

Avicultura

INDUSTRIAL.COM.BR

Nº 02|2017 | ANO 108 | Edição 1263 | R\$ 26,00



ISSN 1516-3105

Mineração de dados aplicada à incubação de ovos

Uma das técnicas mais importantes para exploração de bancos de dados vem sendo utilizada com sucesso na produção animal

EMBRAPA

Mecanismos de *Salmonella* sp.
para invasão dos ovos

NUTRIÇÃO

Suplementação com níveis de vitaminas
lipossolúveis para poedeiras leves

avesui
América Latina | 2017

25, 26 e 27 de abril
Florianópolis | SC | Brasil

CENTROSUL

avesui.com

MECANISMOS DE INVASÃO DO OVO POR *SALMONELLA* SP.

Com o intuito de gerar melhor compreensão da dinâmica de infecção por Salmonella sp. no trato reprodutor de poedeiras reunimos algumas informações acerca dos principais mecanismos envolvidos na persistência da bactéria no trato reprodutivo de poedeiras e os elementos envolvidos na contaminação de ovos

Por | Sabrina Castilho Duarte¹, Ursula Nunes Rauecker² e Cíntia Silva Minafra e Rezende³

No Brasil, em 2015 foram produzidos mais de 39 bilhões de ovos com 1.073.184 matrizes alojadas. Cerca de 99% da produção foi destinada ao mercado interno. A exportação, com valor estimado de 18.747 toneladas do produto, sofreu expressivo aumento em relação aos anos de 2013 e 2014, que tiveram valor médio de 12 mil toneladas. Foram exportadas 17.173 toneladas de ovos *in natura* e 1.574, industrializados¹. Nosso país tem nesse campo ampla capacidade de expansão e esta atividade precisa ser estimulada e apoiada.

Atualmente, os maiores importadores de ovos produzidos no Brasil são os Emirados Árabes e Japão. Entretanto, a produção de ovos no Brasil é dependente do mercado nacional, com consumo anual per capita de 191 ovos¹. A redução dos custos de produção assim como a garantia da segurança microbiológica dos produtos, por meio de modelos de certificação sanitária eficientes, são elementos que amparam a exportação e podem garantir maior abertura do mercado internacional. Apesar dos plantéis comerciais brasileiros serem livres de doenças como a Influenza Aviária e Doença de Newcastle¹, outros agentes, em destaque bactérias do gênero *Salmonella*, são alvo de medidas de controle e monitoramento do Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA). As aves podem apresentar três tipos de enfermidades causadas pela *Salmonella*. A pulorose, causada pela *S. Pullorum* (SP); o tifo aviário, causado pela *S. Gallinarum* (SG) e o paratifo aviário onde estão envolvidos os demais sorovares, incluindo *Salmonella* Enteritidis (SE) e *Salmonella* Typhimurium (ST). De maneira geral as aves quando infectadas pelos sorovares SG e SP apresentam sintomas clínicos, enquanto que quando infectadas pelos sorovares paratíficos

são assintomáticas. As aves são os maiores reservatórios para *Salmonella* sp. e a infecção para seres humanos é comumente associada a produtos avícolas contaminados^{2,3,4}. A transmissão de *Salmonella* paratífica para aves normalmente ocorre por via fecal-oral, causando gastroenterite e disseminação sistêmica em aves jovens, com idade inferior a duas semanas de idade, com mortalidade que varia de acordo com a linhagem infectada. Algumas aves podem sofrer colonização persistente por *Salmonella* sp. no intestino e/ou trato reprodutor, podendo eliminar o agente nas excretas, produzir ovos contaminados e contribuir para a contaminação ambiental^{4,5}.

Nos Estados Unidos, em 2015, a avaliação das notificações de infecções humanas relacionadas ao consumo de alimentos contaminados demonstrou que dos agentes bacterianos, *Salmonella* foi o gênero mais isolado. Um total de 6.827 casos de salmonelose humana foi confirmado e o sorovar Enteritidis foi identificado em 1.358 casos, seguido pelo sorovar Newport e Typhimurium, confirmados em 816 e 739 casos, respectivamente⁶. Na União Europeia em 2014, 44% dos casos de salmonelose humana associados a alimentos foram associados ao consumo de ovos e derivados. *Salmonella* Enteritidis foi isolada em 0,7% dos plantéis comerciais de poedeiras e *S. Typhimurium* em 0,2%⁷.

Diferente dos mamíferos, os embriões das aves não se desenvolvem em ambiente seguro como o útero, protegido pelo sistema imunológico da mãe. A estrutura dos ovos possui diversos mecanismos de proteção incluindo barreiras físicas inespecíficas e substâncias de ação antimicrobiana também presentes em sua formação no oviduto. A grande habilidade de *Salmonella* sp. em colonizar o trato reprodutor das aves,



contaminar ovos e sobreviver no seu interior, virulência e capacidade de disseminação na cadeia de produção de alimentos, evidenciam sua importância em saúde pública^{8,9}. Com o intuito de gerar melhor compreensão da dinâmica de infecção por *Salmonella* sp. no trato reprodutor de poedeiras reunimos algumas informações acerca dos principais mecanismos envolvidos na persistência da bactéria no trato reprodutivo de poedeiras e os elementos envolvidos na contaminação de ovos.

COMO A *SALMONELLA* INFECTA A GALINHA E CONSEGUE PERMANECER NELA?

A *Salmonella* geralmente infecta as aves por via fecal-oral, ou seja, pelo consumo de alimento ou água contaminada. A origem da contaminação é bastante variada. Após a ingestão oral a bactéria permanece no Inglúvio em pH 4-5, desencadeando mecanismos de resposta ao estresse ácido que auxiliará a *Salmonella* em sua sobrevivência durante a passagem pelo proventrículo e ventrículo da ave¹⁰ até que esta chegue ao intestino delgado.

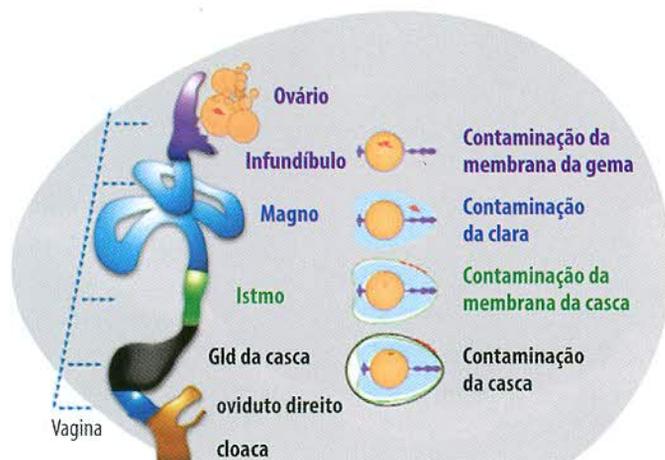
Após colonização do trato gastrointestinal duas fases podem ocorrer 1) invasão, fase que envolve o trato gastrointestinal e

acarreta infecção sistêmica ou uma segunda fase 2) chamada de fase de resolução, em que o organismo da ave consegue controlar ou até eliminar a bactéria. O que determina se a bactéria sobrevive na galinha (tornando-a portadora inaparente) ou se será totalmente eliminada é a interação com o sistema imunológico da ave^{9,10}.

A progressão da infecção e a resposta imunológica são relacionadas ao sorovar e às características genéticas do hospedeiro. Alguns sorovares de *Salmonella* frequentemente são invasivos em aves, determinando infecção sistêmica e resposta imune associada às mucosas. Em aves imunocompetentes, a infecção sistêmica geralmente é transitória e o agente pode ser totalmente eliminado pela resposta imune. Entretanto algumas aves podem não conseguir limitar a infecção podendo vir a óbito devido à disseminação da infecção⁹ ou ainda tornarem-se portadoras inaparentes.

A ave possui um aparato imunológico que envolve uma eficaz interação entre o agente, os macrófagos e os órgãos linfóides e de maneira bastante eficiente a bactéria pode estimular mecanismos para facilitar a sua disseminação para órgãos como baço, fígado e trato reprodutor¹¹. Estes mecanismos envolvem estratégias de sobrevivência intrafagocitária, as-

Figura 01. Formação do ovo no trato reprodutivo de poedeiras e contaminação de diferentes componentes por *Salmonella* Enteritidis de acordo com o segmento colonizado



Fonte: Adaptado de Gantois et al.¹⁹

sociados à Ilha de Patogenicidade de *Salmonella* 2 (SPI-2) que codifica genes de expressão do Sistema de Secreção tipo 3 (T3SS)¹².

A *Salmonella* consegue de maneira eficiente orquestrar eventos que possibilitam sua permanência na galinha ativando genes que garantem seu objetivo final. Esta bactéria usa tudo a seu favor, poderá, por exemplo, ativar genes contidos em uma ilha de patogenicidade SPI-5 e genes que fisiologicamente estão relacionados ao estresse térmico, oxidativo (sistema RpoE) em resposta a osmolaridade, para sobreviver no lúmen e epitélio intestinal¹³.

Além desses mecanismos a presença de lipopolissacarídeos (LPS) na composição de sua parede celular também contribui na colonização do trato reprodutor de poedeiras¹⁴. A presença de LPS altera a carga elétrica de superfície, tornando a bactéria refratária a peptídeos catiônicos de ação antimicrobiana, facilitando a multiplicação e persistência do agente no trato reprodutor¹⁴. Um de seus componentes, denominado de Antígeno-O, é composto por subunidades e sua síntese envolve a presença de polimerase (wzy), que determina as dimensões de suas cadeias. Bactérias contendo cadeias mais curtas de Antígeno-O apresentaram-se menos eficientes em colonizar ovário e oviduto¹⁵.

Outro componente da estrutura bacteriana, as fímbrias, que participam da adesão da bactéria a superfícies, também foram alvo de diversos estudos. Na superfície das células epiteliais do oviduto de aves identificou-se a presença de glicosíngolipídeos que atuam como sítios de aderência

para fímbrias do tipo 1 (SEF21) de *Salmonella* Enteritidis, o que explicaria o tropismo do agente por essa região¹⁶. As fímbrias do tipo 1 também se associam a secreções do oviduto, facilitando a incorporação do agente aos componentes do ovo durante a sua formação¹⁷. Cepas não produtoras de fímbrias (Δ fimD) apresentaram redução no potencial de contaminação de ovos¹⁸.

Além da disseminação sistêmica, a *Salmonella* pode alcançar o oviduto por meio de infecção ascendente pela cloaca, sendo incorporada ao ovo durante sua produção^{14,19,20}. Portanto, a salmonela por uso de vários mecanismos poderá sobreviver de diferentes maneiras, e ainda persistir na ave em baixas concentrações, e em momentos de estresse voltar a se multiplicar caracteri-

zando a recrudescência da infecção. A maturidade sexual em poedeiras exerce efeito sobre os linfócitos, com uma redução em seu número, em particular LT CD4+ localizados no trato reprodutor, elevando a sensibilidade ao agente ou recrudescência da infecção em animais portadores. Em aves vacinadas, o início da postura determina efeito negativo sobre a intensidade e velocidade da resposta, reduzindo a proteção vacinal⁹. Promover bem-estar as aves é uma atitude que previne *Salmonella*.

COMO A BACTÉRIA PODE SE INSTALAR NO OVO?

A formação do ovo em poedeiras dura cerca de 26 horas e envolve sequência de eventos que ocorrem em diferentes segmentos do trato reprodutor da ave, com produção de diversas substâncias (Figura 01). A gema, produzida nos ovários, é captada pelo infundíbulo, porção inicial do oviduto e segue para magno, onde ocorre a síntese do albúmen. Na região do istmo ocorre a formação da membrana da casca e no útero ou glândula da casca, secreção dos componentes pela qual darão origem à casca. A vagina da ave é responsável pelo transporte do ovo para o meio externo (ovoposição)¹⁹. Isso reforça a importância de alojar as aves em ambiente limpo e higienizado.

A contaminação do ovo pode ocorrer ainda na galinha, quando esta ave estiver contaminada com *Salmonella*, ou após a postura deste por contato ambiental da casca com excretas de animais infectados. Esta forma de contaminação, denominada de horizontal, pode determinar a penetração do



agente através da casca e membrana de ovos já formados, permitindo a contaminação de seu interior. O potencial de penetração de *Salmonella* Enteritidis pela casca já foi avaliado em diversos estudos^{21,22,23} e é mais rápida e intensa imediatamente após a postura, quando a superfície imatura e a perda de calor entre o ovo e o ambiente favorecem a porosidade da casca²¹.

A contaminação da casca e a capacidade de atravessá-la não são características exclusivas de *Salmonella* Enteritidis, sendo observadas *in vitro* em outros sorovares e outros gêneros bacterianos²³. A colonização do trato reprodutor pela bactéria sofre influência de fatores fisiológicos e hormonais de efeito imunossupressor em aves que atingem maturidade sexual^{9,10,31}. Diferentes sorovares possuem capacidade de infectar o sistema reprodutivo das aves, alguns parecem ser mais eficazes neste processo. Essas diferenças podem ser atribuídas por variações metodológicas, tais como cepa e concentração do inóculo utilizado, método de inoculação e linhagens de poedeiras utilizadas.

Além disso, o isolamento de *Salmonella* Enteritidis em oviduto pode ocorrer mesmo na ausência de colonização intestinal, indicando persistência do agente em trato reprodutivo após infecção sistêmica e evidenciando a importância da transmissão vertical do agente^{24,25}.

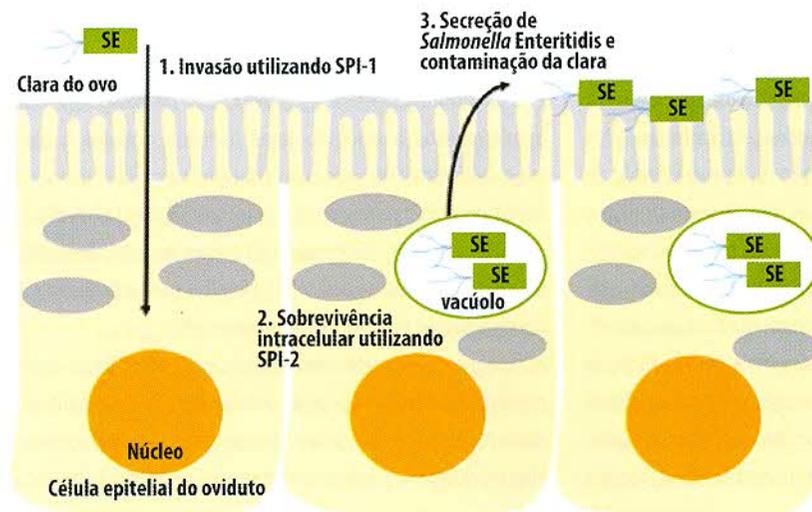
Em condições normais o trato reprodutor de aves é ambiente estéril, apenas com a presença de micro-organismos do gênero *Lactobacillus* que podem ser isolados do segmento

vaginal²⁵. Entretanto, no curso da infecção, *Salmonella* Enteritidis presente na região da cloaca é capaz de colonizar vagina e útero de forma ascendente, determinando contaminação da casca ou da superfície da casca do ovo²⁷. A inoculação experimental com diferentes sorovares de *Salmonella* em poedeiras por via intravaginal demonstrou maior eficiência do sorovar Enteritidis na colonização tecidual e produção de ovos contaminados²⁸. A contaminação pode ocorrer durante a postura, com o contato da casca do ovo com a cloaca contaminada do animal. Já se observou que aves que eliminavam o agente no intestino nem sempre produziam ovos contaminados por *Salmonella* Enteritidis^{24,29,30}. Portanto, nem sempre uma galinha portadora vai produzir ovos contaminados.

Após sobrevivência da bactéria pela modulação da expressão de MHC classe I nas células infectadas, reduzindo a atividade de LT de ação citolítica/citotóxica (CD8+). Muitas vezes o agente é totalmente eliminado 28 dias após a contaminação da galinha, ou ser gradualmente eliminado após sete a 14 dias após a contaminação no fígado e baço¹⁰ persistindo nestes órgãos por até 12 semanas após exposição³¹. Além disso, em animais com infecção persistente, observou-se aumento na produção de citocinas reguladoras como IL-10¹⁰. A colonização do magno e istmo pode acontecer após disseminação sistêmica do agente ou determinada migração de bactérias presentes no ovário¹⁹. A presença de bactérias nessas regiões do oviduto associa-se com a contaminação

do albúmen e da membrana da casca, sendo a colonização da região do magno a mais comum^{18,20}. Não existe consenso relativo à região mais predisposta à infecção por *Salmonella* sp. Alguns trabalhos apontam o magno como a região mais comumente colonizada^{19,20}, outros propõem o istmo¹⁸ e junção infundíbulo-magno³². Os componentes do ovo mais propensos a apresentar contaminação são o albúmen e a superfície da membrana vitelínica que recobre a

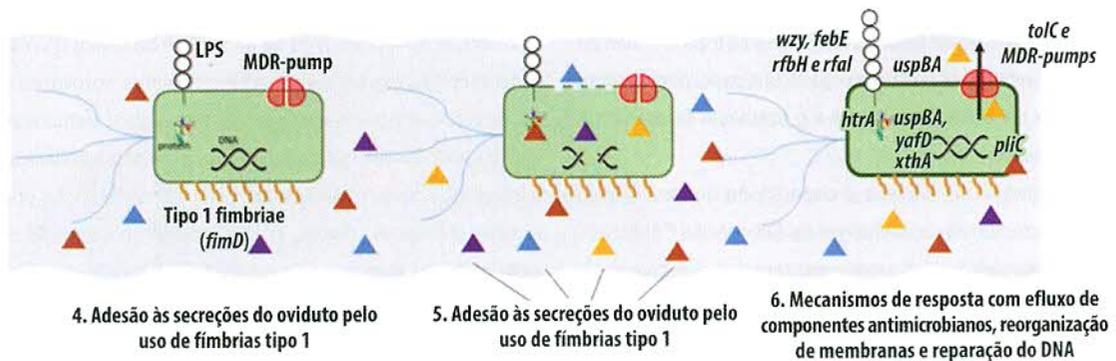
Figura 02. Mecanismos de invasão e colonização de células epiteliais do oviduto de galinhas envolvendo a expressão de genes contidos em SPI-1 e SPI-2 de *Salmonella* Enteritidis



Fonte: Adaptado de Raspoet³⁰



Figura 03. Contaminação de ovos por *Salmonella* sp., incluindo adesão fimbrial ao oviduto e secreções e mecanismos de sobrevivência ao ambiente hostil do oviduto do hospedeiro e ovo



Fonte: Adaptado de Raspoet³⁹

gema^{32,33}. Estudos demonstram que a *Salmonella* Enteritidis pode sobreviver por mais tempo no albúmen que outros sorovares³⁴.

A colonização do trato reprodutivo de aves por *Salmonella* Enteritidis envolve mecanismos semelhantes aos da infecção do trato digestório, de invasão e sobrevivência intracelular determinados pelo T3SS^{35,36}. Destaca-se a participação das ilhas SPI-1 e SPI-2 (Figura 02). A SPI-1 é relacionada com a invasão de células não fagocitárias, como as do epitélio intestinal, nos estágios iniciais da infecção e na colonização do oviduto, em infecções persistentes. SPI-2 é necessária para sobrevivência do agente no interior de células, importante para a disseminação e manutenção do agente no hospedeiro^{37,38}.

Salmonella Enteritidis é capaz de colonizar todos os segmentos envolvidos na produção do ovo/postura¹⁹. Dependendo do local de instalação, pode ser incorporada em diferentes componentes, incluindo a membrana da gema e a própria gema, caso o agente colonize o ovário e infundíbulo da poedeira, como consequência de sua disseminação sistêmica^{19,40,41}. Entretanto, não se observa penetração do agente através da membrana da gema à temperatura de 42°C⁴², sugerindo que a contaminação ocorra após a postura dos ovos, em temperatura de 25-30°C^{32,43}, associada a alteração na viscosidade da gema e redução da integridade da membrana da gema⁴³. Os resultados de estudos que avaliaram a capacidade de colonização em ovário são controversos. Alguns apontam o sorovar Enteritidis com maior potencial de colonização do ovário enquanto que outros demonstram colonização equivalente pelos sorovares Enteritidis e Typhimurium^{44,45}. Acredita-se que *Salmonella* permanece no interior das células

epiteliais do oviduto e por mecanismos desconhecidos é secretada de forma periódica para a região luminal, resultando na contaminação dos ovos em formação^{39,49}. Assim como o sorovar Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium e Heidelberg também são capazes de colonizar oviduto em infecções experimentais⁴⁷. Por isso, manter as aves livres de *Salmonella* é fundamental para a qualidade dos ovos produzidos no Brasil. Estudos têm sido realizados pela Embrapa para verificar a importância de outros sorovares na contaminação de ovos (Projeto SEG 03.13.10.005.00)

MECANISMOS NO OVO PARA IMPEDIR A ENTRADA DE MICRO-ORGANISMOS

Frente a todos estes mecanismos da *Salmonella* para invadir o ovo existem mecanismos que dificultam bastante a entrada de bactérias neste alimento. Existem vários agentes antimicrobianos presentes nos ovos, responsáveis por proteger o embrião quando este existe, tais como peroxidase, AvBD, ovodefensinas, imunoglobulinas, lisozima, agentes quelantes e inibidores de protease. Foi demonstrada a presença de cinco AvBD na casca do ovo: AvBD3, AvBD9, AvBD10, AvBD11 e AvBD1. Na gema e albúmen detectou-se AvBD9 e AvBD11, respectivamente^{48,49}. No albúmen, a presença de ovodefensinas também foi evidenciada⁵⁰.

A lisozima ou N-acetil-muramidase é capaz de atuar sobre peptídeos da parede celular, alterando sua integridade¹⁴. Na parede celular de bactérias Gram-negativas, sua atividade é comprometida pela ação do LPS, localizados externamente à camada de peptídeos⁵¹. Entretanto, são formados peptídeos derivados de lisozima

capazes de atravessar a parede celular de Gram-negativas, formando poros na membrana celular⁵².

No ovo são encontrados agentes quelantes que se ligam a nutrientes, dificultando sua utilização pelos micro-organismos. O elemento quelante mais conhecido é a ovotransferrina, capaz de se ligar a íons de ferro (Fe^{3+}), privando as bactérias deste componente necessário para o crescimento bacteriano. Além disso, em condições de elevação de pH e alteração do potencial de oxidação-redução, a ovotransferrina é clivada, liberando domínios funcionais de ação bactericida, como o peptídeo antimicrobiano 92 (OTAP-92)⁵³. Outros quelantes também podem ser encontrados nos ovos, como a avidina, proteína de ligação à biotina (BBP), proteína de ligação à riboflavina, proteína plasmática de ligação ao retinol e proteína de ligação à vitamina D, responsáveis pela manutenção dos níveis de biotina, riboflavina, retinol e vitamina D para o embrião³⁹. Bactérias patogênicas produzem proteases para hidrolisar proteínas do hospedeiro, inativando-as ou utilizando os aminoácidos liberados como fonte de nutrientes³⁹. No ovo são encontrados inibidores de protease, a maioria pertencente à superfamília das serinas e cisteínas inibidoras de protease⁵⁴. A albumina possui estrutura semelhante às serinas e sua quebra libera fragmentos peptídicos com atividade antimicrobiana, assim como outras proteínas relacionadas à albumina como Proteína X e Y (OVAX e OVAY), capazes de inibir *Salmonella* sp.⁵⁵.

Três tipos de imunoglobulinas foram identificados na gema e albúmen, IgA, IgM e IgY, liberadas pelo ovário e oviduto. Dos ovos produzidos por aves infectadas por *Salmonella* Enteritidis, foram extraídas e purificadas imunoglobulinas específicas, capazes de interferir na capacidade de crescimento de *Salmonella* Enteritidis e *Typhimurium in vitro*⁵⁶. Isolados de *Salmonella* Enteritidis encontrados no oviduto e interior de ovos contaminados expressam de forma intensa genes envolvidos com a estrutura e integridade da parede celular, tornando o agente mais resistentes à ação de componentes antimicrobianos (Figura 03)⁴⁶. A habilidade de modificar a estrutura do LPS, reduzindo sua carga negativa, é um mecanismo que previne a adesão de CAMPs¹⁴. *Salmonella* Enteritidis sintetiza um inibidor de lisozima (PliC), mas sua relevância na sobrevivência do agente durante a formação dos ovos ainda não foi definida⁵⁷. O dano à parede, membrana celular e DNA bacteriano são minimizados pela ação de enzimas de reparo yafD e exonuclease III e pela expressão dos genes de resposta universal ao estresse uspBA^{14,58}.

Apesar da restrição de nutrientes como Fe^{3+} provocada pela ação de agentes quelantes, *Salmonella* sp. possui elevada afinidade ao elemento, sendo capaz de desenvolver mecanismos de sequestro de ferro da ovotransferrina¹⁴. Por meio da presença de proteínas de canal na membrana externa (TolC) e bombas na membrana interna (MDR-pumps), ocorre a secreção de sideróforos bacterianos como enterobactina e salmoquelina para o meio externo⁵⁹. TolC também se relaciona com a ação de bombas de efluxo, conhecidas por sua atuação em mecanismos de resistência antibióticos⁶⁰ e acredita-se que também participa da remoção de avidinas do meio intracelular³⁹.

A combinação do estresse térmico e a presença de substâncias de ação antimicrobiana no ovo, principalmente no albúmen, são responsáveis por reduzir a contaminação por *Salmonella* durante a sua formação. A presença do agente viável nos ovos após postura evidencia a capacidade do agente de sobreviver ao ambiente hostil do oviduto e ovo em associação com a temperatura corporal elevada do hospedeiro³⁹. Ao contaminar os ovos e permanecer viável em seu interior, compromete a segurança da cadeia de produção de alimentos. Por todos esses mecanismos é que temos no ovo um alimento nutritivo, seguro e saudável.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conhecer de que forma a *Salmonella* se instala na ave e como chega até o ovo é muito importante. É conhecendo bem o inimigo que nos mantemos livres dele. Para controle de *Salmonella* em granjas avícolas é importante a adoção de atitudes conjuntas. Manter as galinhas em ambiente limpo e livre de bactérias que possam afetar a saúde de seres humanos é responsabilidade de todos os envolvidos no sistema produtivo. O Brasil pode crescer muito na comercialização de ovos, e isso depende de cada um de nós, integrantes dessa cadeia tão promissora. É necessário cada vez mais agregar qualidade ao ovo produzido no Brasil, contribuindo para o aumento do consumo deste alimento tão saudável. 

¹Pesquisadora da Embrapa Suínos e Aves

²Doutoranda do Programa de Ciência Animal da Universidade Federal de Goiás (UFG)

³Docente da Universidade Federal de Goiás (UFG)

*Os números indicados ao longo do texto fazem referência à bibliografia, que pode ser consultada no site de Avicultura Industrial por meio do link:

www.aviculturaindustrial.com.br/invasao1263

