

COMUNICAÇÃO CIENTÍFICA

AVALIAÇÃO DA QUALIDADE SANITÁRIA DE
INCUBATÓRIO POR MEIO DE PLACAS DE SEDIMENTAÇÃO

A.L.S.P. Cardoso, E.N.C. Tessari, A.M.I. Kanashiro, G.F.Z. Stoppa, R.L. Luciano, A.G.M. Castro

¹Instituto Biológico, Centro Avançado de Pesquisa Tecnológica do Agronegócio Avícola, Rua Bezerra Paes, 2278, CEP 13690-000, Descalvado, SP, Brasil. E-mail: alspcardoso@biologico.sp.gov.br

RESUMO

O setor avícola brasileiro atingiu, graças ao avanço tecnológico e à competência dos profissionais ligados ao setor, o posto de maior exportador e segundo maior produtor mundial de carne de frango. Estes métodos incluem a questão de contaminação do ambiente por micro-organismos patogênicos que podem trazer perdas produtivas na cadeia avícola como um todo. O objetivo do presente trabalho foi avaliar as condições microbiológicas de um incubatório do Estado de São Paulo. A metodologia empregada foi a da técnica da placa de sedimentação com meios de cultura específicos para o crescimento de bactérias e de fungos. Foram realizados 30 monitoramentos, expondo-se as placas de Petri com dois meios de culturas diferentes, ágar Mac Conkey e ágar Sabouraud dextrose. Observamos que os índices de contaminação fúngica e bacteriana não foram elevados nos locais onde as placas foram expostas, exceto na máquina de vacinação onde o número de enterobactérias foi 52,7 unidades formadoras de colônias (UFC). Podemos concluir que o método de contagem de colônias fúngicas e bacterianas pode ser uma maneira simples de monitorar a eficiência sanitária do incubatório.

PALAVRAS-CHAVE: Bactérias, fungos, incubatório, placas de sedimentação.

ABSTRACT

EVALUATION OF THE SANITARY QUALITY OF A HATCHING HOUSE THROUGH SEDIMENTATION PLATES. Due to technological advances and professional commitment, the Brazilian poultry industry has become the main exporter and second major producer of chicken meat in the world. These methods involve the issue of environmental contamination by pathogenic microorganisms which can result in productive losses for the poultry industry as a whole. The objective of the present work was to evaluate the microbiological conditions of a hatching house in the state of São Paulo, Brazil. The technique of plate sedimentation was the methodology used, with two culture mediums for growing specific bacteria and fungi. Thirty monitorings were carried out, with two different culture mediums, Mac Conkey Agar and Sabouraud Dextrose Agar. It was observed that the indices of fungus and bacterial contamination were not elevated in the places where the plates had been exposed, except in the vaccination machine where the number of enterobacteria was 52.7 colony forming units (CFU). The results indicate that the method of counting of fungal and bacterial colonies can be a simple way to monitor the sanitary efficiency of the hatching house.

KEY WORDS: Bacteria, fungus, hatching house, sedimentation plates.

A avicultura brasileira é uma das mais significativas do mundo, que se destaca pelo uso de tecnologia avançada, controle de qualidade e constante monitoramento microbiológico nas diversas etapas da produção.

Os processos de certificação, tal como o Hazard Analysis Critical Control Points (HACCP), compreendem uma série de medidas que visam reduzir a entrada de patógenos, reduzir riscos de multiplicação e contaminação bacteriana e fúngica, sendo que este controle deve ser rígido em toda a cadeia de produção avícola, principalmente no processo de incubação (PETINE, 1990).

A qualidade dos pintos de um dia é determinada pela interação de múltiplos fatores, os quais precisam ser bem conhecidos de forma a serem padronizados dentro de um sistema de controle que permita avaliá-los rotineiramente, modificando-os quando necessário e visando sempre à manutenção da qualidade do produto final, ou seja, o pinto de um dia produzido (MACARI; GONZALE, 2003).

Os micro-organismos comumente encontrados nos ambientes de incubação são uma variedade de bactérias, fungos e vírus. Alguns desses micro-organismos são especialmente patogênicos para as aves, enquan-

to a maioria é de pouca expressão (GUSTIN, 2003). Dentre esses microorganismos, os mais frequentes e com alto potencial adaptativo a condições desfavoráveis de meio são *Escherichia coli*, *Pseudomonas spp.*, *Staphylococcus aureus* e *Aspergillus fumigatus* (DIFABIO, 1997). Este fungo é o agente micótico mais importante no setor avícola, acarretando enormes perdas econômicas devido a mortalidade embrionária durante o processo de incubação, na eclosão, onde pode infectar os pintos levando a uma pneumomicose (BRAEM, 1988) e problemas respiratórios em aves adultas (BRAEM, 1988; CERVANTES, 1995). Outros fungos que comumente causam problemas em incubatórios são do gênero *Penicillium* e outras espécies do gênero *Aspergillus* (DIFABIO, 1997). Estes estão presentes em diversos ambientes podendo ser introduzidos e disseminados rapidamente em incubatórios se não houver um sistema de desinfecção adequado. A ingestão das toxinas produzidas pelos fungos podem causar doenças (LI; YANG, 2004) e diminuição na qualidade do produto final (OUCKAMA, 1996; RICHARD, 1997).

A exposição dos animais confinados aos esporos desses micro-organismos, que são carreados pelo ar, favorece o aparecimento de doenças respiratórias em aves, por exemplo, a aspergilose, bem como torna os animais mais susceptíveis a infecções secundárias (GIGLI *et al.*, 2007b).

No ambiente da incubação, o princípio básico para controlar o número de bactérias está na capacidade dos fatores físicos e operacionais em remover sujidades e matéria orgânica. Sem alimento, não ocorre crescimento e multiplicação de bactérias. O nível de umidade no ambiente é outro fator essencial para a sobrevivência de bactérias, que a parecem na total ausência de água. Todas as áreas do incubatório, sob condições normais de umidade relativa, predispõem crescimento seguro de milhões de bactérias. Cepas de *E. coli* podem causar várias manifestações clínicas nas aves. Do ponto de vista de incubação, as que interessam são as infecções do saco da gema e a colisepticemia dos pintos (DIFABIO, 1997).

A contaminação no incubatório pode resultar em exposição dos pintinhos recém-eclodidos às salmonelas, no momento em que as aves são mais suscetíveis à colonização do trato intestinal (BAILEY *et al.*, 1994; BYRD *et al.*, 1998).

No processo de produção de ovos em uma granja comercial, o incubatório representa um ambiente crítico e potencial fonte de contaminação da casca de ovos (LAMAS DA SILVA; 1981; SILVA, 1996). Portanto, a garantia da qualidade do ponto de vista microbiano, e produtividade da granja dependem da adoção de medidas sanitárias voltadas a impedir a entrada de patógenos, bem como a redução da carga microbiana existente (MARQUES, 1986; OUKAMA, 1996).

A monitoria feita no incubatório tem importância especial porque passa a ser um atestado de qualidade do pintinho. Para que as aves possam expressar seu potencial genético e produtivo elas devem estar dentro de padrões não só de nutrição, genética, manejo e ambiente, mas também microbiológico desde o primeiro dia de vida. A monitoria microbiológica pode ser realizada por meio de exposição de placas, que provavelmente é a mais utilizada pelo seu equilíbrio entre eficiência, simplicidade e custos. Embora não seja uma técnica extremamente precisa, os seus resultados dão indicações muito boas da qualidade microbiológica dos pintinhos (BACK, 2005).

O objetivo do presente estudo foi avaliar a qualidade microbiológica em ambientes e equipamentos de um incubatório com a finalidade de produção de pintos de corte, expondo mensalmente placas de Petri com meios de cultura apropriados para fungos e bactérias.

Durante o período de janeiro de 2005 a junho de 2007 realizou-se mensalmente monitoramentos em um incubatório de pintos de corte, localizado no Estado de São Paulo. A metodologia utilizada foi a técnica da placa de sedimentação (TRABULSI *et al.*, 1999). Foram realizadas 30 exposições, por meio de placas de Petri contendo 2 diferentes meios de cultura: ágar Mac Conkey (Merck®) para contagem de enterobactérias e ágar Sabouraud dextrose (Merck®) específico para o isolamento de fungos. O momento de exposição de placas foi ao ambiente em uso para a avaliação da carga microbiana presente no dia a dia. As placas foram abertas e expostas ao ambiente por 15 minutos em locais pré-definidos no incubatório: máquina de vacinação, incubadora 1, incubadora 2, sala de ovos, laboratório e sala de pintos. Após a exposição, as placas foram incubadas a 37° C, por 24 horas e por 5 dias, para a contagem de enterobactérias e de fungos, respectivamente, realizada em um contador de colônias. O número de placas expostas em cada local de avaliação foi determinado conforme o tamanho em metros quadrados, sendo colocada uma placa por tipo de meio de cultura por ambiente a ser pesquisado. Considerou-se positivo todos aqueles meios que apresentaram crescimento de uma ou mais colônias de bactérias e fungos. Foi realizada a quantificação de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de fungos e bactérias e a identificação de fungos pela da morfologia de gênero e espécie. Foi calculado o número médio de colônias de bactérias e fungos obtidos das 30 exposições de placas de cada local pré-definido no incubatório.

O número médio de colônias obtido durante o experimento para bactérias e fungos nos locais pré-determinados do incubatório encontra-se na Tabela 1.

Tabela 1 - Número médio de colônias de bactérias e de fungos obtido nos 30 monitoramentos microbiológicos, de acordo com os locais de exposição das placas no incubatório.

| Locais de exposição das placas | Entero-bactérias | <i>Aspergillus fumigatus</i> | <i>Aspergillus niger</i> | <i>Aspergillus</i> spp. | <i>Penicillium</i> spp. | <i>Tricophyton</i> spp. | <i>Mucor</i> spp. | Leveduras |
|--------------------------------|------------------|------------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------|-----------|
| Máquina de vacinação | 52,70 | 0,50 | 0,40 | 0,03 | 0,03 | 0,03 | 0,17 | 35,43 |
| Incubadora 1 | 1,23 | 0,90 | 0,07 | 0,03 | ausência | 0,07 | 0,20 | 1,93 |
| Incubadora 2 | 0,63 | 0,23 | 0,03 | 0,13 | ausência | ausência | 0,50 | 13,10 |
| Sala de ovos | 0,53 | 0,03 | ausência | ausência | ausência | ausência | 0,10 | 5,10 |
| Laboratório | 0,07 | 0,20 | ausência | 0,03 | ausência | ausência | 0,10 | 1,83 |
| Sala de pintos | 4,9 | 0,20 | 0,07 | 0,10 | ausência | ausência | 0,20 | 9,60 |

Tabela 2 - Tabela de Sadler, citado por Di FABIO (1990).

| Classificação | Nº médio de colônias-bactérias | Nº médio de colônias-fungos |
|---------------|--------------------------------|-----------------------------|
| Excelente | 0-10 | 0 |
| Bom | 11-25 | 1-3 |
| Médio | 26-46 | 4-6 |
| Ruim | 47-66 | 7-10 |
| Muito ruim | 67-86 | 11-12 |
| Péssimo | > 86 | > 13 |

Observamos que os índices de contaminação bacteriano e fúngico não foram elevados nos locais onde se realizou a exposição das placas, exceto na máquina de vacinação com relação ao número de enterobactérias, quando comparados com os valores médios padrões de Sadler (Di FABIO, 1990), demonstrados na Tabela 2.

O Tabela 3 mostra a percentagem da identificação dos fungos encontrados nos diferentes locais do incubatório.

A biossegurança de um incubatório é fundamental para o desempenho zootécnico dos pintos, portanto o controle sanitário do incubatório deve ser rígido em todas as suas dependências (BARNES; GROSS, 1997). Contudo, no Brasil, existem poucos dados referentes à determinação das condições sanitárias de incubatórios destinados a frangos de corte. Neste aspecto, nosso experimento busca, pela análise dos resultados, agregar dados a esta importante discussão.

Estudos realizados por TESSARI *et al.* (2002) no mesmo incubatório apresentaram números médios de colônias de bactérias e fungos muito elevados, indicando que os programas de controle sanitários encontravam-se inadequados, comprometendo a qualidade dos pintos. Posteriormente, resultados de CARDOSO *et al.* (2006) mostraram uma melhora na qualidade microbiológica deste incubatório. Os dados do presente estudo apresentam baixos números de colônias de bactérias e de fungos, reforçando que

Tabela 3 - Percentagem dos fungos obtida nos 30 monitoramentos microbiológicos, de acordo com os locais de exposição das placas no incubatório.

| Identificação dos fungos | Percentagem (%) |
|------------------------------|-----------------|
| <i>Aspergillus fumigatus</i> | 66,88 |
| <i>Aspergillus niger</i> | 18,51 |
| <i>Aspergillus</i> spp. | 10,39 |
| <i>Tricophyton</i> spp. | 3,25 |
| <i>Penicillium</i> spp. | 0,97 |

é imprescindível a prática rotineira do monitoramento por exposição de placas em um incubatório.

O resultado do plaqueamento do ambiente do nascedouro de estudo realizado por LIMA JUNIOR *et al.* (2001), revelou a predominância total do gênero *Penicillium* spp. em relação aos demais fungos do ambiente.

GIGLI *et al.* (2005) observaram a presença de *Aspergillus* spp. em incubatório nas máquinas de incubação e principalmente nos nascedouros, onde houve predominante incidência de *A. fumigatus*, um dos principais agentes micóticos causadores de morte embrionária durante todo o processo de incubação (BACK, 2005).

GIGLI *et al.* (2007a) observaram maior incidência de *A. fumigatus* (32,26%) na sala de incubação e no interior da incubadora.

No presente estudo observou-se maior incidência de *A. fumigatus* (66,88%), seguida de *A. niger* (18,51%) no incubatório.

A aspergilose aviária em animais jovens é descrita como uma das principais enfermidades na exploração econômica de aves de produção comercial, e o fungo pode estar presente em órgãos como pulmões e sacos aéreos, ocasionando a mortalidade de embrião e de aves jovens (FRASER, 1991; EL-GHARIB *et al.*, 1993; CERVANTES, 1995; VILAR *et al.*, 1995; RICHARD, 1997). Esses autores afirmam que o agente micótico mais frequente determinando este tipo de problema é o *Aspergillus* spp., seguido do *Penicillium* spp. Entretanto, RICHARD (1997) descreve a presença de outros fungos

como *Paecilomyces* spp., *Cephalosporium* spp., *Trichoderma* spp., *Scopulariopsis* spp. e *Mucor* spp.

FRASER (1991) e CERVANTES (1995) descreveram o *Penicillium* spp. como sendo um agente micótico capaz de induzir sérias perdas devido a infecções respiratórias em frangos de corte, porém o *A. fumigatus* é o mais patogênico e responsável por problemas respiratórios.

De acordo com COX et al. (1991), os embriões podem ser infectados na incubadora e com maior frequência nos nascedouros, durante a bicagem dos ovos e eclosão. Nas incubadoras e nascedouros, as condições de temperatura e umidade promovem a proliferação de bactérias do gênero *Salmonella* (COX et al., 2000).

Na máquina de vacinação, um dos locais pré-determinados para a realização da análise, observou-se um significativo aumento nos níveis de contaminação por enterobactérias e, conforme BACK (2005), o crescimento de bactérias indica a quantidade de microorganismos que as aves estão sendo expostas, mesmo que na sua maioria elas não sejam patogênicas. Este é um fator importante da qualidade microbiológica dos pintos. Por melhor que seja o sistema de desinfecção de ovos e higienização no incubatório, os pintinhos sempre vão estar expostos a um nível considerável de bactérias, porém acima de certos limites há comprometimento da qualidade e do desenvolvimento das aves.

Com base nos resultados encontrados, concluímos que a avaliação da qualidade sanitária do incubatório deve ser realizada periodicamente, o que dá uma idéia da intensidade da contaminação ambiental, permitindo que se avalie também a eficácia dos processos de limpeza e desinfecção executados no incubatório. A experiência que se tem com este teste, realizado no Centro Avançado de Pesquisa Tecnológica do Agronegócio Avícola, demonstra que dificilmente um incubatório apresenta crescimento zero de colônias bacterianas e fúngicas. Estes resultados remetem a importância da prática de monitoramento microbiológico em incubatórios a fim de que seja estabelecida a estratégia sanitária mais eficiente nesses locais.

REFERÊNCIAS

- BACK, A. Incubatório: monitoria microbiológica pela exposição de placas. *Ave World*, v.3, n.7, p.80-86, 2005.
- BAILEY, J.S.; COX, N.A.; BERRANG, M.E. Hatchery-acquired *Salmonellae* in broiler chicks. *Poultry Science*, v.73, p.1153-1157, 1994.
- BARNES, H.J.; GROSS, W.B. Colibacilosis. In: CALNEK, B.W. *Disease of poultry*. 10.ed. Ames: Iowa State University Press, 1997. p.131-141.
- BRAEM, G. Limiting aspergillus in the hatchery. *International Hatchery Practice*, v.2, n.8, p.11-13, 1988.
- BYRD, J.A.; CORRIER, D.E.; DELOACH, J.R.; NISBET, D.J.; STANKER, L.H. Horizontal transmission of *Salmonella typhimurium* in broiler chicks. *Journal of Applied Poultry Research*, v.7, p.75-80, 1998.
- CARDOSO, A.L.S.P.; TESSARI, E.N.C.; CASTRO, A.G.M.; KANASHIRO, A.M.I.; STOPPA, G.F.Z.; LUCIANO, R.L. Monitoria microbiológica em incubatório por exposição de placas. In: CONFERÊNCIA APINCO, 2006, Santos, SP. *Anais. Revista Brasileira da Ciência Avícola*. Prêmio Lamas. Santos, SP. *Anais. Suplemento 8*, 2006. p.168
- CERVANTES, H. Evaluación y manejo de los problemas respiratorios en pollos de engorde. *Avicultura Profesional*, v.13, n.2, p.76-84, 1995.
- COX, N.A.; BAILEY, J.S.; MAULDIN, J.M.; BLANKENSHIP, L.C.; WILSON, J.L. Extent of salmonellae contamination in breeder hatcheries. *Poultry Science*, v.70, p.416-418, 1991.
- COX, N.A.; BERRANG, M.E.; CASON, J.A. *Salmonella* penetration of egg shells and proliferation in broiler hatching eggs - a review. *Poultry Science*, v.79, p.1571-1574, 2000.
- DI FABIO, J. Higiene e controle de qualidade no incubatório. In: FACTA - Fundação Apinco de Ciência e Tecnologia Avícolas. *Curso de atualização em incubação*. Campinas: Ed. Arbor Acres Farm, Inc., 1990. p.51-60.
- DI FABIO, J. Higiene e controle sanitário do incubatório. In: Simpósio Internacional sobre Manejo de Matrizes e Incubação. *Anais*. Campinas. FACTA, 1997. p.91-106.
- EL-GHARIB, I.; ELDIN, A.M.W.K.; BASTAMI, M.A.; WAHBA, S.; SAFWAT, E.E.A.; HATEM, E. Incidence of isolation of microorganisms leading to embryonic mortalities and reducing hatchability of duck eggs. *Veterinary Medical Journal Giza*, v.41, n.3, p.63-65, 1993.
- FRASER, C.M. Aspergilose. In: *Manual Merck de Veterinária*. 6.ed. São Paulo: Roca, 1991. p.1439-1440.
- GIGLI, A.C.S.; ALVARENGA, D.P.; SALGADO, D.D.; BARACHO, M.S.; NÄÄS, I.A.; MOURA, D.J. Identificação de fungos em incubatório de pintinhos de um dia. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*. Prêmio José Maria Lamas. p.16, 2007a.
- GIGLI, A.C.S.; BARACHO, M.S.; NÄÄS, I.A. Pontos críticos na cadeia avícola relacionados à incidência de fungos. *Avisite*, março, 2007b. Disponível em: <<http://www.avisite.com.br/cet/trabalhos.asp?codigo=99&acao>>. Acesso em: 6 jun. 2007.

- GIGLI, A.C.S.; BARACHO, M.S.; NÄÄS, I.A. Qualidade do ar em incubatório: um estudo de caso. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA AGRÍCOLA, 34., 2005, Canoas. *Anais*. Canoas: ULBRA, 2005. p.4.
- GUSTIN, P.C. Biossegurança no incubatório. *Manejo da Incubação*. 2.ed. Campinas: Facta, 2003. p.297-349.
- LAMAS DA SILVA, J.M. Controle sanitário do incubatório. In: CAMPOS; E.J.; LAMAS DA SILVA, J.M.; SILVA, E.M. (Ed.). *Produção e qualidade de pintos de um dia*. Brasília: EMBRAPA, 1981. p.147-153.
- LI, D.W.; YANG, C.S. Fungal contamination as a major contributor to sick building syndrome. *Advances in Applied Microbiology*, v.55, p.21-112, 2004.
- LIMA JUNIOR, J.S.; PINTO, D.M.; CARRASCO, L.O.; SALGUERO, F.J.B.; MEIRELES, M.C.A. Incidência de fungos na produção de pintos de corte de um dia de idade. *Revista Brasileira de Agrociência*, v.7, n.1, p.73-77, 2001.
- MACARI, M.; GONZÁLES, E. *Manejo da incubação*. Jaboticabal: FACTA, 2003. 537p.
- MARQUES, D. *Manual do incubador*. Amparo: CASP, 1986. p.214.
- OUCKAMA, R.M. Monitoramento de *Aspergillus*, ataques microbianos e vacinação contra a doença de Marek no programa de controle de qualidade de incubatórios. In: INTERNATIONAL POULTRY CONSULTANTS. *Clínica de incubação*. Brasília: IPC, 1996. p.1-13.
- PETINE, A. Higiene e controle de qualidade no incubatório. In: FACTA - Fundação APINCO de Ciência e Tecnologias Avícolas. *Curso de atualização em incubação*. Campinas: Ed. Arbor acres Farm. Inc., 1990. p.101-107.
- RICHARD, J.L. Aspergillosis. In: CALNEK, B.W. *Diseases of poultry*. Iowa: Iowa State University Press, 1997. p.351-360.
- SILVA, E.N. Biossegurança básica em incubatórios. In: INTERNATIONAL POULTRY CONSULTANTS. *Clínica de Incubação*. Brasília: IPC, 1996. p.1-5.
- TESSARI, E.N.C.; CARDOSO, A.L.S.P.; CASTRO, A.G.M.; KANASHIRO, A.M.I.; ZANATTA, G.F. Avaliação das condições sanitárias de incubatório de pintos de corte. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v.69, n.3, p.1-4, 2002.
- TRABULSI, L.R.; ALTHERTHUN, F.; GOMPERTZ, O.F.; CANDEIAS, J.A.N. *Microbiologia*. 3.ed. São Paulo: Atheneu, 1999. 586p.
- VILAR, E.A.; VILELA, S.M.O.; SAUKAS, T.N. Infecção de embriões de codornas (*Coturnix coturnix japonica*) por *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 1995, Campinas. *Anais*. Campinas: APINCO - Associação dos Produtores de Pintos de Corte, 1995. p.143-144.

Recebido em 21/11/07

Aceito em 5/6/09