ovos contaminados artificialmente com $6,8 \times 10^8$ ufc/ml através da maravalha úmida, e mantidos sob temperatura ambiente e de refrigeração. A idéia era a de verificar se a estocagem em diferentes temperaturas iria influenciar na presença de SE nos ovos.

Foi utilizada para a contaminação dos ovos a maravalha contaminada , para melhor se aproximar das condições naturais de contaminação. A maravalha foi umidificada , pois em experimentos pilotos demonstrou-se que é necessário umidade na maravalha para haver contaminação dos ovos.

Tabela 6. Sobrevivência de *Salmonella* Enteritidis (SE) em ovos experimentalmente contaminados via casca e mantidos sob temperatura ambiente

Tempo após contaminação	Enumeração de SE		
	Unidade (ovo)	Casca (ufc/casca)	Gema (ufc/gema)
0 horas	A1	$2{,}02 \times 10^5$	–
	A2	$1{,}93 \times 10^5$	–
	A3	$3{,}97 \times 10^4$	–
	A4	$2{,}32 \times 10^5$	–
	A5	$4{,}20 \times 10^5$	–
	Média	$\mathit{2{,}17 \times 10^5}$	
24 horas	B1	$9{,}0 \times 10^2$	+
	B2	$1{,}58 \times 10^3$	–
	B3	$5{,}23 \times 10^3$	+
	B4	$1{,}58 \times 10^3$	–
	B5	$1{,}0 \times 10^2$	–
	Média	$\mathit{1{,}9 \times 10^3}$	
48 horas	C1	$5{,}0 \times 10^2$	–
	C2	$3{,}30 \times 10^2$	–
	C3	$2{,}0 \times 10^2$	+
	C4	$1{,}0 \times 10^4$	$2{,}0 \times 10^1$
	C5	$7{,}10 \times 10^3$	$1{,}0 \times 10^1$
	Média	$\mathit{3{,}60 \times 10^3}$	
72 horas	D1	$1{,}50 \times 10^2$	+
	D2	$2{,}0 \times 10^3$	$1{,}0 \times 10^2$
	D3	$1{,}0 \times 10^2$	+
	D4	$2{,}0 \times 10^1$	–
	D5	$1{,}72 \times 10^2$	–
	Média	$\mathit{4{,}90 \times 10^2}$	
168 horas (7 dias)	E1	$1{,}50 \times 10^1$	$4{,}0 \times 10^1$
	E2	$1{,}13 \times 10^2$	$6{,}0 \times 10^1$
	E3	$3{,}66 \times 10^4$	$7{,}6 \times 10^2$
	E4	$7{,}50 \times 10^0$	$2{,}0 \times 10^1$
	E5	$1{,}25 \times 10^1$	–
	Média	$\mathit{7{,}30 \times 10^3}$	
336 horas (14 dias)	F1	$3{,}50 \times 10^2$	–
	F2	$5{,}50 \times 10^2$	–
	F3	$6{,}0 \times 10^2$	–
	F4	$1{,}0 \times 10^3$	–
	F5	$1{,}05 \times 10^3$	–
	Média	$\mathit{3{,}40 \times 10^2}$	

Continuação Tabela 6.

Tempo após contaminação	Enumeração de SE		
	Unidade (ovo)	Casca (ufc/casca)	Gema (ufc/gema)
504 horas (21 dias)	G1	$3,0 \times 10^2$	+
	G2	$4,50 \times 10^2$	–
	G3	$1,0 \times 10^2$	–
	G4	$6,0 \times 10^2$	+
	G5	$2,50 \times 10^2$	$2,7 \times 10^4$
	Média	$3,40 \times 10^2$	

(+/–) Indica presença ou ausência de SE quando não foi possível a enumeração porque os números eram baixos

A Tabela 6 mostra a sobrevivência de SE em ovos experimentalmente contaminados via casca e mantidos em temperatura ambiente.

No tempo zero a contaminação da casca por SE era relativamente elevado (10^5 ufc/casca), o que não ocorre na natureza. Jamais um ovo recebe uma contaminação via casca nestes níveis. A translocação da SE da casca para a gema foi detectada 24 horas após contaminação. Pode ser, até, que este tempo seja menor. Infelizmente, períodos menores que 24 horas não foram experimentados.

Nos períodos de 24, 48, 72, 168 e 504 horas após contaminação, houve uma diminuição de 2 a 3 ciclos logaritmo na contagem de SE nas cascas. Estes dados estão em desacordo com os de SCHOENI et alii (1995). Eles relatam que houve um aumento de 3 a 5 ciclos logarítmicos nos números de SE, *Salmonella* Typhimurium *e Salmonella* Heidelberg, nas gemas e claras quando os ovos eram mantidos em temperatura de 25° C.

Segundo o experimento de HAMMACK et alii (1993),pode-se controlar o crescimento de SE através da refrigeração. A temperatura de armazenamento é fundamental para reduzir a migração de SE da casca e clara para a gema. Ele obteve altos níveis de SE em ovos incubados por dois a 16 dias a 26°C.

Em experimento realizado por HUMPHREY (1994a), simulando o que ocorre em cozinhas domésticas e comerciais, quando os ovos estão estocados entre 18° e 30°C, foi obtido um rápido crescimento , na maioria dos ovos contaminados. Por esses resultados conclue-se que os ovos devem ser estocados sob refrigeração, ou seja, abaixo de 8°C.

Tabela 7. Sobrevivência de *Salmonella* Enteritidis (SE) em ovos experimentalmente contaminados via casca e mantidos sob temperatura de refrigeração

Tempo após Contaminação	Enumeração de SE		
	Unidade (ovo)	Casca (ufc/casca)	Gema (ufc/gema)
0 horas	A1	$2,02 \times 10^5$	–
	A2	$1,93 \times 10^5$	–
	A3	$3,97 \times 10^4$	–
	A4	$2,32 \times 10^5$	–
	A5	$4,20 \times 10^5$	–
	Média	*$2,17 \times 10^5$*	
24 horas	B1	$1,0 \times 10^3$	+
	B2	$1,0 \times 10^3$	+
	B3	$<10^5$	+
	B4	$5,0 \times 10^2$	+
	B5	$5,50 \times 10^3$	+
	Média	$1,60 \times 10^3$	
48 horas	C1	$4,13 \times 10^3$	+
	C2	$5,10 \times 10^3$	+
	C3	$9,40 \times 10^3$	+
	C4	$3,45 \times 10^3$	+
	C5	$7,78 \times 10^3$	+
	Média	$5,97 \times 10^3$	
72 horas	D1	$2,38 \times 10^3$	+
	D2	$1,60 \times 10^3$	+
	D3	$1,06 \times 10^4$	+
	D4	$2,13 \times 10^3$	+
	D5	$3,98 \times 10^3$	+
	Média	$4,14 \times 10^3$	
168 horas (7 dias)	E1	$5,0 \times 10^2$	+
	E2	$1,40 \times 10^2$	+
	E3	$3,13 \times 10^2$	+
	E4	$2,70 \times 10^2$	+

Continuação Tabela 7.

Tempo após Contaminação	Enumeração de SE		
	Unidade (ovo)	Casca (ufc/casca)	Gema (ufc/gema)
	E5	$2,43 \times 10^2$	–
	Média	$2,90 \times 10^2$	
336 horas (14 dias)	F1	$1,50 \times 10^4$	+
	F2	$1,39 \times 10^4$	–
	F3	$1,20 \times 10^4$	–
	F4	$1,74 \times 10^4$	+
	F5	$1,92 \times 10^4$	–
	Média	$1,55 \times 10^4$	
504 horas (21 dias)	G1	$3,45 \times 10^3$	–
	G2	$6,90 \times 10^3$	–
	G3	$3,30 \times 10^3$	–
	G4	$1,52 \times 10^4$	–
	G5	$2,35 \times 10^3$	–
	Média	$6,24 \times 10^3$	

(+/–) Indica presença ou ausência de SE quando não foi possível a enumeração porque os números eram baixos

A Tabela 7 mostra que houve uma redução de 2 a 3 ciclos logaritmos para as cascas no período de 21 dias de armazenagem em temperatura de refrigeração. A SE esteve presente nas gemas em quase todos os períodos mas, sempre, em número muito baixo que não permitiu a sua enumeração.

Segundo IANIERI et alii (1994), HAMMACK et alii (1993) mostraram que não há nenhum ou pouco crescimento de SE em ovos sob temperatura de refrigeração.

De acordo com GAST & BEARD (1992), sugerem que ovos postos por galinhas infectadas geralmente contem baixo número de salmonelas, a presença desta significa um risco em potencial que aumenta durante a estocagem prolongada em temperaturas não refrigeradas.

Existe na legislação brasileira, permissão para que os ovos sejam conservados pelo frio industrial, ou por outros processos, desde que sejam aprovados pelo D.I.P.O.A. (Artigo 724, 1997).

4.3. Sobrevivência de SE em clara de ovos e preparações experimentalmente contaminadas e mantidas sob temperatura ambiente

As Tabelas 8 e 9 mostram a sobrevivência de SE em claras, clara batida e glacê, armazenadas à temperatura ambiente e de refrigeração.

Tabela 8. Sobrevivência de *Salmonella* Enteritidis (SE) em clara de ovos e preparações experimentalmente contaminadas e mantidas sob temperatura ambiente.

Tempo	Enumeração de SE por grama da amostra				Crescimento de SE em meios controle	
	Repetições*	Clara	Clara batida	Glacê	TSB	PBS
0 horas	A_1	$5,05 \times 10^4$	$5,18 \times 10^4$	$3,04 \times 10^4$		
	A_2	$7,90 \times 10^4$	$4,73 \times 10^4$	$2,61 \times 10^4$		
	Média	$6,48 \times 10^4$	$4,95 \times 10^4$	$2,83 \times 10^4$	$4,03 \times 10^4$	$2,25 \times 10^4$
5 horas	B_1	$3,62 \times 10^5$	$1,84 \times 10^5$	$9,70 \times 10^3$		
	B_2	$4,16 \times 10^5$	$2,80 \times 10^5$	$1,65 \times 10^4$		
	Média	$3,89 \times 10^5$	$2,32 \times 10^5$	$1,30 \times 10^4$	$1,23 \times 10^6$	$4,50 \times 10^5$
24 horas	C_1	$3,11 \times 10^5$	$6,40 \times 10^5$	$3,35 \times 10^3$		
	C_2	$6,25 \times 10^5$	$5,14 \times 10^5$	$6,45 \times 10^3$		
	Média	$4,68 \times 10^5$	$5,77 \times 10^5$	$4,90 \times 10^3$	$8,00 \times 10^6$	$2,95 \times 10^4$

TSB = Caldo triptona de soja, PBS = Phosphate buffered saline
(*) Por unidade de ovo.

As amostras só foram deixadas por 24 horas a temperatura ambiente devido ao mal cheiro que poderia vir a ocorrer.

A viabilidade de SE em clara e clara batida artificialmente contaminada foi aumentado em um ciclo logarítmico da população inicial, resulatndo em 10^5 nas 24 horas de armazenamento em temperatura ambiente. No glacê houve uma redução de um ciclo logarítmico da população inicial, resulatndo em 10^3 nas 24 horas de armazenamento em temperatura ambiente.

O crescimento microbiano na albumina do ovo, é limitado por vários fatores como: ausência ou indisponibilidade de água livre ou nutrientes, presença de agentes antimicrobianos naturais como a lisozima, presença de agentes sequestrantes como a avidina e pH alcalino (AYRES & TAYLOR, 1959 citado por AFONSO, 1994).

A capacidade da albumina suportar crescimento microbiano parece estar estreitamente relacionada à integridade das estruturas físicas das proteínas componentes da clara, já que alterações na estrutura física expressas como alteração da viscosidade (tratamento com papaína e ultrasom) e precipitação da ovomucina (tratamento aquoso) permitiu a redução da resistência da albumina ao crescimento microbiano (YADAV & VADERA, 1977 citado por AFONSO, 1994).

Na obtenção do glacê e clara batida foi utilizado um misturador elétrico. Esse procedimento alterou a desnatuarção mecânica da albumina, alterou sua integridade estrutural. Como não empregamos nenhum outro ingrediente e o produto não sofreu nenhum tratamento térmico, a temperatura de armazenamento ambiente foi significante para o aumento do crescimento bacteriano.

Tabela 9. Sobrevivência de *Salmonella* Enteritidis (SE) em clara de ovos e preparações experimentalmente contaminadas e mantidas sob temperatura refrigeração.

Tempo	Enumeração de SE por grama da amostra				Crescimento de SE em meios controle	
	Repetições*	Clara	Clara batida	Glacê	TSB	PBS
0 horas	A1	$5,05 \times 10^4$	$5,18 \times 10^4$	$3,04 \times 10^4$		
	A2	$7,90 \times 10^4$	$4,73 \times 10^4$	$2,61 \times 10^4$		
	Média	*$6,48 \times 10^4$*	*$4,95 \times 10^4$*	*$2,83 \times 10^4$*	*$4,03 \times 10^4$*	*$2,25 \times 10^4$*
5 horas	B1	$6,10 \times 10^4$	$1,84 \times 10^5$	$2,71 \times 10^4$		
	B2	$5,50 \times 10^4$	$2,80 \times 10^5$	$3,45 \times 10^4$		
	Média	*$5,80 \times 10^4$*	*$2,32 \times 10^5$*	*$3,08 \times 10^4$*	*$1,30 \times 10^5$*	*$2,05 \times 10^4$*
24 horas	C1	$2,55 \times 10^4$	$5,28 \times 10^4$	$1,73 \times 10^4$		
	C2	$2,45 \times 10^4$	$7,80 \times 10^4$	$1,26 \times 10^4$		
	Média	*$2,50 \times 10^4$*	*$6,54 \times 10^4$*	*$1,49 \times 10^4$*	*$1,60 \times 10^4$*	*$3,50 \times 10^4$*
48 horas	D1	$4,38 \times 10^4$	$1,95 \times 10^4$	$7,30 \times 10^3$		
	D2	$7,80 \times 10^4$	$2,05 \times 10^4$	$8,70 \times 10^3$		
	Média	*$6,09 \times 10^4$*	*$2,00 \times 10^4$*	*$8,00 \times 10^3$*	*$1,87 \times 10^5$*	*$1,67 \times 10^4$*
96 horas (4 dias)	E1	$2,51 \times 10^5$	$3,05 \times 10^4$	$7,40 \times 10^3$		
	E2	$1,90 \times 10^4$	$3,15 \times 10^4$	$7,30 \times 10^3$		
	Média	*$1,35 \times 10^5$*	*$3,10 \times 10^4$*	*$7,35 \times 10^3$*	*$3,12 \times 10^5$*	*$2,40 \times 10^4$*
168 horas (7 dias)	F1	$1,29 \times 10^5$	$3,93 \times 10^4$	$8,00 \times 10^2$		
	F2	$8,30 \times 10^4$	$7,10 \times 10^4$	$1,38 \times 10^3$		
	Média	*$1,05 \times 10^5$*	*$5,52 \times 10^4$*	*$1,09 \times 10^3$*	*$1,60 \times 10^0$*	*$1,45 \times 10^4$*

TSB = Caldo triptona de soja, PBS = Phosphate buffered saline

(*) Por unidade de ovo.

A tabela 9, mostra que com o passar do tempo vai havendo uma redução de 2 a 4 ciclos logarítmicos na população de SE presente no glacê mantido sob refrigeração, porém para os demais produtos há uma redução de 1 a 2 ciclos logarítmicos somente.

De acordo com BRADSHALL et alii, citado por AFONSO, 1994, a clara de ovo crua é considerada detrimental para células bacterianas, reduz a viabilidade celular em 50% após incubação à 37°C durante 4 horas e 90% após 48 horas à mesma temperatura.

O crescimento microbiano na albumina do ovo é limitado por vários fatores como: alto pH (alcalino), lisozima, avidina como agente sequestrante, ovomucoidina, conalbumina (VADAV & VADEHRA, 1977; GARIBALDI, 1959; BOARD, 1966).

Em experimento realizado por STEPHENSON et alii (1991), observou-se que a contagem de SE inoculada no albúmen diminue em três ciclos logarítmicos, enquanto que nas gemas não houve mudança significativa. Contudo, os organismos inoculados dentro da gema apresentaram um aumento. Com isso, confirma-se que o albúmen possue certos inibidores para o crescimento microbiano.

Nos dois casos , tanto a temperatura ambiente e de refrigeração, todos os produtos (clara, clara batida e glacê), a destruição microbiana devem-se aos componentes antimicrobianos naturais da albumina. A temperatura de refrigeração não teve efeito destrutivo para o crescimento microbiano, nesta temperatura o número de microrganismos permaneceu constante.

4.4. Sanitização por imersão por 30 segundos em solução a 45°C contendo compostos de cloro e quaternários de amônia de ovos artificialmente contaminados via casca com SE.

Foram realizados testes de sanificação em ovos *in natura* e ovos contaminados artificialmente por meios químicos, para avaliar qual o sanificante de melhor ação sob os mesmos. Foram utilizados compostos clorados e quaternários de amônio.

Tabela 10. Sanitização por imersão por 30 segundos em solução a 45°C contendo compostos de cloro e quaternários de amônia de ovos artificialmente contaminados via casca com *Salmonella* Enteritidis .

	Enumeração bacteriana total por enxágüe da casca de ovos		
Tratamentos	Repetições*	Mesófilos totais	*S.* Enteritidis
Ovos controle	A_1	$5,00 \times 10^4$	–
Não	A_2	$8,45 \times 10^4$	–
Contaminados	A_3	$1,67 \times 10^5$	–
	Média	$1,00 \times 10^5$	
Ovos controle	B_1	$2,60 \times 10^8$	$2,90 \times 10^6$
Contaminados	B_2	$2,40 \times 10^8$	$9,25 \times 10^6$
com SE	B_3	$2,70 \times 10^8$	$9,85 \times 10^6$
	Média	$2,57 \times 10^8$	$7,33 \times 10^6$
Compostos	C_1	$1,44 \times 10^5$	$1,60 \times 10^4$
de Cloro**	C_2	$1,60 \times 10^5$	$2,87 \times 10^4$
(50,2 ppm)	C_3	$1,60 \times 10^5$	$1,18 \times 10^4$
	Média	$1,55 \times 10^5$	$1,88 \times 10^4$
Quaternários	D_1	$5,75 \times 10^2$	< 5,00
de amônia***	D_2	$6,25 \times 10^2$	<5,00
(400 ppm)	D_3	$2,60 \times 10^4$	$3,00 \times 10^1$
	Média	$9,06 \times 10^3$	

(*) Por unidade de ovo; (**) Hipoclorito de sódio; (***) Cleanshell do Laboratório CBM;

Nota-se que, o produto contendo quartenário de amônio foi mais eficiente, tanto para contagem total como para a redução de SE da casca dos ovos (Tabela 10).

O produto a base de cloro reduziu 3 ciclos logarítmicos na contagem total e 2 ciclos logarítmicos para SE e o produto amônio quartenário reduziu de 4 a 6 ciclos logarítmicos para contagem total e de 7 a 8 ciclos logarítmicos para SE.

Para CATALANO & KNABEL (1994) citado por HOU et alii (1996), existem vários métodos de preservação e sanitização das cascas dos ovos, como lavagem, resfriamento rápido, irradiação e tratamento ultrasônico, mas com uma ressalva, estes tratamentos não destroem a salmonela que esta abrigada dentro do ovo.

Há vários tipos de meio de sanitização que estão sendo utilizados e são eficientes. Em alguns países como Canadá, Holanda, Suécia, Inglaterra e Estados Unidos, existem programas estratégicos para controlar SE na produção de ovos. (ALTEKRUSE et alii, 1993).

Com esses resultados sugerimos , como o autor SCHRIKE (1973), que os ovos devem ser lavados logo após a postura, pois se houver demora na desinfecção os germes podem penetrar na casca do ovo e a desinfecção não terá nenhuma eficácia, mas de acordo com MOUNTEY (1976) os poros da casca e a expansão e contração dos conteúdos dos ovos durante a lavagem podem causar problemas. Devido a isto, o Departamento de Agricultura dos E.U.A. criou algumas recomendações para a lavagem dos ovos: lavar logo após coletado, não tentar limpar os ovos excessivamente sujos; não imergir os ovos mais do que cinco minutos, não reutilizar a água exceto quando for um lavador contínuo, a temperatura da água deve ser de 32°C, manter a água mais morna que os ovos; o "spray" de enxágüe deve ser de água morna potável e conter um sanitizante apropriado, os ovos devem ser secos antes de encaixotá-los ou quebrá-los.

De acordo com a legislação brasileira, os ovos expostos ao consumo público devem ser inspecionados quanto as suas características, inclusive limpeza, integridade da casca, mas não especifica se há algum procedimento (processo e produto) para a limpeza dos ovos (DIPOA - Artigo 713, 1997). Os ovos destinados à fabricação de pasta ou à desidratação devem ser previamente lavados em água corrente (DIPOA - Artigo 744, 1997).

Segundo a nova Portaria do Centro de Vigilância Sanitária (CVS-6/99 de 10/03/99), no item 17-Higiene dos Alimentos, para o preparo deve ser realizado a higienização completa que compreende: lavagem com água potável, desinfecção: imersão em solução clorada por 15 a 30 minutos, enxágüe com água potável: não necessitam de desinfecção. E ainda os ovos inteiros devem ser consumidos após cocção atingindo 74°C interno. Na mesma Portaria, no item 23 – Utilização de ovos, diz –se que existem medidas de controle que devem ser realizadas na indústria, porém a qualidade sanitária das preparações a base de ovos em empresas fornecedoras de alimentos pode ser garantida com os procedimentos: • comercialização e compra, proibindo a venda de ovos com casca rachada, • verificar se os ovos estão estocados em local arejado, limpo e fresco, conferir o prazo de validade (na Portaria CVS-13 de 30/7/98 em relação a temperatura de armazenagem cita que os ovos deveriam ficar sob refrigeração até 10°C por até 14 dias ou armazenar os ovos em temperatura ambiente no máximo 26°C por até 7 dias), • utilização: armazenar os ovos de acordo com as instruções do fornecedor, não utilizar ovos com casca rachada, evitar misturar a casca com o conteúdo do ovo, não reutilizar as embalagens dos ovos, nem utilizá-las para outras finalidades, • preparação: não oferecer para consumo ovos crus, não oferecer para consumo alimentos preparados onde os ovos permaneçam crus, preparações sem cocção utilizar ovos pasteurizados, ovos desidratados, ovos cozidos, preparações quentes ovos cozidos por 7 minutos em fervura no mínimo, ovos fritos com gema dura e omeletes, empanados atingir no centro 74°C.

5. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos, conclui-se que:

a) Ovos de galinha colhidas no comércio varejista de Campinas-SP no período de janeiro a março de 1995 constituíram um risco de infecção humana por SE.

b) Quando ovos comerciais de galinha estão contaminados por SE, ela é mais encontrada na casca do que na gema.

c) Ovos de galinha com presença de *Salmonella* na sua superficie permanece assim contaminados por muito tempo, podendo esta contaminação migrar para a gema mesmo quando os ovos são armazendos sob refrigeração.

d) Os fatores antimicrobianos presentes na clara de ovos, clara batida e glacê não tiveram ação deleteria sob a presença de SE.

e) A casca de ovos pode ser convenientemente sanitizada e a presença de SE eliminada com compostos a base de cloro e quartenário de amônio. No processo utilizado, o composto de quaternário de amônia foi mais efetivo que o composto clorado na sanitização da casca dos ovos;

f) Os surtos de infecção alimentar humana por salmonelas podem ser devidos a contaminação dos ovos tanto na casca como na gema. Processos de produção de ovos livres de salmonelas, higienização após postura e refrigeração são pontos críticos de controle para a redução dos surtos de salmonelose humana de origem alimentar.

6 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1 - AFONSO, M. A. **Sobrevivência de *Salmonella* Enteritidis em ovos artificialmente contaminados e submetidos a diferentes tipos de cocção e em alimentos preparados a base de ovos e consumidos sem tratamento térmico.** Campinas, 1994. 91p. (Mestre em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

2 - ALTEKRUSE, S. F.; TOLLEFSON, L. K.; BOGEL, L. K.. Control strategies for *Salmonella enteritidis* in five countries. **Food Control**, v.4. n.1. p.10-16, 1993.

3 - ANON. Bactéria em comida faz 700 intoxicados em SC. **Folha de São Paulo**, São Paulo, 31 de agost. 1995. Caderno 3, p. 2.

4 - 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 uso de ovo cru, em Sorocaba - SP. CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 18,1995, São Paulo. p.54.

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

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

7 - BERCHIERI, A. J. *Salmonella Enteritidis* - Um problema futuro? In: Arquivo Técnico. Jaboticabal, 1990, p. 1-5.

8 - BISGAARD, M. A voluntary Salmonella control programe for the broiler industry, implemented by Danish Poultry council. **International Journal of Food Microbiology**, v. 15, p. 219-224, 1992.

9 - BOARD, R. G. Review Article: The course of microbial infection of the hen's egg. **Journal Applied Bacteriology**, v. 29, n. 2, p. 319-341, 1966.

10 - BRADSHAW, J. G. ; SHAH, D. B.; FORNEY, E.; MADDEN, J. 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, Dec., 1990.

11 - BRASIL. Decreto nº 30.691, 29 marc. 1952, alterado Decretos nº 1.255, 25 jun. 1962, nº 1.236, 02 set. 1994, nº 1.812, 8 fev. 1996 e nº 2.244, 4 jun 1997. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. Brasília, 1997. p. 160-167.

12 - BRUCE, J.; JOHNSON, A. L. The bacterial flora of unhatched eggs. **Br. Poultry Science**, v. 19, p. 681-689, 1978.

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

14 - CAFFER, M. I. ; EIGUER, T. ; BINSZTEIN, N. Salmonellosis evolution in the last 20 years in Argentina. **Salmonella and Salmonellosis**, p. 149, 1992.

15 – CENTRO DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Portaria –13/98 de 30/7/98. Manual de Procedimentos e Condutas para Controle Higiênico e Sanitário em estabelecimentos de Alimentos. São Paulo, p. 26-30, jul. 1998.

16- CENTRO DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Portaria CVS-6/99 de 10 /3/99. Regulamento Técnico sobre os parâmetros e critérios para o controle higiênico sanitário em estabelecimentos de alimentos. São Paulo, p.26-27, mar. 1999.

17 - EBEL, E. D.; MASON, J.; THOMAS, L. A.; FERRIS, K. E.; BECKMAN, M. G.; CUMMINSA, D. R.; TUCKER, L. S.; SUTHERLIN, W. D.; GLASSHOFF, R. L.; SMITHHISLGR, N. M. Occurrence of *Salmonella enteritidis* in unpasteurized liquid egg in the United States. **Avian Diseases**, v. 37, p. 135-142, 1993.

18 - EWERT, D. Outbreaks of *Salmonella enteritidis* Gastroenteritis - California, 1993. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 42, n. 41, p. 793-797, 1993.

19 - FAIRBROTHER, I. G. Poultry and public health issues WORLD VETERINARY POULTRY ASSOCIATION CONGRESS 10, 1993, Sidney, p. 91-99.

20 - FANTASIA, M.; FILETICI, E. *Salmonella enteritidis* in Italy. **International Journal of Food Microbiology**, v. 21, p. 7-13, 1994.

21 - FERNANDES, S. A.; TAVECHIO, A. T.; NEVES, B. C.; IRINO, K.; ARAUJO, E.; PERESI, J. T. M.; PACHECO, M. R.; CASTANHEIRA, I. A. Z. *Salmonella* Enteritidis: atual sorotipo no estado de S.P. e susceptibilidade aos agentes microbianos. CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA 18, 1995, S.P. p. 103.

22 - FERREIRA, A. J. P.; ITO, N. M. K.; BENEZ, S. M.; NORONHA, A. M. B. Infecção Natural e experimental por Salmonella enteritidis em pintos. In: Conferência Apinco de Ciência e Tecnologia Avícolas, 1990, Anais. p. 171.

23 - FERREIRA, M. A. S. S.; LUND, B. M. The influence of ph and temperature on initiation of growth os *Salmonella* spp. **Leters in Applied Microbiology**, v. 5. p. 67-70, 1987.

24 - FOSTER, E. M. The problem of Salmonellae in Foods. **Food Technology**, v. 23, p. 74-77, sept., 1969.

25 - FOWLER, N. Competitive exclusion - the way foward? **International Hatchery Pratice**, p. 5 e 9, "sd".

26 - FROMM, D.; MONROE, R. J. Interior physical quality and bacterial contamination of market eggs as influence by egg shell permeability. **Food Technology**, p. 401-403, Aug., 1960.

27 - FRONING, G.; IZAT, A.; RILEY, G. MAGWIRE, H. Eggs and egg products. In: VANDERZANT, C.; SPLITTOSTOESSER, D. F. **Compendium of Methods for the Microbiologycal Examination of Food.** 3° APHA, 1992, 46, p. 857-873.

28 - GARIBALDI, J. A. Factors in egg white which control growth of bacteria. Western Regional Research Laboratory. Albany, California, p. 337-344, 1959.

29 - GAST,R. K. Understanding Salmonella enteritidis in laying ckickens: the contributions of experimental infection. **International Journal of Food Microbiology**, v. 21, p. 107-116, 1994.

30 - GAST, R. K. Imersion in boiling water to disinfect egg shells before culturing egg contents for *Salmonella enteritidis*. **Journal of Food Protection**, v. 56, n. 6, p. 533-535, June, 1993.

31 - GAST,R. K.; BEARD, C. W. 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, mar., 1992.

32 - GIESSEN, A. W.; AMENT, A. J. H. A. ; NOTERMANS, S. H. W. Intervention strategies for Salmonella enteritidis in poultry flocks: a basic approach. **International Journal of Food Microbiology**, v. 21, p. 145-154, 1994.

33 - GLÓSNICKA, R.; KUNIKWSKA, D. The epidemiological situation of *Salmonella enteritidis* in Poland. **International Journal of Food Microbiology**, v. 21, p. 21-30, 1994.

34 - HAMMACK, T. S.; SHERROD, P. S.; BRUCE, V. R.; JUNE, 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.

35 - HINTON, M.; BALE, J. A. Is *Salmonella enteritidis* PT4 a super bug? **Food Research International** , v. 27, p. 233-235, 1994.

36 - HINTON, M.; THREFALL, E. J.; ROWE, B. The invasiness of different strains of *Salmonella enteritidis* phage type 4 for young chickens. **FEMS Microbiology Letters**, v. 70, p. 193196, mar., 1990.

37 - HUMPHREY, T. J. Public health implications of the infection of egg-laying hens with *Salmonella enteritidis* phage type 4. **World's Poultry Science Journal**, v. 46, p. 5-13, mar., 1990.

38 - HUMPHREY, T. J. Heat resistance in *Salmonella enteritidis* phage type 4: the influence of storage temperatures before heating. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 69, p. 493-497, mar., 1990a.

39 - 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.

40 - HOU, H.; SINGH, R. K.; MURIANA, P. M.; STADELMAN, W. J. Pasteurization of intact shell eggs. **Food Microbiology**, v. 13. p.93-101, 1996.

41 - HUNTON, P. *Salmonella Enteritidis* in perspective. **Shaver Focus**, v. 18, n. 1, p. 3-6, jan., 1989.

42 - IANIERI, A.; FRANCIOSO, E.; TODARO, M. P.; TIECCO,G. Influenza della temperatura di conservazone su *Salmonella Enteritidis* in nova sperimentalmente inoculate. **Industrie Alimentari**, p. 423-425, apr., 1994.

43 - IRINO, K.; FERNANDES, S.A.; TAVECHIO, A.T.; NEVES, B.C.; DIVAS, A. M. G., et alii. *Salmonella* Enteriritidis; caracterização pela fagotipagem de cepas isoladas no Estado de S. P. CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 18, 1995, S. P. p.103.

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

45 - KRADEL, D. C. *Salmonella enteritidis* in layers - where are we- where are we going. **WPDC**, p. 203-206, 1989.

46 - KUO, F. L.; KWON, Y. M.; CAREY, J. B.;HARGIS, B. M.; KRIEG, D. P.; RICKE, S. C. Reduction of Salmonella contamination on chicken egg shells by a peroxidase-catalyzed sanitizer. **Journal of Food Science**, v. 62, n. 4, p. 873 e 884, 1997.

47 - LANDGRAF, M.; GONÇALVES, J. A.; FALCÃO, D. P. Surto de toxinfeção alimentar por *Salmonella bredeney*. **Revista Saúde Pública**, v. 19, p. 92-93, 1985.

48 - LANGONI, H.; PRADO, R. A. T.; PINTO, J. P. A. N.; BALDINI, S.; PIMENTEL, V.L. Isolamento de salmonelas em ovos de galinha oferecidos no comércio de Botucatu - S.P. **Higiene Alimentari**, v. 9, n 37, p. 45-47, 1995.

49 - LEVER, M. S.; WILLIAMS, A. Cross-infection of chicks by airborne transmission of *Salmonella enteritidis* PT4. **Letter in Applied Microbiology**, v. 23, p. 347-349, apr., 1996.

50 - LIRIO, V. S.; ASTONE, E.; PIMENTEL, E. P. STEFONI, S; CAMARGO, D. Comportamento de doze sorotipos de Salmonella em ágar Rambach. CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 18, 1995, S. P. p. 33.

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

52 - MAULDIN, J. M. Salmonella contamination in hatcheries. **International Hatchery Practice**, p. 27 e 29, "sd".

53 - MOTA, C.C. S.; VIEIRA, H. G. 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. **Higiene Alimentar**, v. 2, n. 3, p. 123-131, 1983.

54 - MOUNTNEY, G. J. Egg Quality Maintenance. In: MOUNTNEY, G. J. **Poultry Products Technology**. 2º Ed. Westport, Connecticut, AVI, 1976. 20, p. 313-319.

55 - MURATORI, M. C. S.; MOURA, R. A.; PEREIRA, M. M. G. Comparação da eficiência de diferentes meios de cultivo utilizados em pesquisa de *Salmonella sp* em ovos "in natura"estocados a duas temperaturas. **Centro de Ciências Agrárias** , Teresina PI, 1995.

56 - NASCIMENTO, V. P.; CRANSTONN,S.; SOLOMON, S. E. Relation ship between shell struture and movement of *Salmonella Enteritidis* across the egg shell wall. **Britsh Poultry Science**, v. 33, p. 37-48, 1992.

57 - NAVARRETE, G. Grande ABC vive surto de bactéria do ovo. **Diário do Grande ABC**, São Paulo, 26 jan. 1995.

58 - NOORDHVIZEN, J. P.; FRANKENA, K. *Salmonella enteritidis* : clinical epidemiological approaches for prevention and control of *Salmonella enteritidis* in poultry production. **International Journal of Food Microbiology**, v. 21, p. 131-143, 1994.

59 - NOTERMANS, S.; HOOGENBOOM-VERDEGAAL, A. Existing and imergin foodborne diseases. **International Journal of Food Microbiology**, v. 15, p. 197-205, 1992.

60 - OPITZ, H. M. Progress being made in Salmonella enteritids reduction on the farm. **Poultry Digest**, p. 16-22, mar., 1992.

61 - OPITZ, H. M.; SINGER, J. T. Epidemiologia de salmonelas en ponedoras. **Industria Avicola**, p. 16-18,ene., 1992.

62 - PERALES, I.; AUDICANA, A. *Salmonella enteritidis* and eggs. **The Lancet**, p. 1133, nov., 1988.

63 - PERESI, J. T. M.; CASTANHEIRA, I. A. Z.; IRINO, K.; GELLI, D. S.; FERNANDES, S. A.; et alii. Surtos de enfermidade transmitida por alimentos por *Salmonella* Enteritidis na região de São Josë do Rio Preto. CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 18, São Paulo, 1995. p. 103.

64 - PICCOLO, R. C.; PIMENTEL, E. P.;FÁVERO L. M.; RIZZO,M. A. Surto de salmonelose ocorrido emcantina escolar, no município de São Paulo, em 1991. **Higiene Alimentar**, v. 6, n 23, p. 28-30, 1992.

65 - PISANI, B.; ROCHA, M. M. M.; SIMÕES, M.; PRANDI, M. A. G.; BARWOART, P. A. et alii. *Salmonella* Enteritidis elucidação de surtos ocorridos na região de Campinas de setembro 1994 a junho de 1995. CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 18, São Paulo, 1995. p. 80.

66 - POPPE, C. *Salmonella enteritidis* in Canada. **International Journal of Food Microbiology**, v. 21, p. 1-5, 1994.

67 - PURCHASE, H. G. Where are we in controlling salmonellosis? p. 351-359, "s.n.t.".

68 - REED, G. H. Foodborne Illness (Part 2) Salmonellosis. **Dairy, Food and Environmental Sanitation**, v. 13, n. 12, p. 706, dec., 1993.

69 - RUSUL, G.; KHAIR, J.; CHEAH, C. T.; YASSIN,R. Md. Prevalence of *Salmonella* in broilers at retail outlets, processing plants and farms in Malaysia. **International Journal of Food Microbiology**, v. 33, p. 183-194, jun., 1996.

70 - SPACKMAN, D. Salmonella in poultry in the U.K. observations and actions. **W.P.D.C**., p. 207-210, 1989.

71 - SCHOTHORST, M. Do we have to live with Salmonella? **Food technology in Australia**, v. 38, n. 2, p. 64-67, feb., 1986.

72 - SCHRIKE. Medios de lucha contra las salmonelosis avicola. **Plantel**, p. 14-20, oct., 1973.

73 - SHAH, D. B.; BRADSHAW, J. G.; PEELER, J. T. Thermal resistance of egg-associated epidemic strains of *Salmonella enteritids*. **Journal of Food Science**, v. 56, n. 2, p. 391-393, 1991.

74 - SILVA, E. P. salmonellas en aves y salud pública. In: SEMINARIO TECNICO AVICOLAS DE LA ASSOCIACION DE MEDICOS VETERINARIOS, 1993, Bolivia, p. 1-17.

75 - SIMONSEN, B.; BRYAN, F. L.; CHRISTIAN, J. H. B.; ROBERTS, T. A.; TOMPKIN, R. B.; SILLIKER, J. H. Prevention and control of foodborne salmonelosis through application of Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP). **International Journal of Food Microbiology**, v. 4, n. 3, p. 227-247, jun., 1983.

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

77 - SONOEYENBOS,G. H. The present and future control of Salmonella in poultry. Dept. of Veterinary & Animal Science, University of Massachusetts, p. 1-12, "s.d".

78 - STADELMAN, W. J. The preservation of Quality in shell eggs In: STADELMAN, W. J. **Egg Science and Technology** 3° ed Westport, Connecticut. AVI, 1986, 4, p. 63-96.

79 - STEPHENSON, P.; SATCHELL, F. B.; ALLEN, G.; ANDREWS, W. H. Recovery of *Salmonella* from shell eggs. **J. Assoc. Off. Anal. Chem**., v. 74, n 5, p. 821-826, mar., 1991.

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

81 - 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

82 - TODD, E. C. D. Risk assessment of use of cracked eggs in Canada. **International Journal of Food Microbiology**, v. 30, p. 125-143, 1996.

83 - TOLEDO, A.; SOARES, P. C.; ALVES, J. D. R.; SAUKAS, T. N. Qualidade de ovos em natureza comercializados no município do Recife -PE. Cad. Ômega Univer. Fed. Rural PE Sér. Vet., Recife, n 5, p. 41-47, 1990.

84 - WORLEY, B. S.; WHEATLEY, W. B.; LUTEN, S. D.; WILLIAMS, D. E. et alii. Inactivation of *Salmonellaa enteritidis* on shell eggs by novel N-halamine biocidal compounds. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 11, p. 37-42, 1992.