

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA  
CAMPUS URUGUAIANA  
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR  
SUPERVISIONADO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

Orientadora: Profa. Débora da Cruz Payão Pellegrini

**Isis Burtet Jankus**

Uruguaiana, dezembro de 2015

**ISIS BURTET JANKUS**

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR SUPERVISIONADO EM  
MEDICINA VETERINÁRIA**

Relatório do Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária apresentado ao Curso de Medicina Veterinária, Campus Uruguaiana da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária.

Orientadora: Débora da Cruz Payão Pellegrini  
Médica Veterinária, Msc, Dra.

**Uruguaiana  
2015**

## **ISIS BURTET JANKUS**

Relatório do Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária apresentado ao curso de Medicina Veterinária, Campus Uruguaiana da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária.

Área de concentração: Sanidade de aves e suínos.

Relatório apresentado e defendido em 11 de dezembro de 2015.

---

Profa. Dra. Débora da Cruz Payão Pelegrini  
Orientadora

---

Prof. Msc. Carlos Alexandre Oelke  
Curso de medicina veterinária – UNIPAMPA

---

Profa. Dra. Irina Lubeck  
Curso de medicina veterinária - UNIPAMPA

Dedico esse trabalho a minha mãe, por todo apoio e dedicação para que eu pudesse enfim realizar esse grande sonho.

## **AGRADECIMENTOS**

A equipe do Laboratório de Saúde Animal, pelo aprendizado e convívio. Em especial a Anne Caroline de Lara, minha supervisora, que possibilitou essa oportunidade e a Taís Regina Michaelsen, por sua amizade, paciência e ensinamentos.

A professora Débora da Cruz Payão Pellegrini, por todas as horas dispensadas com sua orientação durante o período do estágio.

Aos Professores Tiago Gallina Corrêa, Mário Celso Sperotto Brum, Bruno Leite dos Anjos, e Irina Lubeck, pela inspiração através de seus exemplos e valores.

A professora Francielli Weber dos Santos Cibin por todo o apoio, dedicação e atenção.

Aos meus colegas do laboratório Biotech e do laboratório de DIC, por me ensinarem que vamos mais longe quando vamos juntos.

As minhas amigas e cúmplices Ana Paula Maurique e Eduarda Gabrielly, que sempre estiveram presentes, e que me apoiaram em todos os momentos.

As minhas amigas Andressa Silva Lachno, Bruna Dias Espindola e Ingryd Merchioratto pelo companheirismo, acolhimento e aventuras.

A todos os outros amigos e colegas que fizeram parte dessa jornada.

A minha tia Jô, que considero uma segunda mãe, por todos os cuidados dispensados durante a minha vida.

Ao meu irmão Odir, por sua amizade, apoio e compreensão em todos os momentos, sua colaboração foi essencial para a conclusão dessa etapa tão importante na minha vida.

A Francine, minha irmã de coração, por nunca deixar de acreditar na minha capacidade e sempre me presentear com palavras reconfortantes nos momentos mais difíceis.

A minha mãe, Odete, por todo o apoio e amor incondicional, por não me deixar desistir na primeira nem na milésima adversidade. Sem sua amizade e carinho eu não teria conseguido chegar até aqui. A você minha eterna gratidão.

O analfabeto do século XXI não será aquele que não consegue ler e escrever, mas aquele que não consegue aprender, desaprender, e reaprender.

Alvin Toffler

## **ESTÁGIO CURRICULAR SUPERVISIONADO EM MEDICINA VETERINÁRIA – ÁREA DE SANIDADE DE AVES E SUINOS**

O estágio curricular supervisionado em medicina veterinária foi realizado na área de sanidade de aves e suínos no Laboratório de Saúde Animal da JBS Foods, localizado na cidade de Seara/SC, acreditado pela norma ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005, no período de 17/08/15 a 02/12/15, totalizando 450 horas. O objetivo principal do estágio foi o diagnóstico de doenças de suínos através de ensaios microbiológicos e moleculares, a monitoria de enfermidades de interesse veterinário e de saúde pública através de ensaios sorológicos e moleculares, bem como a pesquisa pré-abate de *Salmonella* em aves. O estágio foi realizado sob a supervisão da Médica Veterinária Anne Caroline Lara, Gerente dos Laboratórios de Saúde Animal da JBS Foods e orientação da Profa. Débora Payão Pellegrini do curso de Medicina Veterinária da UNIPAMPA.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: <i>Salmonella</i> Enteritidis no ágar MSRV (motilidade positiva). Fonte: Regnum Prokaryotae, 2015.....	34
Figura 2: <i>Salmonella</i> Gallinarum no ágar MSRV (motilidade negativo). Fonte: Regnum Prokaryotae, 2015.....	34
Figura 3: Cultura de <i>Salmonella</i> Enteritidis em ágar Hektoen. Fonte: Biomedicina Padrão, 2011.....	35
Figura 4: Cultura de <i>Salmonella</i> sp. em ágar BPLS. Fonte: Global Salm-Surv, 2003.....	35
Figura 5: Imagem demonstrativa do meio IAL. Fonte: Biomedicina Brasil, 2011.....	37
Figura 6: Lista de sorotipos identificados através de sorotipificação molecular rápida. Fonte: Check&Trace, 2015.....	38
Figura 7: Diferença entre escores corporais em animais do mesmo lote, sugestivo de SRM – Fonte: a autora.....	44



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Carga horária dedicada a cada uma das atividades desenvolvidas durante o estágio.....	17
Tabela 2:	Sorovares de <i>Salmonella</i> isolados pelo laboratório de ornitopatologia da FMVZ – Unesp – Botucatu.....	51

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Agentes infecciosos identificados através do diagnóstico bacteriológico em suínos.....	24
Quadro 2: Monitorias sorológicas através de SAR realizadas pelo laboratório em aves.....	29
Quadro 3: Monitorias sorológicas através de ELISA realizadas pelo laboratório em aves.....	30
Quadro 4: Utilização de PCR em tempo real para a detecção de agentes infecciosos em suínos.....	32
Quadro 5: Utilização de PCR em tempo real para a detecção de agentes infecciosos em aves.....	32
Quadro 6: Caracterização antigênica de <i>Salmonella</i> sp.....	38
Quadro 7: Ação dos probióticos sobre <i>Salmonella</i> sp.....	53

## LISTA DE ABREVIATURAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ABPA	Associação Brasileira de Proteína Animal
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APPCC	Análise de perigos e pontos críticos de controle
APT	Água peptonada tamponada
BHI	Brain heart infusion
BPLS	Ágar verde brilhante de fenol lactose sacarose
BPP	Boas Práticas de Produção
CAMP	Christie, Atkins e Munch-Petersen
CEDISA	Centro de Diagnóstico de Sanidade Animal
CLSI	Clinical and Laboratory Standarts Institute
CO <sub>2</sub>	Gás carbônico ou dióxido de carbono
DIC	Doenças infectocontagiosas
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EC	European Community
ELISA	Ensaio imunoenzimático de absorção em fase sólida
EUA	Estados Unidos
FAO	Food and Agriculture Organization
FDA	Food and Drug Administration
FMVZ	Faculdade de medicina veterinária e zootecnia
HIS	Hibridização <i>in situ</i>
IAL	Instituto Adolfo Lutz
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IHQ	Imuno-histoquímica
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
ISO	International Organization for Standardization
JBS	José Batista Sobrinho
LIA	Ágar lisina-ferro
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MSRV	Modified semisolid rappaport vassiliadis
NAD	Nicotine adenine dinucleotide
NH <sub>3</sub>	Amônia
OMS	Organização Mundial da Saúde
ONU	Organização das Nações Unidas
PCA	Ágar padrão para contagem
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PCV2	Circovírus suíno tipo 2
PCVD	Doenças associadas ao circovírus suíno
pH	Potencial hidrogeniônico
PNSA	Programa Nacional de Sanidade Avícola
ppm	Partes por milhão
PPV	Parvovírus suíno
PR	Paraná
RNA	Ácido ribonucléico
RS	Rio Grande do Sul
SA	Sociedade Anônima
SAR	Soroaglutinação rápida
SC	Santa Catarina
SEM	Síndrome de refugagem multissistêmica
SIM	Motilidade indol sulfeto
SMD	Síndrome multissistêmica do definhamento
sp.	Espécie
spp.	Espécies
TNT	Tecido não tecido
TSI	Triple sugar iron
UFC	Unidades formadoras de colônias
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande de Sul
UFT	Universidade Federal do Tocantins
UPL	Unidade produtora de leitões
VP	Voges-Proskauer
WTF	Wean to finish

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	ATIVIDADES DESENVOLVIDAS.....	16
2.1	Histórico da empresa.....	16
2.2	Organização do laboratório de saúde animal.....	16
2.3	Recepção de amostras.....	18
2.4	Descontaminação, descarte, lavagem, preparo e esterilização.....	18
2.4.1	Preparo de materiais.....	19
2.4.2	Procedimentos para assegurar a qualidade do preparo dos materiais.....	20
2.5	Preparo de meios de cultura.....	21
2.6	Diagnóstico bacteriológico.....	22
2.6.1	Exame microscópico.....	22
2.6.2	Isolamento.....	22
2.6.3	Identificação bioquímica presuntiva.....	23
2.6.4	Agentes infecciosos identificados através do diagnóstico bacteriológico.....	23
2.6.4.1	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> .....	24
2.6.4.2	<i>Bordetella bronchiseptica</i> .....	24
2.6.4.3	<i>Clostridium perfringens</i> .....	25
2.6.4.4	<i>Escherichia coli</i> .....	25
2.6.4.5	<i>Haemophilus parasuis</i> .....	26
2.6.4.6	<i>Pasteurella multocida</i> .....	26
2.6.4.7	<i>Streptococcus suis</i> .....	26
2.6.5	Antibiograma.....	27
2.7	Ensaio sorológicos.....	28
2.7.1	Coleta de amostras.....	28
2.7.2	Soroaglutinação Rápida (SAR).....	29
2.7.3	Ensaio Imunoenzimático de Absorção em Fase Sólida (ELISA) .....	30
2.8	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	31
2.9	Pesquisa de <i>Salmonella</i> .....	32
2.9.1	Pré-enriquecimento.....	33
2.9.2	Enriquecimento seletivo.....	33

2.9.3	PCR em tempo real.....	34
2.9.4	Isolamento em meios seletivos indicadores.....	35
2.9.5	Identificação bioquímica presuntiva.....	36
2.9.6	Caracterização antigênica.....	37
2.9.7	Pesquisa de <i>Salmonella</i> em aves matrizes.....	39
2.9.8	Pesquisa de <i>Salmonella</i> em aves de corte.....	39
2.9.9	Pesquisa de <i>Salmonella</i> em incubatórios.....	40
2.10	Pesquisa de <i>Salmonella</i> em suínos.....	40
2.11	Atividades paralelas à rotina do laboratório.....	40
3	DISCUSSÃO.....	42
3.1	Doenças Associadas ao Circovirus suíno (PCVD).....	42
3.2	Importância do controle de <i>Salmonella</i> na cadeia produtiva de aves.....	47
4	CONCLUSÕES.....	55
	REFERÊNCIAS.....	56
	ANEXOS.....	63

## 1 INTRODUÇÃO

De acordo com o Relatório anual da Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA, 2015) o Brasil é o 3º maior produtor mundial de carne de frango (12,691 milhões de toneladas), sendo que a Região Sul (PR, SC e RS) é responsável por 75,01% de todas as exportações realizadas pelo país nesse período. Com relação a carne suína, o Brasil é o 4º maior produtor mundial (3,344 milhões de toneladas), sendo que a Região Sul é responsável por 76,59% de todas as exportações realizadas nesse período.

Em conjunto, as cadeias suinícola e avícola somam 4,155 milhões de empregos diretos e indiretos. Em 2013, as exportações de aves e suínos totalizaram cerca de US\$ 10 bilhões, o equivalente a 10% das exportações do agronegócio brasileiro e 4,1% das exportações totais do Brasil (ABPA, 2015).

Em novembro de 2015, 22 frigoríficos brasileiros foram habilitados para exportar carne para a China e o México. Destes, seis são frigoríficos localizados no estado de SC, dois exportarão carne de frango para a China e quatro exportarão carne suína para o México (AGROLINK, 2015).

A interação positiva e a tecnificação em todas as áreas envolvidas no setor produtivo são as responsáveis por esse volume de negócios tão expressivo. Tanto a indústria avícola quanto suinícola, investe cada vez mais em melhoramento genético, manejo e nutrição afim de melhorar seus índices de produtividade (CARDOSO; TESSARI, 2015). No entanto, esse rápido desenvolvimento impôs condições extremas a saúde animal, onde geralmente, associam-se criações com alta densidade animal em uma área geográfica bastante restrita (SESTI, 2005). Essa característica propicia a ocorrência de surtos pela maior facilidade na disseminação dos agentes patogênicos e é cada vez mais comum a associação com micro-organismos responsáveis por outras doenças, dificultando o diagnóstico, devido a apresentação clínica extremamente variável (BARCELLOS, et al. 2008).

Dentro desse contexto, para garantir que os índices de produção sejam mantidos e novas barreiras sanitárias sejam quebradas, faz-se necessário a implantação de medidas de controle sanitário específicas para cada uma das fases de criação, organizadas em um programa de biossegurança (BARCELLOS, et al. 2008).

Programas de biosseguridade caracterizam-se por um conjunto de normas e procedimentos que visam assegurar a saúde dos planteis em que são empregados, através da proteção contra a entrada de qualquer micro-organismo patogênico (ANDREATTI, 2006).

Para que um programa de biosseguridade seja eficiente é necessária a compreensão e a participação de todas as pessoas envolvidas. Controle de tráfego, isolamento dos núcleos, desinfecção, higienização, quarentena, vazão sanitário, vacinação, educação continuada, são algumas das etapas a serem implantadas dentro de um programa de biosseguridade (ANDREATTI, 2006).

O monitoramento periódico, bem como o diagnóstico definitivo rápido, direcionado a produção de animais saudáveis, capazes de gerar produtos seguros para o consumo, têm sido cada vez mais exigidos.

Diante disso, conhecer as particularidades de cada fase de criação para assim associar com as principais enfermidades endêmicas e exóticas que podem estar relacionadas ao quadro clínico, a obtenção e o envio correto das amostras, a escolha e a execução dos testes laboratoriais, o envio dos resultados e a interpretação dos mesmos, é de fundamental importância para o médico veterinário que atua nessa área.

O objetivo do estágio foi conhecer a gestão necessária para garantir a saúde animal em uma grande empresa, que fornece alimentos de origem animal, para diversos tipos de mercados consumidores e que segue rigorosamente, uma diversidade de especificações técnicas que garantem que o produto final tenha sua inocuidade garantida, com foco principal nas monitorias periódicas e no diagnóstico das principais enfermidades de impacto econômico e de saúde pública na produção de aves e suínos, relacionando o aprendizado teórico ao aprendizado prático, fundamental para a capacitação profissional na área escolhida.

Este relatório descreve as atividades acompanhadas e desenvolvidas durante o período de estágio curricular supervisionado obrigatório do curso de medicina veterinária na área de sanidade de aves e suínos, no Laboratório de Saúde Animal da JBS Foods, com o objetivo de cumprir o requisito parcial para obtenção de título em Bacharel em Medicina Veterinária.



## 2 ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

### 2.1 Histórico da Empresa

A Seara Alimentos S.A. foi fundada em 1956, na cidade que leva seu nome, em SC. No início da década de 80, a Ceval Alimentos S.A. adquiriu a empresa conservando sua marca e aumentando os investimentos. Em 1982, foi a primeira empresa brasileira a exportar cortes de frango para a Europa. Em 1996 obteve a certificação ISO 9002 para toda a cadeia produtiva de frango. No ano de 1997, a Bunge Internacional assumiu o controle da Ceval e deu início a uma nova organização. No ano seguinte, a empresa Seara S.A. tornou-se independente e focada no mercado de aves, suínos e carnes processadas. Em 1999 abriu escritórios comerciais em vários países, afim de estimular os negócios internacionais, e como consequência, no ano de 2003 já exportava para 27 países. Em 2005, passou a ser controlada pelo grupo Cargil e em 2013 pelo grupo JBS, líder mundial em processamento de carne bovina, ovina e de aves (SEARA, 2015).

### 2.2 Organização do Laboratório de Saúde Animal

O Laboratório de Saúde Animal realiza suas análises na planta do frigorífico de Seara, SC. As atividades realizadas contemplam tanto a cadeia suinícola quanto avícola.

As monitorias internas e acreditadas pelo INMETRO de pesquisa de *Salmonella* em aves constituem a principal atividade do laboratório. Além disso, efetua monitorias através de ensaios sorológicos e moleculares para o controle de enfermidades de importância econômica e de saúde pública e recentemente, começou a atuar na área de diagnóstico bacteriológico em suínos.

O laboratório é composto por uma equipe multiprofissional. Um auxiliar de laboratório é responsável pela limpeza, um realiza a lavagem, esterilização, preparo e envio de materiais para coleta de amostras, um é responsável pela preparação dos meios, reagentes e soluções, um recepciona, avalia e registra as amostras, três biólogos e um engenheiro de

alimentos realizam a pesquisa microbiológica, um zootecnista e um auxiliar de laboratório realizam os ensaios sorológicos, um biólogo efetua os ensaios moleculares, um médico veterinário realiza o diagnóstico microbiológico específico em suínos, um farmacêutico efetua a análise de resíduos por cromatografia líquida (em fase de implantação), dois administradores organizam a emissão dos documentos e relatórios, dois médicos veterinários supervisionam e coordenam a equipe.

São efetuados treinamentos internos com o objetivo de capacitar os empregados a atuar em funções diferentes daquelas em que são os responsáveis, para que dessa maneira, sempre que necessário, um setor colabore com o outro, tornando a rotina do laboratório muito dinâmica. A frequência dos treinamentos varia de acordo com a modificação ou emissão dos documentos técnicos que regem as atividades desenvolvidas e sempre que um novo membro é integrado a equipe do trabalho.

Devido às normas da empresa, o estagiário assinou um termo de sigilo e confidencialidade. O uso de mídias eletrônicas (registro de imagens), bem como a divulgação de informações relevantes e documentos internos sem prévia autorização, é proibido para qualquer visitante.

Para melhor compreensão do tempo dedicado a cada atividade, abaixo foi organizado na tabela 1 a quantidade de tempo aproximado, dedicado a cada uma das atividades durante o estágio.

TABELA 1- Carga horária dedicada a cada uma das atividades desenvolvidas durante o estágio

Atividades	Carga horária (horas)	Porcentagem (%)
Recepção e triagem das amostras	20	4,44
Lavagem, esterilização e preparo de materiais	20	4,44
Preparo de meios, soluções e reagentes	20	4,44
Ensaio sorológicos	20	4,44
Ensaio moleculares	40	8,9
Diagnóstico microbiológico	180	40
Pesquisa de <i>Salmonella</i>	90	20
Atividades paralelas a rotina do laboratório	60	13,34
Total de horas	450	100

### **2.3 Recepção de amostras**

O objetivo da recepção de amostras é fazer a triagem de todas as amostras que chegam ao laboratório verificando se estão em condições de serem encaminhadas para análise. As amostras são registradas no livro ata de registros de amostras. As amostras devem chegar em embalagem íntegra e identificada. A inspeção é efetuada tanto nas embalagens quanto nas amostras para detectar possíveis danos que possam causar contaminação cruzada.

Quando a amostra é rejeitada por problemas de acondicionamento, é também registrada no livro de protocolo de amostras e em planilha própria, descrevendo o ocorrido e as ações tomadas.

As amostras são registradas no livro ata de registros e recebem uma identificação. Em cada registro é preenchido o número do protocolo, a data do recebimento, a procedência, o tipo de material, o número de amostras, o responsável pelo registro, o exame solicitado e se necessário, outros dados.

Para o envio de material para laboratórios externos todas as amostras são protocoladas e registradas em uma planilha de solicitação de análise laboratorial ou planilha específica do laboratório externo.

As amostras recebidas e registradas são conservadas em geladeira entre 2 e 8 °C até o momento da análise ou envio a laboratórios externos, excetuando-se, as amostras fixadas em formol.

### **2.4 Descontaminação, descarte de materiais biológicos, lavagem, preparo, esterilização e verificação de materiais**

O fornecimento de resultados de análises confiáveis depende da lavagem e preparo das vidrarias e demais materiais, seguidos de esterilização. Por esse motivo, os procedimentos realizados no laboratório de saúde animal são rigorosamente seguidos e estão de acordo com as normas ISO 7218/2007 (Exigências gerais e orientações para análises microbiológicas).

A descontaminação dos materiais utilizados nas análises é efetuada através da esterilização em autoclave a  $121 \pm 3$  °C (aproximadamente  $1,1 \text{ kgf/cm}^2$ ) por 30 minutos. Todos os resíduos decorrentes da descontaminação são descartados em sacos plásticos resistentes e

colocados em lixo apropriado. Em hipótese alguma é descartado material contaminado, sem prévia descontaminação.

#### **2.4.1 Preparo de materiais**

O preparo do material de laboratório para utilização em análises microbiológicas envolve todas as atividades necessárias para garantir que os utensílios, vidrarias, frascos e instrumentos utilizados durante as análises se encontrem limpos, estéreis e livres de resíduos. O preparo de materiais para a realização de análises varia de acordo com cada tipo de material.

Os suabes de arrasto podem ser obtidos a partir da esterilização em um recipiente de toucas de tecido não tecido (TNT) que são distribuídas com o auxílio de uma pinça em pares em sacos estéreis e posteriormente são embebidas com água peptonada tamponada (APT), ou, pode optar-se por embeber o par de toucas de TNT em APT 1% e distribuir em embalagem plástica para alimento, remover o ar, fechar as embalagens e esterilizar em autoclave.

As gazes úmidas (chiffonettes) podem ser confeccionadas com panos ou esponjas. Estas são esterilizadas em autoclave e após são transferidas individualmente para uma embalagem estéril e embebidas em solução de APT 1%. Se na superfície for utilizado desinfetante, a solução utilizada é a de rinsagem inativadora ou neutralizante (*letheen broth base*).

As gazes com barbante são esterilizadas juntas em um recipiente e após são distribuídas em embalagens plásticas estéreis, aos pares, com o auxílio de uma pinça. A seguir, são embebidas com APT 1%.

Após o preparo dos suabes de arrasto, chiffonettes, e gazes com barbantes, estes são mantidos em refrigeração em temperatura entre 2 e 8 °C com validade de 3 meses. Além disso, são submetidos a uma avaliação de esterilidade, onde separa-se pelo menos um exemplar de cada tipo após a confecção, acrescenta 50 mL de APT, homogênea, incuba a 36 °C por 18 a 24 horas e observa se há ou não turvação. Se houver turvação, é repicado em ágar sangue, ágar nutriente ou ágar padrão para contagem (PCA) e para identificação das bactérias. Como padrão para utilização, não deve ocorrer crescimento nos meios, nem turvação. Caso houver crescimento, o lote é descartado.

Os microtubos são acondicionados em um recipiente grande, em seguida adiciona-se 20 mL de silicone dentro desse recipiente para cada 1000 microtubos, com o auxílio de uma tampa, os microtubos são agitados e o silicone é espalhado por todos eles igualmente. Após isso, para secagem, os tubos são colocados em estufa a aproximadamente 42 °C por 8 horas.

Os frascos para coleta de água são adquiridos prontos, com a pastilha de tiosulfato de sódio, indicadas para análises microbiológicas. Para as análises de cloro, essas pastilhas devem ser removidas sem perder a esterilidade dos tubos.

Para realizar a rastreabilidade dos materiais, são preenchidas planilhas que indicam o responsável pelo procedimento, o dia da esterilização, a validade e o número do lote. Essas informações também são colocadas em todos os materiais, por meio de carimbos e tarjas. A validade da esterilização é de 90 dias.

#### **2.4.2 Procedimentos para assegurar a qualidade do preparo dos materiais**

São realizadas algumas verificações durante os procedimentos descritos anteriormente afim de assegurar a qualidade de todo o processo de preparação de materiais, que consistem em mensuração do pH após processo de lavagem de vidrarias, adição de ampolas que indicam se o material esterilizado foi submetido a temperatura requerida e a utilização de fitas de autoclave.

A mensuração do pH é efetuada através da adição de algumas gotas de solução de azul de bromotimol 0,04%, em alguns frascos submetidos ao processo de lavagem e enxague, observando a cor formada. Em pH neutro a solução mantém-se verde, indicando que a lavagem e enxagues foram eficientes. Em condições ácidas (pH 6,5 ou menor) a cor torna-se amarela e em condições alcalinas (pH 7,3 ou maior) azul. Essa verificação é efetuada uma vez por semana e sempre que mudar o lote do detergente.

O teste biológico utilizado é o Sterikon®, que consiste em ampolas com esporos de *Bacillus stearothermophilus* (não patogênico). Esses esporos somente são destruídos se submetidos a uma temperatura de 121 °C ± 3 °C (1,1 kgf/cm<sup>2</sup>). Essas ampolas são colocadas em todas as autoclaves, junto ao material que será esterilizado ou descontaminado. Após o tratamento em autoclave, elas são então incubadas em banho-maria a 60 ± 2 °C por ± 48 horas (é incubada em paralelo uma ampola controle que não sofreu autoclavação). Se a descontaminação ou esterilização foi eficiente o conteúdo da ampola permanecerá inalterado

(cor violeta), indicando que o *Bacillus stearothermophilus* não resistiu a autoclavação. Se a descontaminação ou esterilização foi ineficiente o conteúdo da ampola estará alterado (cor amarela ou laranja) indicando que o *Bacillus stearothermophilus* resistiu a autoclavação.

Além disso, é efetuado um controle através de fitas de autoclave (3M 1222®), que são tiras de papel impregnadas com tinta termocrômica que muda de coloração quando exposta as condições mínimas necessárias ao processo de esterilização a vapor. Essas fitas permitem identificar e lacrar o material que será autoclavado. O aparecimento da cor no dorso da fita indica que o material passou pelo processo de autoclavação.

## 2.5 Preparo de meios de cultura

Os meios de cultura e reagentes para análises requerem uma avaliação para verificar se atendem aos requerimentos mínimos necessários que assegurem sua qualidade. Por isso, avaliações antes do uso são necessárias para verificar se estes produtos estão adequados com a finalidade do seu uso.

O desempenho e a transparência de um meio de cultura pronto são, na maioria das vezes, determinado pelo processo e cuidados empregados na dissolução do meio de cultura desidratado.

Os meios de cultura passam pelos testes de produtividade, seletividade, especificidade, condição da embalagem, esterilidade, controle positivo e negativo, qualidade física e visual, contaminação microbiana, entre outras avaliações requeridas individualmente.

De maneira geral, a preparação de meios consiste na pesagem e reidratação do meio com água purificada (conforme orientações do fabricante), dissolução por agitação contínua, medição e ajuste de pH, distribuição em recipientes apropriados (geralmente balões volumétricos ou erlenmeyers) e esterilização em autoclave (15 minutos a  $121 \pm 3$  °C).

Após a esterilização uma nova avaliação é efetuada, verificando pH, cor, esterilidade e consistência física. Em seguida aguarda-se o resfriamento até atingir uma temperatura entre 45 a 50 °C para verter os meios em placas de petri estéreis em capelas de fluxo laminar. Após o ágar solidificar, se for o caso, armazena-se em câmara fria entre 3 e 5 °C. Alguns tipos de meios, possuem características diferentes tanto de preparo, quanto de armazenamento.

Todos os lotes de meios preparados são submetidos ao teste de esterilidade, que consiste na incubação de pelo menos uma placa ou tubo em estufa a 37 °C por 24 a 48h.

## **2.6 Diagnóstico bacteriológico**

O diagnóstico bacteriológico inicia com o recebimento das amostras, que são coletadas pelos médicos veterinários ou técnicos agrícolas da empresa nas granjas dos produtores integrados. A coleta deve ser feita de maneira asséptica, imediatamente após a morte, ou o mais rápido possível. O processamento de cada material varia de acordo com o diagnóstico presuntivo, elaborado com base na associação entre os sinais clínicos, histórico da propriedade e dados epidemiológicos.

Os protocolos para isolamento e identificação bioquímica presuntiva são baseados em documentos internos da empresa que foram elaborados de acordo com o Manual de detecção e identificação de bactérias de importância médica (ANVISA, 2004) e Microbiologia veterinária e doenças infecciosas (QUINN, et al. 2005).

De maneira geral, os materiais que são utilizados como pinças, tesouras, espátulas são mergulhados em álcool 92% e flambados a cada coleta. O acondicionamento das amostras é efetuado em embalagens estéreis sob refrigeração, de acordo com a característica do micro-organismo alvo e conforme o exame a ser realizado.

### **2.6.1 Exame microscópico**

O exame microscópico é um teste rápido que pode auxiliar no diagnóstico presuntivo de determinadas doenças. A coloração usada no laboratório é a de Gram, mas também são bastante comuns, as colorações de Giemsa e Azul de Metileno.

### **2.6.2 Isolamento**

O isolamento é a transferência do micro-organismo do meio natural para um meio artificial e a propagação deste para a obtenção de uma cultura pura (QUINN, et al. 2005). Quando os suínos ou as aves apresentam lesões primárias, é realizado o isolamento diretamente em placas com meios de cultura, em razão de grandes quantidades de bactérias.

Sangue, órgãos, exsudatos, entre outros, são repicados diretamente no meio de cultura a partir de suabes (CRITTER, et al. 2006).

Para realizar o isolamento de bactérias aeróbias são utilizados com maior frequência no laboratório, o ágar sangue e o ágar macconkey. O ágar sangue é o meio padrão para micro-organismos aeróbios, enquanto o ágar macconkey determina a presença de micro-organismos entéricos (HIRSH; ZEE; CASTRO, 2012). Após, as placas são incubadas por 18 a 48 horas, entre 35 e 37 °C, em aerobiose.

Algumas bactérias possuem particularidades e necessitam meios de cultura seletivos ou enriquecidos e condições de incubação diferenciais, com tempo e temperatura adequados. Existem ainda, micro-organismos que necessitam da adição de suplementos no meio de cultura, como por exemplo, o fator V (*nicotine adenine dinucleotide* – NAD), fornecido pelo *Staphylococcus aureus*, estriado perpendicularmente ao inóculo, por exemplo.

### **2.6.3 Identificação bioquímica presuntiva**

Algumas bactérias podem ser identificadas presuntivamente através de suas características de crescimento e aparência. Por esse motivo, as colônias que crescem nos meios de cultura são avaliadas quanto ao formato, coloração, produção de hemólise, número de colônias e características de crescimento. As características de coloração, realizadas pelo método de Gram, e as formas dos micro-organismos são revelados por microscopia. No entanto, o diagnóstico definitivo depende da avaliação das características bioquímicas e sorológicas para a grande maioria das cepas ou micro-organismos.

Os testes bioquímicos são realizados através da inoculação de colônias isoladas em meios bioquímicos diferentes. Com base em suas características é possível determinar qual o micro-organismo envolvido.

### **2.6.4 Agentes infecciosos identificados através do diagnóstico bacteriológico**

No quadro 1 é possível verificar os micro-organismos isolados durante o acompanhamento das atividades no setor de diagnóstico bacteriológico.



A publicação de dados referentes a quantidade e a frequência desses isolamentos não foi autorizada.

QUADRO 1 - Agentes infecciosos identificados através do diagnóstico bacteriológico em suínos

Agente infeccioso	Consequências da infecção
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	Pleuropneumonia suína
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	Bordetelose pulmonar; Rinite atrófica
<i>Clostridium perfringens</i>	Tipo A: enterocolite necrosante. Tipo C: enterite hemorrágica
<i>Escherichia coli</i>	Colibacilose neonatal; Diarreia pós-demame; Doença do Edema
<i>Haemophilus parasuis</i>	Doença de Glässer
<i>Pasteurella multocida</i>	Pneumonia; Rinite atrófica
<i>Streptococcus suis</i>	Meningite; septicemia; artrite

#### 2.6.4.1 *Actinobacillus pleuropneumoniae*

São bacilos ou cocobacilos Gram-negativos, imóveis e anaeróbios facultativos, que não formam esporos. Promovem hemólise em ágar sangue, não crescem em ágar macconkey. O isolamento inicial de *Actinobacillus pleuropneumoniae* é efetuado em ágar sangue a 37 °C, em jarra de anaerobiose por 48 a 72 horas. As colônias formadas são pequenas (1 mm), brancas, lisas, rodeadas por zona clara de hemólise. O teste de Christie, Atkins e Munch-Petersen (CAMP) com *Staphylococcus aureus* é positivo. Bioquimicamente é urease positivo, catalase e oxidase variável, capaz de fermentar glicose, manitol, xilose e sacarose. Em função dos seus requerimentos de NAD se classifica em dois biotipos, o biotipo 1 agrupa as cepas dependentes do fator V (NAD) e o biotipo 2 agrupa as cepas NAD-independentes.

#### 2.6.4.2 *Bordetella bronchiseptica*

São bacilos ou cocobacilos Gram-negativos pequenos (0,2 a 0,5 x 0,5 a 1,5 µm), aeróbios, catalase, oxidase e urease positivos, utilizam carbono a partir do citrato, reduz

nitrito, são móveis por flagelos peritríquios, não fermentam carboidratos e não necessitam de requerimento especial para crescimento. O isolamento inicial de *Bordetella bronchiseptica* é efetuado em ágar sangue e ágar macconkey a 37 °C por 24 a 48 horas em aerobiose. Em ágar sangue, as colônias são pequenas, brancas, lisas e hemolíticas. Em ágar macconkey formam colônias claras, não fermentadoras de lactose.

#### **2.6.4.3 *Clostridium perfringens***

São bacilos Gram-positivos grandes, imóveis, produzem endósporos, são anaeróbios, catalase e oxidase negativos. Em ágar sangue, as colônias são rodeadas por zona de dupla hemólise. Necessitam meios enriquecidos para crescimento. Os requerimentos atmosféricos apropriados são fornecidos pela cultura em jarras de anaerobiose com geradores de anaerobiose. A incubação é feita a 42 °C por 18 a 24 horas. As colônias apresentam coloração negra. Esfregaços diretos da mucosa ou de conteúdo intestinal que apresentam um grande número de bacilos Gram-positivos podem ser indicativos de enterotoxemia por clostrídios. Fermentam glicose, lactose, maltose e sacarose.

#### **2.6.4.4 *Escherichia coli***

São bacilos Gram-negativos, anaeróbios facultativos que não formam esporos, geralmente móveis, com flagelos peritríquios e fimbrias. O isolamento inicial é efetuado em ágar sangue e ágar macconkey com incubação a 37 °C por 18 a 48 horas. Em ágar sangue formam colônias cinza, com hemólise variável. No ágar macconkey, formam colônias rosa, devido à produção de ácido a partir da lactose. Bioquimicamente são catalase positivos, oxidase negativos, fermentam glicose, maltose e lactose. Reduzem nitrito a nitrito. Quando inoculado em ágar *triple sugar iron* (TSI), que contém 0,1% de glicose, 1% de lactose, 1% de sacarose e indicadores químicos para a produção de H<sub>2</sub>S, apresentam coloração amarela na base e no ápice (pH ácido) sem a produção de H<sub>2</sub>S.

#### **2.6.4.5 *Haemophilus parasuis***

São bacilos Gram-negativos pequenos e móveis, anaeróbios facultativos, fastidiosos e que requerem o fator V (NAD) para crescimento. O crescimento ótimo ocorre em ágar sangue com inoculação de uma estria de *Staphylococcus aureus*, em jarra de anaerobiose a 37 °C por 24 a 48 horas. As colônias formadas em ágar sangue, são brancas, lisas, pequenas (1 mm), não hemolíticas, com satelitismo positivo. Bioquimicamente fermentam glicose e sacarose, são catalase positivos e oxidase negativos.

#### **2.6.4.6 *Pasteurella multocida***

São Bacilos Gram-negativos, imóveis, anaeróbios facultativos. O isolamento inicial é efetuado em ágar sangue e ágar macconkey, com incubação a 37°C por 18 a 48 horas. Em ágar sangue formam colônias não-hemolíticas, cinzas, redondas, mucóides, brilhantes e com odor característico. Não crescem em ágar macconkey. Bioquimicamente são catalase e oxidase positivos, produzem indol, fermentam sacarose. A classificação com base nos antígenos capsulares A e D é efetuada através do teste da acriflavina neutra 1:1000 para a caracterização das cepas tipo D e o teste da hialuronidase para a identificação das cepas tipo A.

#### **2.6.4.7 *Streptococcus suis***

São cocos Gram-positivos, em duplas. O isolamento inicial é efetuado em ágar sangue e ágar macconkey com incubação a 37 °C por 18 a 48 horas. No ágar sangue formam colônias pequenas, cinzas, esverdeadas,  $\alpha$ -hemolíticas. Não crescem em ágar macconkey. Bioquimicamente são catalase negativos, produzem amilase e o teste de Voges-Proskauer (VP) é negativo.

### 2.6.5 Antibiograma

Com o isolamento e identificação bioquímica do micro-organismo, é possível efetuar o antibiograma, que é o teste de susceptibilidade *in vitro* do patógeno frente aos antimicrobianos. O método utilizado pelo laboratório é o teste de difusão em disco de *Kirby & Bauer*, conforme padronização técnica *The Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2013).

O procedimento consiste no preparo de uma suspensão bacteriana e inoculação desta na superfície de uma placa de ágar Mueller Hinton, utilizando um suabe estéril e a adição de discos de papel impregnados com antimicrobianos em concentrações padronizadas. Após a incubação em estufa, é analisada a inibição ao redor de cada disco através de medição do tamanho dos halos e o resultado é pesquisado em tabelas apropriadas.

As amostras devem ser compostas de colônias puras de bactérias gram-positivas ou gram-negativas, provenientes de cultivo bacteriano recente (18 a 24 horas), isoladas a partir de meios de cultura não seletivos.

Com alça estéril, seleciona-se entre três e cinco colônias, isoladas, do mesmo tipo morfológico e as suspende em solução salina estéril (NaCl 0,85%) até a obtenção de uma turvação compatível com o grau 0,5 da escala de Mac Farland ( $1 \times 10^6$  UFC/mL). Um suabe estéril é então embebido na suspensão bacteriana, e semeado em toda a extensão da placa, procurando abranger toda a superfície.

Após aguardar a superfície do ágar secar, os discos são colocados na superfície do meio inoculado com o auxílio de uma pinça estéril, exercendo uma pressão com a ponta da pinça para uma boa adesão. Em placas com tamanho de 90 x 15 mm são colocados até cinco discos, enquanto placas com tamanho de 140 x 15 mm são colocados até 12 discos. Em seguida a placa é incubada a 37 °C por 18 a 24 horas.

Com o auxílio de uma régua, o diâmetro dos halos inibitórios é medido em cada disco e então é possível determinar se a bactéria em análise é sensível, intermediária ou resistente ao antimicrobiano testado.

Como padrão, o laboratório associa o diagnóstico microbiológico a, pelo menos mais um tipo de diagnóstico antes da emissão do laudo técnico. Em geral, o diagnóstico microbiológico é associado ao histopatológico, efetuado por um laboratório terceirizado.

## 2.7 Ensaios sorológicos

A sorologia é uma ferramenta de grande importância no monitoramento sanitário tanto na indústria avícola quanto suínica, uma vez que possibilita o diagnóstico de doenças e a monitoração de lotes por meio de provas sorológicas.

Quando ocorre a exposição a antígenos são produzidos anticorpos específicos para o mesmo. As análises sorológicas detectam essa resposta específica do hospedeiro por mensuração dos complexos antígeno-anticorpo por meio do soro. As provas sorológicas podem medir reações com dois tipos de imunoglobulinas, a G (IgG) e a M (IgM), dependendo de qual etapa da resposta imune estiver ocorrendo no momento da coleta da amostra; a produção de IgM se dá na primeira etapa da resposta imune e é seguida por elevação nos níveis de IgG.

Cada procedimento sorológico é mais eficiente na detecção de um tipo de imunoglobulina e, portanto, esse fato deve ser considerado quando se opta pelo exame em diferentes fases (início de surtos, após surtos e após vacinações).

Alguns testes sorológicos apresentam o resultado apenas como positivo ou negativo para exposição de antígeno, enquanto outros resultam em títulos de anticorpos.

### 2.7.1 Coleta de amostras

A realização de testes sorológicos com resultados confiáveis não depende apenas dos procedimentos sorológicos, é necessário que as amostras sejam suficientes e se apresentem em condições adequadas para análise.

O sangue das aves pode ser coletado do coração, por punção cardíaca, das veias jugular e braquial. O sangue de suínos pode ser coletado das veias jugular, cava cranial, cefálica, vasos da cauda e da orelha e seio orbital.

Após a coleta, o sangue é colocado em tubos de plástico estéreis tratados com silicone. Esses tubos permanecem em posição horizontal ou inclinados para que ocorra a coagulação, a temperatura ambiente até dessorar adequadamente, posteriormente, o sangue é refrigerado (4-8 °C). A quantidade mínima de soro a ser coletado é de 1 mL.

Os métodos sorológicos utilizados na rotina do laboratório são: Soroaglutinação Rápida (SAR) e Ensaio Imunoenzimático de Absorção em Fase Sólida (ELISA).

### 2.7.2 Soroaglutinação Rápida (SAR)

O teste de soroaglutinação rápida é utilizado como teste de triagem para *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae* e *Salmonella Pullorum* obedecendo às diretrizes do Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA).

Nessa prova é misturado o soro ao antígeno, corado para facilitar a visualização, e observa-se a formação de grumos. A aglutinação demonstra a presença de anticorpos específicos para o antígeno utilizado.

Esse exame exige testes confirmatórios, pois pode gerar reações falsos-positivas e falsos-negativas por ser de especificidade variável. Para reduzir a incidência de resultados duvidosos, são usadas somente amostras frescas ou resfriadas, pois o congelamento aumenta a chance de reações falsos-positivas e falsos-negativas.

Durante a rotina, se a primeira prova for positiva, procede-se então a diluição do soro em solução salina 0,85% na proporção de 1:10 (exceto para *Salmonella Pullorum*) e é efetuada uma nova prova. Se o resultado for positivo novamente, a amostra é então encaminhada para a realização de ELISA. No quadro 2 é possível verificar a periodicidade com que o ensaio de SAR é efetuado.

QUADRO 2 - Monitorias sorológicas através de SAR realizadas pelo laboratório em aves

Aves	Agente	Periodicidade
Matrizes	<i>Mycoplasma gallisepticum</i>	15, 30, 42, 54 e 65 semanas
	<i>Mycoplasma synoviae</i>	15, 30, 42, 54 e 65 semanas
	<i>Salmonella Pullorum</i>	8 a 12 semanas, antes de vacinar contra <i>S. Enteritidis</i> pelo laboratório credenciado ao MAPA
Progênes de terceiros	<i>Mycoplasma gallisepticum</i>	Todos os lotes recebidos

### 2.7.3 Ensaio Imunoenzimático de Absorção em Fase Sólida (ELISA)

O ELISA é uma prova de imunoenensaio enzimático que mensura a reação antígeno-anticorpo, detectando principalmente as imunoglobulinas IgG e IgM (QUINN, et al. 2005).

Essa técnica é uma das mais usadas atualmente para medir os níveis de anticorpos em lotes de aves. Apresenta vantagens como especificidade e sensibilidade, sendo possível detectar níveis mínimos de anticorpos e titular anticorpos contra uma variedade de agentes patogênicos (UFRGS, 2015).

O ELISA pode ser direto ou indireto. O direto detecta antígenos, enquanto o indireto detecta anticorpos. No laboratório, é utilizado principalmente o ELISA indireto, onde o soro diluído é incubado em um orifício impregnado com o antígeno desejado em microplacas de 96 poços. Dessa forma, os anticorpos específicos, formam um complexo antígeno-anticorpo, que continuam aderidos as placas mesmo após a lavagem. Após a lavagem da placa, um conjugado de enzima e antiglobulina é adicionado, ligando-se a todos os complexos antígeno-anticorpo presentes na placa. No passo final do ensaio, o conjugado não aderido é retirado pela lavagem e um substrato cromogênico é adicionado ao orifício. Esse substrato reage com a enzima do conjugado ocorrendo o desenvolvimento de uma cor, que varia de acordo com a quantidade de anticorpos presentes no soro, sendo a cor mais intensa quanto maior a quantidade de complexos antígeno-anticorpo-conjugado. A densidade da cor é então mensurada por um fotolorímetro ou por espectrofotometria. Os resultados são expressos em título de anticorpos e geralmente como média aritmética ou geométrica (UFT, 2015). No quadro 3 estão listadas as monitorias sorológicas efetuadas no laboratório através de ELISA.

QUADRO 3 - Monitorias sorológicas através de ELISA realizadas pelo laboratório em aves

Objetivo	Agente infeccioso	Periodicidade
Imunidade Vacinal	Vírus Doença de Newcastle	15 e 48 semanas
	Pneumovirus aviário	25, 36 e 48 semanas
	Vírus da Doença Infecciosa da Bursa de Fabricio	15, 25, 36, 48 e 60 semanas
	Vírus da Bronquite Infecciosa	15, 25, 36, 48 e 60 semanas
	Vírus da Anemia Infecciosa	18 semanas
	Vírus da Encefalomielite Aviária	18 semanas
Abate	Vírus Doença de Newcastle	12 lotes anualmente

## 2.8 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

O PCR é um método de diagnóstico que detecta o material genético de um patógeno, a partir de uma amostra. Para a realização desse ensaio, é necessário o uso de fragmentos de nucleotídeos curtos, denominados, *primers*, que são complementares ao DNA buscado, a DNA polimerase (enzima Taq) e desoxirribunocleotídeos precursores. Divide-se em 3 etapas, a extração, a amplificação e a detecção do DNA. No laboratório, são utilizados 3 métodos para a extração do material genético: tecnologia baseada em sílica, método das colunas e separação magnética (em fase de implantação). Inicialmente a amostra é submetida a ciclos de aquecimento para a separação das fitas de DNA, que permite o anelamento dos *primers*, esses têm a função de sinalizar a região do DNA a ser ampliada e a síntese do DNA. Os vírus RNA, necessitam uma etapa complementar ao PCR convencional, que é o uso da transcriptase reversa (RT-PCR), que permite a produção de uma cópia de DNA a partir do RNA (WINN, et al. 2010).

Os produtos do PCR podem ser avaliados pela eletroforese horizontal em gel de agarose. Na eletroforese, pode-se obter o peso molecular das bandas e comparar com os controles positivos. A eletroforese horizontal em gel de agarose é utilizada no laboratório para a detecção de cepas patogênicas de *Escherichia coli*, isoladas através do diagnóstico microbiológico, onde é possível verificar a presença de genes fimbriais (K88, K99, 987P, F18 e F41) e toxinas (LT, Stb, StaP, Stx2e).

O PCR em tempo real diferencia-se do convencional por ser capaz de detectar o material genético ao longo dos ciclos de amplificações através de sistemas fluorescentes (WINN, et al. 2010). No laboratório é utilizado para o monitoramento e também para a detecção de vários agentes patogênicos de interesse veterinário e de saúde pública. Nos quadros 4 e 5 estão listados os agentes infecciosos identificados por PCR em tempo real em suínos e aves, respectivamente.



QUADRO 4 - Utilização de PCR em tempo real para a detecção de agentes infecciosos em suínos

Agente Infecioso	Enfermidade	Objetivo
<i>Brachyspira hyodysenteriae</i>	Disenteria suína	Diagnóstico
<i>Lawsonia intracellularis</i>	Enteropatia proliferativa suína	Diagnóstico
<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	Pneumonia enzoótica	Diagnóstico
<i>Haemophilus parasuis</i>	Doença de Glässer	Diagnóstico
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	Pleuropneumonia suína	Diagnóstico

QUADRO 5 - Utilização de PCR em tempo real para a detecção de agentes infecciosos em aves

Agente infeccioso	Enfermidade	Objetivo
<i>Mycoplasma gallisepticum</i>	Micoplasmose aviária	Monitoria
<i>Mycoplasma sinoviae</i>	Micoplasmose aviária	Monitoria
IBV	Bronquite Infecciosa das Galinhas	Monitoria

## 2.9 Pesquisa de *Salmonella*

O isolamento de *Salmonella* envolve etapas adicionais as técnicas de cultura convencionais, envolvendo as etapas de pré-enriquecimento, enriquecimento seletivo e isolamento em meios seletivos – indicadores e ainda a caracterização antigênica.

Os monitoramentos internos seguem uma sequência diferente das monitorias oficiais realizadas de acordo com a portaria 126/1995 - Normas de Credenciamento e Monitoramento de Laboratórios de Diagnóstico das Salmoneloses Aviárias (*Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Gallinarum, *Salmonella* Pullorum e *Salmonella* Typhimurium).

A pesquisa de *Salmonella* no laboratório de saúde animal é realizada através de uma adaptação da metodologia proposta pela *Food and Drugs Administration* (FDA - 2014).

### 2.9.1 Pré-enriquecimento

O objetivo do pré-enriquecimento é diminuir a injúria nas células de *Salmonella* deixando-as em uma condição fisiológica estável, sem inativá-las biologicamente e inicia a partir da hidratação da amostra em água peptonada tamponada a 1% ou caldo *brain heart infusion* (BHI) na proporção de 1:10 (LAZARO et. al., 2008).

Orgãos, gemas e mecônios são hidratados com caldo BHI, enquanto outros materiais como propés, rações e chifonetes, são hidratados com água peptonada. Após a hidratação, as amostras são incubadas a  $36\pm 1^\circ\text{C}$  por 18 a 24 horas.

### 2.9.2 Enriquecimento seletivo

Após diminuir o estresse das células, a segunda etapa visa selecionar as salmonelas, aumentando sua concentração continuamente e restringindo a proliferação de outras bactérias através de agentes inibitórios adicionados aos meios de cultura seletivos (LAZARO et. al., 2008).

Os meios de cultura utilizados são, o caldo *rappaport vassiliadis*, o caldo tetrionato e o meio *modified semisolid rappaport vassiliadis* (MSRV). Ambos possuem constituintes que estimulam a seletividade da microbiota acompanhante e o crescimento de *Salmonella*.

O caldo tetrionato inibe a multiplicação de coliformes. Sorovares de *Salmonella* (exceto *Choleraesuis*, *Typhis*, *Gallinarum* e *Pullorum*) possuem a enzima tetrionato redutase e, conseqüentemente são capazes de multiplicar-se no meio (LAZARO et. al., 2008).

O caldo *Rappaport Vassiliadis* contém cloreto de magnésio e verde de malaquita e inibe totalmente o crescimento de micro-organismos competitivos (LAZARO et. al., 2008).

O meio MRSV detecta sorotipos de *Salmonella* dotados de flagelos, que conferem motilidade ao micro-organismo, resultando num crescimento característico e de fácil visualização (FRANCHIN, 2008). No enriquecimento seletivo a incubação passa a ser a  $42^\circ\text{C}$  por 18 a 24 horas. Na figura 1 é possível verificar a presença de halo característico de micro-organismos com motilidade, enquanto na figura 2 é possível verificar que o crescimento ocorreu apenas na área de inoculação.

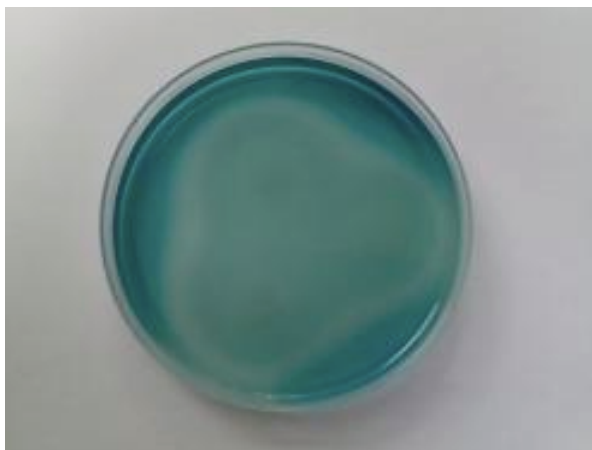


FIGURA 1 – *Salmonella* Enteritidis no ágar MSR (motilidade positiva). Fonte: Regnum Prokaryotae, 2015.

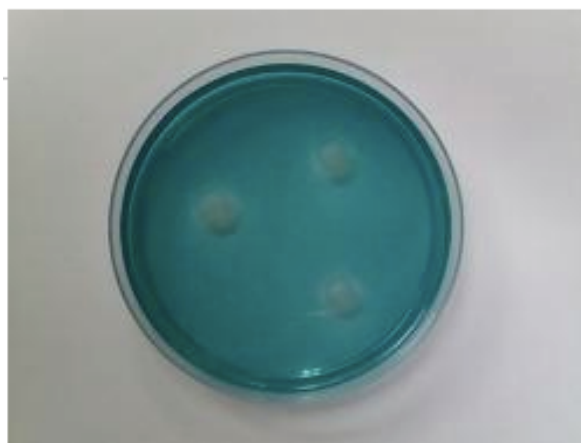


FIGURA 2 – *Salmonella* Gallinarum no ágar MSR (motilidade negativa). Fonte: Regnum Prokaryotae, 2015.

### 2.9.3 PCR em tempo real

Em paralelo as etapas de pré-enriquecimento e enriquecimento seletivo, as amostras de monitoramento interno são submetidas a PCR em tempo real. Amostras de frangos de corte são submetidas ao ensaio de PCR em tempo real após 18 a 24 horas de pré-enriquecimento, enquanto as amostras provenientes das granjas de matrizes e incubatórios, após 18 a 24 horas de enriquecimento seletivo. Amostras positivas passam para análise bacteriológica para isolamento e identificação do agente.

### 2.9.4 Isolamento em meios seletivos indicadores

Os meios indicadores seletivos permitem a diferenciação de *Salmonella* devido o aspecto macroscópico das colônias e suas propriedades de inibição (LAZARO et. al., 2008). Através da inoculação (a partir do meio de enriquecimento seletivo), busca-se o isolamento e seleção das colônias de *Salmonella*, para posterior identificação bioquímica. São utilizados o ágar verde brilhante de fenol lactose sacarose (BPLS), com alto poder de seletividade e o ágar entérico hektoen, com médio poder seletivo (LAZARO et. al., 2008).

Após a incubação das placas a 37°C por 18 a 24 horas, procede-se a avaliação macroscópica das colônias. A avaliação compara as características macroscópicas das amostras com as de um controle positivo para *Salmonella*.

Na figura 3, visualiza-se o crescimento característico de uma cultura de *Salmonella* Enteritidis em ágar hektoen, enquanto na figura 4, observa-se o crescimento de *Salmonella* sp. em ágar BPLS. Todas as placas com características sugestivas de *Salmonella* são encaminhadas para identificação bioquímica.



FIGURA 3 – Cultura de *Salmonella* Enteritidis em ágar Hektoen. Fonte: Biomedicina Padrão, 2011.

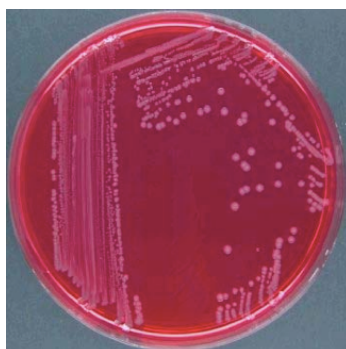


FIGURA 4 – Cultura de *Salmonella* sp. em ágar BPLS. Fonte: Global Salm-Surv, 2003.

### 2.9.5 Identificação Bioquímica Presuntiva

Através da seleção de uma colônia sugestiva de *Salmonella*, pretende-se chegar a confirmação das propriedades fisiológicas e metabólicas das culturas suspeitas através de provas bioquímicas.

O ágar lisina-ferro (LIA) identifica enterobactérias através da reação de descarboxilação e desaminação da lisina além da produção de H<sub>2</sub>S. A descarboxilação ocorre quando a glicose é fermentada e o ácido é neutralizado adquirindo uma coloração amarela. A desaminação é evidenciada através da coloração vermelha no ápice e a produção de H<sub>2</sub>S através da coloração negra na base do tubo (LAZARO et. al., 2008).

O ágar ferro-açúcar triplo (TSI) diferencia bacilos Gram-negativos com base na fermentação da glicose, sacarose e lactose, produção de gás e sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S). Quando ocorrer fermentação da glicose pela bactéria a base torna-se amarelada. Quando ocorre a fermentação da sacarose e da lactose a parte superior do tubo torna-se amarela. A coloração negra na base indica a produção de H<sub>2</sub>S, e a formação de bolhas ou o deslocamento do ágar, a formação de gás (LAZARO et. al., 2008).

O meio motilidade indol sulfeto (SIM) é um meio semi-sólido usado para a determinação da produção de indol, H<sub>2</sub>S e motilidade. O ferro peptonizado e o tiosulfeto de sódio são os indicadores de produção de H<sub>2</sub>S (precipitado de coloração negra). Micro-organismos com motilidade apresentam um crescimento difuso turvando o meio, enquanto organismos sem motilidade crescem apenas ao longo da linha de inoculação. O indol é detectado pela adição de reagentes químicos após o período de inoculação (LAZARO et. al., 2008).

A hidrólise da uréia ocorre através da enzima urease e a mudança de coloração do meio ocorrer através da produção de amônia em quantidade suficiente para elevar o pH do meio (LAZARO et. al., 2008).

O meio instituto adolfo lutz (IAL) é composto por nove provas bioquímicas em um tubo de ensaio: presença de indol, H<sub>2</sub>S, gás, motilidade, fermentação da glicose e sacarose, fenilalanina desaminase (FD), hidrólise da uréia, descarboxilação da lisina (LAZARO et. al., 2008) conforme ilustração na figura 5.

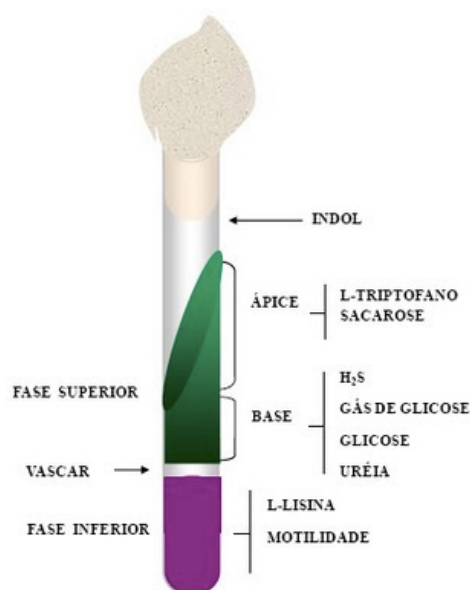


FIGURA 5 - Imagem demonstrativa do meio IAL. Fonte: Biomedicina Brasil, 2011.

### 2.9.6 Caracterização antigênica

A caracterização antigênica é definida pelo esquema de *Kauffmann & White* e é efetuada através da reação antígeno-anticorpo com conseqüente aglutinação do antígeno frente ao antissoro específico para *Salmonella* através do teste de SAR (LAZARO et. al., 2008). A caracterização é feita através das reações com os grupos, os antígenos somáticos e flagelares.

A cepa isolada é semeada em ágar nutriente inclinado e incubada a 37°C por 18 a 24 horas. Em uma lâmina de vidro é adicionado 10 microlitros ( $\mu$ l) de solução salina e uma alçada da bactéria, em seguida é adicionado 10  $\mu$ l de antissoro polivalente, homogeneizando através de movimentos rotatórios durante dois minutos até a observação de aglutinação (formação de grumos). No quadro 6, foram listados os sorovares testados por esse método, bem como os antígenos utilizados.

Quando for verificado que trata-se de uma amostra de *Salmonella* Rugosa, procede-se então ao repique em placa de ágar nutriente. Após o crescimento (18 a 24 horas) é selecionada uma colônia isolada, com aspecto uniforme e o processo para caracterização antigênica é efetuado novamente. Caso a amostra permaneça rugosa, é repetido o repique mais uma vez.

O número de sorovares identificáveis através desse método é limitado aos sorovares descritos no quadro 6. Para os sorovares que não podem ser identificados por esse método a

empresa conta com um equipamento que possui a capacidade de identificar 102 sorovares de *Salmonella* sp. através de sorotificação molecular rápida (figura 6).

QUADRO 6 - Caracterização antigênica de *Salmonella* sp.

Sorovares	Salina	Antígeno Somático (O)	Grupo	Antígenos Flagelares (H)
<i>S. Typhimurium</i>	Negativo	Positivo	B	H:i, H:2
<i>S. Heidelberg</i>	Negativo	Positivo	B	H:2, H:r
<i>S. Enteritidis</i>	Negativo	Positivo	D	H:g, m+H:g, P+H:M+H:p
<i>S. Mbandaka</i>	Negativo	Positivo	C1	S65 + Hz10
<i>S. Senftenberg</i>	Negativo	Positivo	E4	H6 + HS + HT
<i>S. Minnesota</i>	Negativo	Positivo	O:21	H:b + S65
<i>S. Gallinarum</i>	Negativo	Positivo	D	NA
<i>S. Pullorum</i>	Negativo	Positivo	D	NA
<i>S. Rugosa</i>	Positivo	NA	NA	NA

NA: Não se aplica.

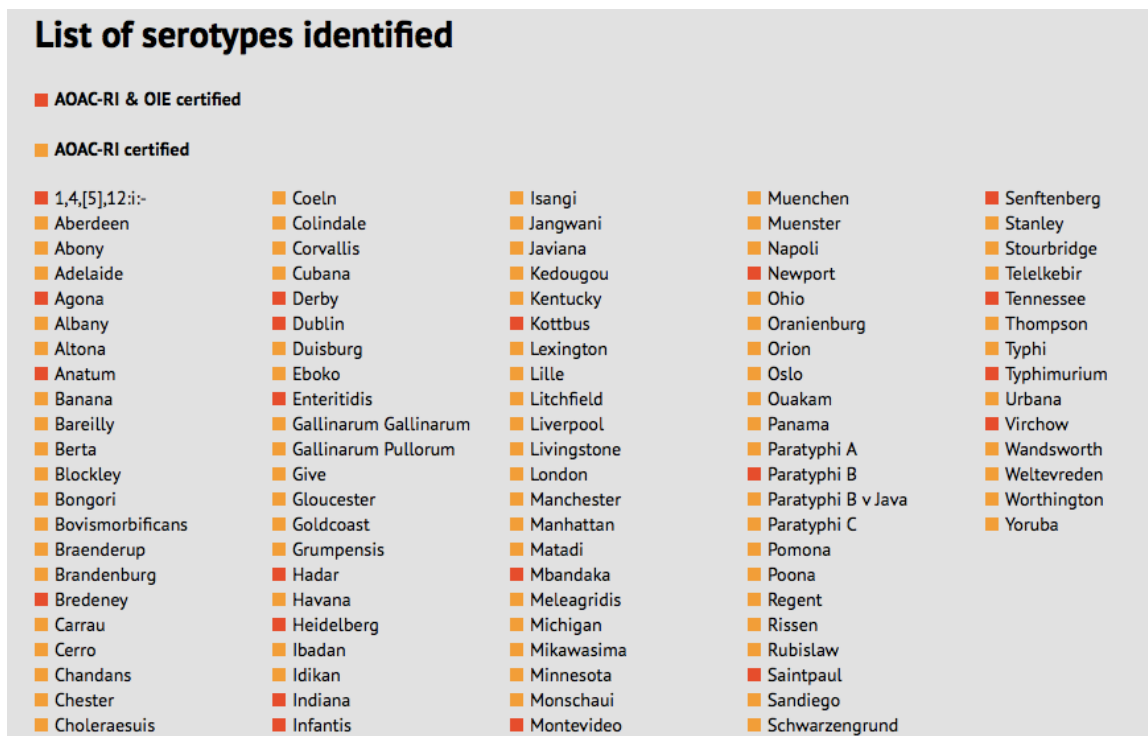


FIGURA 6 – Lista de sorotipos identificados através de sorotipificação molecular rápida. Fonte: Check&Trace, 2015

### **2.9.7 Pesquisa de *Salmonella* em aves matrizes**

A pesquisa de *Salmonella* em aves matrizes é efetuada em todos os recebimentos de matrizes de um dia através da coleta de 10 machos e 10 fêmeas; após a lavagem e higienização dos aviários através de suabes de arrasto e superfície em no mínimo 10 pontos; nas camas aviárias através da coleta de 50 gramas de amostra mensalmente além de todos os recebimentos de cargas.

### **2.9.8 Pesquisa de *Salmonella* em aves de corte**

No recebimento de aves de 1 dia (origem terceiros), a pesquisa de *Salmonella* é efetuada através da coleta de no mínimo 10 pintos. No pré-alojamento, a pesquisa de *Salmonella* é efetuada após a fermentação da cama através de suabes de arrasto e suabes de superfície de equipamentos (comedouros, bebedouros, ventiladores e telas) ou após lavagem e desinfecção em todos os aviários antes do alojamento do novo lote. Instalações positivas para *Salmonella* não poderão ser alojadas antes de obter resultado negativo.

No pré-abate a pesquisa de *Salmonella* é efetuada na cama do aviário, por meio de suabes de arrasto em 100% dos lotes. As coletas são realizadas entre 22 a 35 dias de idade do lote. Em caso de positividade, o Serviço de Inspeção Federal da Unidade é informado para programar abate no final do turno. A cama deve ser trocada ou fermentada e deverá ser efetuado um vazio sanitário de no mínimo 10 dias.

Nos veículos transportadores de frangos, a pesquisa de *Salmonella* é efetuada por meio de suabes de superfície ou suabes de arrasto nas gaiolas após lavagem e higienização, no mínimo, em um veículo quinzenalmente. A coleta é efetuada preferencialmente a partir de lotes que foram positivos para *Salmonella* em propés pré-abate. Em casos positivos, o processo de lavagem e desinfecção é revisado e é efetuada nova limpeza e sanitização. O desinfetante pode ser substituído e o monitoramento nas gaiolas é intensificado.



### **2.9.9 Pesquisa de *Salmonella* em Incubatórios**

A pesquisa de salmonela no ambiente do incubatório é efetuada através de suabes de arrasto da superfície de equipamentos, instalações, nascedouros e sala de incubação (pontos de difícil acesso) mensalmente.

A monitoria consiste em pesquisar *Salmonella* em materiais de mecônio, ovos bicados, instalações como sala de sexagem, nascedouros, incubadoras, bandejas e caixas de incubação, vacinadoras e triturador. Todas as monitorias de equipamentos são realizadas por meio de suabes de superfície.

A pinteira (veículo de pintos) e a ovejira (veículo de ovos) são monitoradas mensalmente através de chiffonettes ou suabes de arrasto. A periodicidade das monitorias é mensal, sendo que a cada 3 meses todos os lotes devem ser monitorados enviando amostras de mecônio e ovos bicados para laboratório externo credenciado pelo MAPA, seguindo o PNSA.

### **2.10 Pesquisa de *Salmonella* em suínos**

A pesquisa de *Salmonella* em suínos é efetuada após a lavagem e desinfecção de granjas e caminhões quinzenalmente, nas baias e equipamentos no intervalo entre lotes através de suabes de arrasto e de superfície. Em casos de positividade para *Salmonella*, efetua-se uma nova higienização e recoleta com intensificação das boas praticas de biosseguridade.

### **2.11 Atividades paralelas a rotina do laboratório**

Durante o estágio foram efetuadas algumas visitas as granjas de produtores de suínos integrados a empresa, com o objetivo de conhecer as medidas de biosseguridade já implantadas, os principais desafios das criações, as enfermidades mais comuns e o seu tratamento. Junto com os extensionistas da empresa, foi possível conhecer as granjas

multiplicadora e recria das avós e matrizes, unidades produtoras de leitões (UPLs), crechários e terminações.

Além das visitas as granjas, dois dias de estágio foram destinados a conhecer a fábrica de rações, localizada no município de Xanxerê, Santa Catarina.

## 3 DISCUSSÃO

### 3.1 Doenças Associadas ao Circovirus suíno (PCVD)

A PCVD é uma enfermidade infectocontagiosa causada pelo circovirus suíno tipo 2 (PCV2), presente na maioria dos países produtores de suínos, incluindo o Brasil. O PCV2 é o agente etiológico necessário, mas não suficiente para desencadear PCVD. A natureza ubíqua do PCV2 faz com que muitos animais estejam infectados em todo mundo, mas apenas uma parte deles manifeste a doença (SEGALÉS; KEKARAINEN; CORTEY; 2013).

A Síndrome de Refugagem Multissistêmica (SRM) ou do Definhamento (SMD) é a mais frequente e importante apresentação clínica dessa enfermidade, que desde os surtos quase simultâneos na Europa e América do Norte na década de 1990, tornou-se uma das mais importantes doenças suínas no mundo, sendo disseminada através da comercialização e movimentação de animais assintomáticos (FIRTH, et al. 2009).

O PCV2 pertence à família *Circoviridae*, não é envelopado, apresenta simetria icosaédrica e mede 15 a 17 nm, um dos menores vírus já descritos. O genoma, DNA circular de fita simples, também é um dos menores já identificados, cerca de 1.76 kb (MORÉS; BARCELLOS; ZANELLA; 2007).

O PCV2 pode ser classificado filogeneticamente em 4 genótipos, PCV2a, PCV2b, PCV2c, PCV2d, sendo o primeiro o mais prevalente antes dos grandes surtos em todo mundo, enquanto o segundo tornou-se o mais prevalente durante os surtos, até o momento. As diferenças sequenciais existentes entre o PCV2a e o PCV2b estão diretamente relacionadas a diferenças antigênicas funcionais na neutralização viral *in vivo*. Essa característica pode afetar a eficácia de vacinas devido a diferenças na neutralização cruzada entre diferentes estirpes de PCV2 (KURTZ, et al. 2014).

Leitões entre 5 e 12 semanas de idade são os mais acometidos. A morbidade e a mortalidade variam de acordo com a granja, o manejo e a fase em que ocorre. A SEM é considerada uma doença multifatorial, onde fatores infecciosos e não-infecciosos podem exacerbar os sinais clínicos e a gravidade da enfermidade. (MORÉS; BARCELLOS; ZANELLA, 2007).

Os fatores infecciosos e não-infecciosos estão presentes em maior ou menor grau, na grande maioria das criações e a concomitância com outras enfermidades agravam ainda mais

os sinais clínicos. Já foi constatado a associação do PCV2 com *Escherichia coli*, *Brachyspira hyodysenteriae*, *Lawsonia intracellularis*, *Salmonella* Typhimurium (ZLOTOWSKY, et al. 2009), *Salmonella* sp. (SCHWARZ, et al. 2010) e Torque teno vírus (RITTERBUSCH, et al. 2011).

A transmissão pela via oronasal é a mais frequente, mas o contato com as fezes e a urina de animais infectados, e a transmissão via fômites também é uma importante forma de transmissão nas criações onde as medidas de biosseguridade não são rigorosamente seguidas. A transmissão vertical pode ocorrer mas não é tão importante para a patogênese do PCV2, devido ao baixo número de fetos infectados. No entanto, em casos de aborto e fetos mumificados, deve-se considerar o PCV2 bem como a associação do PCV2 ao Parvovirus suíno (PPV), como diagnóstico diferencial (PESCADOR, et al. 2007).

Além de suínos domésticos, o mesmo perfil filogenético de PCV2 foi isolado em javalis no Brasil, no entanto, são necessários mais estudos para verificar se esses animais atuam como reservatórios para suínos domésticos localizados na mesma área geográfica (CASTRO, et al. 2012).

Os sinais clínicos são bastante variáveis, mas o emagrecimento é o sinal mais típico, geralmente rápido e progressivo (figura 7). Percebe-se ainda dispneia, linfadenopatia, palidez, icterícia, diarreia, apatia, anorexia e finalmente caquexia (SEGALÉS, 2012; MORÉS; BARCELLOS; ZANELLA, 2007).

Em criações onde o vírus está presente é comum a forma subclínica, onde percebe-se apenas um aumento variável no número de refugagem. Os animais acometidos não acompanham o desenvolvimento dos demais, ou seja, diminuem o ganho de peso diário sem qualquer sinal clínico associado. Nesses animais, não são observadas lesões macroscópicas e as lesões microscópicas são inexistentes ou caracterizadas apenas por uma leve diminuição linfocitária com inflamação granulomatosa nos tecidos linfóides (SEGALÉS, 2012).



FIGURA 7: Diferença entre escores corporais em animais do mesmo lote, sugestivo de SRM – Fonte: a autora.

As lesões macroscópicas mais comumente associadas ao PCV2 incluem hipertrofia dos linfonodos, pulmão não colabado com áreas de hepatização vermelha, fígado com áreas descoloridas e pontos brancacentos nos animais ictericos, pontos multifocais brancacentos na superfície e no parênquima renal, lesões cutâneas caracterizadas por manchas avermelhadas e arredondadas de tamanho variável, polisserosite e colite. Quando presente em UPLs leva a falhas reprodutivas: abortos, fetos mumificados e natimortos, aumento no número de nascimentos de leitões fracos e de mortalidade pré-desmame (MORÉS; BARCELLOS; ZANELLA, 2007).

As lesões microscópicas mais evidentes são as presentes no tecido linfóide, no pulmão e nos rins. O pulmão encontra-se não colabado devido a proliferação de células septais e infiltração de linfócitos e histiócitos que levam ao espessamento da parede alveolar. Nos linfonodos ocorre perda da arquitetura tecidual, depleção linfóide, necrose e infiltração de histiócitos. Os rins apresentam áreas focais de nefrite e glomerulonefrite (MORÉS; BARCELLOS; ZANELLA, 2007).

O diagnóstico de PDCV deve ser baseado na associação entre os sinais clínicos, as lesões macroscópicas e microscópicas e a detecção de altas quantidades do antígeno viral ou de DNA nas lesões. Entre as técnicas laboratoriais mais utilizadas para o diagnóstico estão, a hibridização *in situ* (HIS) e imunohistoquímica (IHQ) (CHAE, 2004).

Testes sorológicos como ELISA não são recomendados para o diagnóstico da doença, mas são efetuados para o estudo de soroprevalência nas criações (MORÉS; BARCELLOS; ZANELLA, 2007).

O controle da PCDV é bastante complexo, mas as principais medidas adotadas no campo são baseadas nos “20 pontos de Madec” (MADEC, et al. 2000). Nas maternidades: 1 – Dar preferência ao sistema "*all in, all out*" e eliminar todos os dejetos incluindo as canaletas entre lotes; 2 – Antes do parto, efetuar higienização nas porcas e vermifugar; 3 – Evitar os reagrupamentos de leitões na maternidade, se possível só efetuar trocas nas primeiras horas após o parto.

Nos crechários: 4 - Dar preferência para baias ou gaiolas pequenas, com divisórias resistentes; 5 - Dar preferência ao sistema "*all in, all out*" e eliminar todos os dejetos incluindo as canaletas entre lotes; 6 - Ajustar a lotação para níveis iguais ou menores que 0,33 m<sup>2</sup> por leitão; 7 - Ajustar o espaço dos cochos para valores acima de 7 cm por leitão; 8 - Manter a qualidade do ar, com níveis de amônia (NH<sub>3</sub>) abaixo de 10 ppm, dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) abaixo de 0,1% e umidade do ar abaixo de 85%; 9 - Controlar a temperatura ambiental; 10 - Evitar misturar leitões de diferentes origens no período de permanência nas creches.

Na fase de terminação: 11 - Dar preferência para baias ou gaiolas pequenas, com divisórias resistentes; 12 - Dar preferência ao sistema "*all in, all out*" e eliminar todos os dejetos incluindo as canaletas entre lotes; 13 - Não misturar leitões de diferentes origens durante o período de permanência nas recrias; 14 - Não misturar leitões de diferentes origens durante o período de permanência nas terminações; 15 - Ajustar a lotação para um espaço acima de 0,75 m<sup>2</sup> por leitão; 16 - Manter a qualidade do ar e o controle da temperatura ambiental; 17 - Utilizar um programa de vacinação com base no desafio sanitário da criação; 18 – Controlar o fluxo de ar e de animais nos galpões; 19 – Para os manejos de corte de dentes, cauda, injeções e outros manter a higiene e boas práticas; 20 – Animais doentes devem ser tratados em baias hospital, isoladas das demais assim que iniciarem os sinais clínicos ou ainda serem eutanasiados.

Nas maternidades, o reagrupamento de leitões é uma prática comum que dificilmente fica restrita apenas as primeiras 24 horas após o nascimento dos leitões. As leitões de reposição apesar de ficarem em baias separadas, com a presença de uma fêmea descarte para serem imunoestimuladas, não passam por uma quarentena antes de serem agregadas ao plantel. De acordo com Monroy et al. (2014), porcas nulíparas podem estar infectadas com PCV2 antes de entrar nas granjas de criação e podem ser infectadas por transmissão horizontal durante a quarentena e a gravidez. A exposição e infecção viral durante a gestação pode resultar em infecção subclínica de leitões recém-nascidos.

A idade e o peso ao desmame varia de acordo com o manejo adotado em cada granja, mas de maneira geral são desmamados animais em grupos desde 21 até 32 dias idade e com

um peso que varia de 4 até 12 kg. Leitões mais pesados, acima de 6,7 kg ao desmame desenvolvem melhor durante a fase de creche (KUMMER, et al. 2009).

Nos crechários, a qualidade do ar, em vários casos não é mantida, principalmente nas épocas mais frias do ano, quando os gastos para a manutenção da temperatura são mais altos. Opta-se erroneamente por reduzir o manejo das cortinas, não renovando o ar de maneira eficaz, para manter a temperatura por mais tempo a um custo mais baixo. Segundo Kummer et al. (2009), o manejo das cortinas é essencial para manter a temperatura do ar adequada e permitir a renovação do ar.

Nos crechários e nas terminações a mistura de diferentes lotes é comum também, pois são recebidos animais de diferentes origens e com grande variabilidade de peso. Para a correta classificação, e para o arraçamento adequado, faz-se então uma divisão com base no tamanho e no peso desses animais. De acordo com Kummer et al. (2009) conforme aumenta o número de origens, aumenta o risco do desenvolvimento de doenças.

A maior parte dos trabalhadores das granjas compreendem a importância da limpeza, desinfecção e vazios sanitários, no entanto, muitas vezes não dispõem de tempo hábil entre a saída e a chegada de um novo lote de animais. Recentemente, Jacques et al. (2015) demonstrou a persistência de importantes patógenos suínos, entre eles o PCV2 em biofilmes bacterianos por vários dias.

O uso de vacina inativada contra PCV2 nas leitoas e porcas antes da cobertura, esta disseminado em praticamente todas as UPLs e protege passivamente os leitões via colostro, diminuindo os sinais clínicos e lesões provocadas pelo PCV2. Além disso, observa-se uma diminuição na mortalidade e número de animais refugos, melhora no ganho de peso diário, na taxa de conversão alimentar. A vacina ainda atua na prevenção de abortos, no aumento na taxa de fertilidade e na redução de retornos ao estro em matrizes e leitoas (SEGALÉS, 2015).

Por outro lado, uma nova estirpe do PCV2 foi isolada em criações no sudeste do Brasil após um surto de SEM em setembro de 2013, onde todos os animais haviam sido vacinados, indicando, dessa forma uma falha da vacina que até o momento não havia sido descrita no Brasil (SALGADO, et al. 2014).

A infecção dos rebanhos suínos pelo PCV2 ainda é muito frequente no Brasil, mesmo nas populações vacinadas, por esse motivo têm sido sugerido que o vírus possa estar passando por uma evolução filogenética, considerando a sua capacidade de mutação e uma possível modulação promovida pela vacina (SEGALÉS; KEKARAINEN, 2015).

Diante desse contexto, mais estudos sobre o PCV2 são necessários para controlar PCDV, uma vez que se trata de uma enfermidade multifatorial, que culmina com prejuízos econômicos importantes na suinocultura.

### **3.2 Importância do controle de *Salmonella* na cadeia produtiva de aves**

A qualidade e a segurança dos produtos de origem animal é mantida graças a programas de segurança alimentar que devem proporcionar um controle efetivo em toda cadeia alimentar que envolve desde a criação dos animais até a distribuição dos alimentos (SANTOS, et al. 2013).

O objetivo desses programas é aumentar a segurança e a qualidade dos produtos produzidos, preparando o mercado produtor do Brasil para atender as exigências dos importadores, aumentando ainda mais as exportações (CARDOSO; TESSARI, 2008).

A utilização dos programas de Boas Práticas de Produção (BPP) e a Análise dos Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) foi estabelecida no Brasil através da Portaria nº 1428/93 e tem como objetivo principal estabelecer as orientações necessárias que permitem executar as atividades de inspeção sanitária, de forma a avaliar as Boas Práticas para a obtenção de padrões de identidade e qualidade de produtos e serviços na área de alimentos com vistas à proteção da saúde da população. O Programa BPP é utilizado para inspecionar a produção através de condições sanitárias adequadas enquanto o Programa de APPCC identifica perigos potenciais tanto químicos, quanto físicos e microbiológicos e determina ações para garantir a inocuidade dos alimentos (CARDOSO; TESSARI, 2008).

Em 1963, foi criado um fórum internacional de normatização do comércio de alimentos estabelecido pela Organização das Nações Unidas (ONU), por ato da Organização para a Agricultura e Alimentação (FAO) e Organização Mundial de Saúde (OMS), o *Codex Alimentarius* (MAPA, 2015).

O *Codex Alimentarius* abrange os principais alimentos, sejam estes processados, semiprocessados ou crus. Também trata de substâncias e produtos usados na elaboração de alimentos. Suas diretrizes referem-se aos aspectos de higiene e propriedades nutricionais dos alimentos, abrangendo o código de prática e normas de aditivos alimentares, pesticidas, resíduos de medicamentos veterinários, substâncias contaminantes, rotulagem, classificação, métodos de amostragem e análise de riscos (MAPA, 2015).



O comitê do *Codex Alimentarius* no Brasil têm como principal atividade a participação e a defesa dos interesses nacionais nos comitês internacionais e a responsabilidade de observar as normas do *Codex Alimentarius* como referência para a elaboração e atualização da legislação e regulamentação nacional de alimentos (MAPA, 2015).

A presença de *Salmonella* nos produtos alimentícios derivados de aves desempenha um papel importante na saúde pública, quando se trata de toxinfecções alimentares (enfermidades causadas pela ingestão de alimentos contaminados por micro-organismos e suas substâncias tóxicas). Nesse contexto, o controle de *Salmonella* em toda a cadeia de produção é muito importante para garantir a inocuidade do produto que chega aos consumidores. Nos Estados Unidos (EUA), estima-se que anualmente as *Salmonellas* paratíficas acometem 1.000.000 de pessoas, sendo que 19.000 necessitam de hospitalização e 380 vem a óbito, apenas nos Estados Unidos (CDC, 2012).

Acredita-se que a ocorrência de Salmonelose (grupo de doenças causadas por qualquer membro do gênero *Salmonella*) na população humana é subestimada já que a maior parte dos quadros de gastroenterite ocorre sem a necessidade de hospitalizações e sem o isolamento do agente causal no alimento incriminado (SANTOS; NASCIMENTO; FLORES, 2002).

O gênero *Salmonella* é o mais relevante da família *Enterobacteriaceae* e é dividido em duas espécies: *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*. *Salmonella enterica* é subdividida em seis subespécies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*. Cada subespécie apresenta diferentes sorovares, totalizando 2.610, com base na caracterização de seus antígenos somáticos (O) e flagelares (H) e de acordo com a espécie e subespécie tendo a seguinte distribuição: *Salmonella enterica* subespécie *enterica* (1.547 sorovares); *Salmonella enterica* subespécie *salamae* (513); *Salmonella enterica* subespécie *arizonae* (100); *Salmonella enterica* subespécie *diarizonae* (341); *Salmonella enterica* subespécie *houtenae* (73); *Salmonella enterica* subespécie *indica* (13); *Salmonella bongori* (23) (GUIBOURDENCHE, et al. 2010).

As salmonelas são bacilos, Gram-negativos, anaeróbios facultativos, não formadores de esporos, que possuem flagelos (com exceção da *Salmonella Pullorum* e *Salmonella Gallinarum*), catalase positivos, oxidase negativos, redutores de nitrato a nitrito, que fermentam açúcares e descarboxilam aminoácidos. Possuem vários fatores de virulência como antígenos de superfície, fatores que permitem a invasividade, a produção de endotoxinas, citotoxinas e enterotoxinas. O papel de cada um desses fatores na patogenia das infecções varia de acordo com o sorovar (QUINN, et al. 2005).

As infecções causadas em aves são classificadas em três tipos: pulorose (*Salmonella Pullorum*), tifo aviário (*Salmonella Gallinarum*), ambas espécie-específicas de aves e paratifo aviário, causado por qualquer outra salmonela que não a *Salmonella Pullorum* e a *Salmonella Gallinarum*. Os dois primeiros sorovares determinam sérios prejuízos à produção avícola e não se relacionam com a doença em humanos. As *Salmonellas* paratíficas contrapõem essa característica, sendo responsáveis por graves surtos de doença gastrointestinal em humanos (ANDREATTI, 2006).

As *Salmonellas* paratíficas atravessam a camada epitelial intestinal e alcançam a lâmina própria (camada na qual as células epiteliais estão ancoradas), onde proliferam. São fagocitadas pelos monócitos e macrófagos, resultando em resposta inflamatória, decorrente da hiperatividade do sistema reticuloendotelial. Ao contrário do que ocorre na febre tifóide, nas enterocolites, a penetração de *Salmonella* spp. fica limitada à lâmina própria (SHINOHARA, et al. 2008).

As *Salmonellas* que não são espécie-específicas, possuem a capacidade de colonizar o trato gastrointestinal de diferentes espécies. Nos homens desenvolvem um quadro de infecção gastrointestinal, tendo como sintomas dores abdominais, diarreia, febre baixa e vômito, sendo raros os casos clínicos fatais. Os sintomas aparecem entre 12 a 36 horas, podendo perdurar até 72 horas. Trata-se da manifestação mais comum de infecção por *Salmonella* e o episódio geralmente sofre resolução em dois a três dias, não necessitando de tratamento com antibióticos (SHINOHARA, et al. 2008). Nas aves, elas tem a capacidade de persistir no intestino, entrar na corrente sanguínea e chegar em diferentes órgãos, facilitando a contaminação da carcaça e dos ovos, sem provocar sinais clínicos. Troxell et al. (2015) demonstraram recentemente que parâmetros fisiológicos, como a temperatura corporal, podem ter um papel significativo na expressão da virulência, justificando assim a ausência de sinais clínicos em aves se comparados a mamíferos.

As aves jovens são mais suscetíveis a colonização intestinal por *Salmonella* spp. pois apresentam baixa imunidade e uma microbiota intestinal reduzida. Os sinais clínicos variam de acordo com o grau de exposição e pela virulência da amostra. Diarreia profusa, cegueira, claudicação, apatia, penas arrepiadas e asas caídas são sinais que podem estar presentes em aves jovens infectadas, mas raramente são observados em aves adultas (ANDREATTI, 2006).

De acordo com o CDC (2014) os sorotipos que mais causam a infecção em humanos são Enteritidis, Typhimurium, Newport e Javiana. Estes sorotipos são responsáveis por cerca de metade de todas as culturas isoladas nos laboratórios de saúde pública.

No Brasil, a *Salmonella* Enteritidis é a mais prevalente (CARDOSO et al. 2015) e os surtos de toxinfecções alimentárias geralmente estão associados ao consumo de alimentos contendo carne e ovos contaminados (THOMAS et al. 2009).

Segundo Humphrey (2004) para causar gastroenterite em humanos saudáveis, a dose infectante de *Salmonella* oscila entre  $10 \times 10^6$  a  $10 \times 10^8$  UFC, embora já tenham sido relatados salmoneloses com doses infectantes bem menores, entre 1 - 10 UFC.

A salmonelose é a doença bacteriana de maior impacto econômico na avicultura brasileira e mundial devido ao paratifo aviário que engloba sorovares ubiqüitárias, com várias possibilidades de contaminação e transmissão dentro dos plantéis avícolas (ANDREATTI, 2009), por esse motivo a salmonelose é um fator limitante a criação de aves quando criadas sem um programa específico de controle.

Diante disso foi criado o PNSA, que define normas para o monitoramento das salmoneloses em estabelecimentos avícolas de comercialização nacional e internacional, destinados a reprodução e produção de aves e ovos férteis. Os estabelecimentos são certificados como livres de *Salmonella* Gallinarum, *Salmonella* Pullorum e livre/controlado para *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium (AVICULTURA INDUSTRIAL, 2009).

O controle dos plantéis reprodutores, o monitoramento microbiológico da ração e dos insumos de origem animal, bem como do ambiente em que as aves são criadas, é essencial para evitar a disseminação do agente (CARDOSO; TESSARI, 2008).

De acordo com estudo da faculdade de medicina veterinária e zootecnia (FMVZ), demonstrado na tabela 2, a análise de diferentes materiais (entre os quais incluem matriz pesada, poedeira, frango de corte, ração, cama, farinha de origem animal entre outros), revelou alta incidência de *Salmonella* spp. além de posicionar o sorovar Enteritidis como o mais prevalente.

TABELA 2 – Sorovares de *Salmonella* isolados pelo laboratório de ornitopatologia da FMVZ – Unesp - Botucatu

Sorovares	Matriz pesada	Poedeira	Frango de Corte	Carcaça de frango	Ração	Cama	Farinha animal	Total	%
Enteritidis	3	5	25	1	-	-	-	34	46,6
Anatum	-	-	-	-	-	-	5	5	6,8
Mbandaka	-	-	3	-	-	1	-	4	5,5
Senftenberg	-	-	-	1	-	-	3	4	5,5
Montevideo	-	-	-	-	-	-	4	4	5,5
Cubana	1	-	1	-	-	-	1	3	4,1
Bredeney	-	-	-	-	1	-	1	2	2,7
Agona	-	-	-	-	-	-	2	2	2,7
Pullorum	-	2	-	-	-	-	-	2	2,7
Rugosa	-	1	1	-	-	-	-	2	2,7
Dublin	-	-	-	1	-	-	-	1	1,4
Outros	-	-	-	-	-	-	10	10	14
Total	4	8	30	3	1	1	26	73	-
%	5,5	11	41	4,1	1,4	1,4	35,6	-	100

Fonte: ANDREATTI, et al. 2001.

Em criações industriais, as aves e seus produtos estão expostos a *Salmonella* spp. em todas as fases de criação o que torna o controle da enfermidade extremamente difícil e oneroso. Para um controle eficiente é preciso compreender como a disseminação ocorre e assim estipular medidas de controle (ANDREATTI, 2006).

Uma vez nas granjas, o contato entre os animais facilita a transmissão horizontal, pela água, fezes, rações, fômites e as pessoas que trabalham no local. Animais domésticos e silvestres que possam ter contato com as aves também são potenciais disseminadores. Matéria orgânica e umidade constituem nichos onde diversos sorotipos podem sobreviver e se multiplicar por períodos prolongados (BRADEN, 2006). Os roedores merecem atenção redobrada já que a incidência de ratos contaminados é alta em lotes positivos, o que não ocorre em granjas negativas (ANDREATTI, 2006).

A detecção rápida e eficaz de lotes de aves infectados por *Salmonella* spp. tornou-se fundamental para reduzir a frequência da transmissão entre os lotes de aves e aos consumidores de produtos avícolas. O diagnóstico definitivo é realizado através do isolamento e identificação da bactéria (ANDREATTI, 2009).

A erradicação das *Salmonellas* paratíficas nas criações de aves é praticamente impossível no atual contexto. A grande variedade de possibilidades de contaminação existentes, tornam os controles difíceis e onerosos, porém extremamente necessários. Em 2013 a incidência das infecções provocadas por *Salmonellas*, diminuiu 9% em comparação aos anos de 2010 a 2012 nos EUA (CDC, 2014).

No incubatório, o monitoramento deve ser rigorosamente seguido através da exposição de placas e suabes de arrasto nos diversos ambientes, além de análises de todos os resíduos, caixa de transporte de pintos, suabes cloacais, exames de fezes, ovos bicados e mecônio. O controle de roedores deve ser efetuado em todos os tipos de criações através da limpeza dos arredores dos núcleos juntamente com o uso de rodenticidas. Os insetos também devem ser controlados periodicamente (SONCINI, 2004).

A qualidade da matéria-prima utilizada para a fabricação das rações deve ser rigorosamente avaliada, evitando as contaminadas com *Salmonella spp.*. Dar preferência a rações vegetais para as aves reprodutoras e que são tratadas por calor através do processo de peletização (SONCINI, 2004).

A utilização dos resíduos derivados da produção avícola, como farinhas de vísceras, sangue, penas, carne e ossos constitui uma alternativa economicamente viável na formulação de rações, no entanto, a contaminação com *Salmonella sp.* nesses ingredientes de rações é importante e gera riscos a saúde pública (CARDOZO, 2011). Por esse motivo, a exclusão de subprodutos avícolas como matéria-prima para fabricação de ração têm sido praticada. Além disso, amostras de *Salmonella spp.* originárias de aves podem ser mais prejudiciais as aves se comparadas a amostras originadas de outras espécies, devido a maior adaptação ao hospedeiro (ANDREATTI, 2009).

As *Salmonellas* são sensíveis ao calor, uma vez que não resistem a temperaturas entre 55 e 62 °C (JUNEJA; EBLEN; RANSOM, 2001). A temperatura e o tempo de tratamento durante a peletização funcionam como potentes antibacterianos. O tratamento por 30 segundos a temperatura de 80 °C é suficiente para inativar os principais micro-organismos patogênicos exceto quando houver uma taxa bacteriana extremamente alta (EFSA, 2008).

A utilização de antibióticos de maneira preventiva, têm sido largamente utilizada no controle de *Salmonella*, diminuindo a mortalidade porém sem eliminar totalmente a infecção, levando ao desenvolvimento de aves portadoras que excretam ativamente a bactéria através das fezes. Os principais antimicrobianos utilizados são as sulfonamidas, penicilinas, polipeptídeos, lincosamidas, cefalosporinas e quinolonas. No entanto, essa pratica têm sido apontada como uma das causas da resistência antimicrobiana. Minharro et al. (2015) demonstraram que a maioria dos sorovares de *Salmonella* foram resistentes para o grupo de sulfonamidas (sulfametoxazol e sulfonamida) e beta-lactâmicos (amoxicilina / ácido clavulânico).

Após a proibição do uso de diversas moléculas antibióticas na União Européia através da EC n. 1831/2003 tem-se observado um aumentado na busca por alternativas para melhorar

o desempenho dos animais, diminuir a contaminação das aves e das carcaças por bactérias patogênicas, sem deixar resíduos nocivos que possam causar problemas de saúde aos consumidores finais da carne de frango. Enzimas, extratos de plantas, óleos, ácidos orgânicos, prebióticos, probióticos e suas associações estão entre compostos mais estudados.

Diversos estudos tem demonstrado a ação benéfica de probióticos na alimentação de aves, conforme pode ser observado no quadro 9:

QUADRO 7 – Ação dos probióticos sobre *Salmonella* sp.

Probiótico	Desafio	Efeito
<i>Bacillus cereus</i> var Toyoi	10 <sup>4</sup> <i>Salmonella</i> Enteritidis	Aumento do ganho de peso e conversão Redução de 100% na presença de SE.
<i>Lactobacillus</i> spp. (11 espécies)	10 <sup>4</sup> <i>Salmonella</i> Enteritidis	Redução da recuperação de SE 24 horas pós tratamento; Redução da presença de SE em tratamento via cloacal.
<i>Lactobacillus casei</i>	10 <sup>8</sup> <i>Salmonella</i> Typhimurium	Redução da contagem de ST em baço, intestino e fígado; Redução na infiltração de neutrófilos; Aumento da atividade fagocítica de macrófagos; Aumento de IgA no intestino.
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> e <i>Lactobacillus reuteri</i>	<i>Salmonella</i> Thphimurium	Redução de 99% da viabilidade de ST em pH 4,5 e microaerofilia; Redução de 20% de ST em pH7,5 e microaerofilia.
<i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> , <i>Lactobacillus fermentum</i> ; <i>Lactobacillus</i> spp. (11 espécies)	10 <sup>4</sup> <i>Salmonella</i> Enteritidis	Redução de SE em aves tratadas por 24 horas, uma hora pós-inoculação; Redução de SE em aves tratadas 24 horas pré-inoculação.
Aviguard®, <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e <i>Pediococcus acidilactici</i>	<i>Salmonella</i> spp. proveniente do incubatório	Redução da contaminação no corpo da ave, na carcaça e no ceco.

Fonte: adaptado de KURITZA, WESTPHAL, SANTIN, 2014.

Apesar do desconhecimento de todos os mecanismos de ação dos probióticos é evidente que a sua utilização na avicultura é benéfica, tanto no controle de *Salmonella*, quanto como melhorador de desempenho (SILVA; ANDREATTI, 2000).

A vacinação de reprodutoras também é um método eficiente auxiliar no controle de *Salmonella*, porém essa medida não substitui nenhuma das outras estratégias de controle, uma vez que previne a manifestação clínica, mas ainda pode ocorrer a infecção e a eliminação de *Salmonella* (SONCINI, 2004).

O controle de *Salmonella* é um desafio para a saúde pública e para a indústria avícola, por esse motivo as medidas de biosseguridade devem ser implantadas e vistoriadas em toda cadeia produtiva uma vez que, animais portadores são fatores epidemiológicos importantes, devido à ausência de sinais e a dificuldade técnica em detectá-los antes ou durante a inspeção sanitária das aves. Além disso, mais estudos são necessários acerca da epidemiologia da *Salmonella* e sua prevalência nos ambientes de produção.

## 4 CONCLUSÕES

O estágio curricular supervisionado em Medicina Veterinária proporcionou uma ampla visão sobre a importância do controle sanitário tanto na avicultura quanto na suinocultura. A partir das atividades acompanhadas foi possível formar opiniões críticas perante as enfermidades de maior prevalência, enfatizando a importância do diagnóstico definitivo e a associação desse com a realidade vivenciada no campo.

Dessa forma, é possível concluir também que os conhecimentos teórico e prático adquiridos no estágio supervisionado foram fundamentais para a capacitação profissional.



## REFERÊNCIAS

- AGROLINK. **Frigoríficos catarinenses são habilitados para exportar carne suína e de frango para China e México.** Disponível em: <[http://www.agrolink.com.br/noticias/frigorificos-catarinenses-sao-habilitados-para-exportar-carne-suina-e-de-frango-para-china-e-mexico\\_344220.html](http://www.agrolink.com.br/noticias/frigorificos-catarinenses-sao-habilitados-para-exportar-carne-suina-e-de-frango-para-china-e-mexico_344220.html)>. Acesso em: 21 de novembro de 2015.
- ANDREATTI F., R. L. Tifo Aviário. In: ANDREATTI Filho, Raphael Lucio (Org.) **Saúde Aviária e Doenças**. 1. ed. São Paulo: Roca, 2006. p.96-110.
- ANDREATTI F., R. L. Paratifo aviário. In: REVOLLEDO, Liliana; FERREIRA, Antonio J. Piantino. **Patologia Aviária**. 1. ed. Barueri: Manole, 2009. p.18-33.
- ANDREATTI F., R. L. et al. Sorovares de *Salmonella* isolados de materiais avícolas no período de 1994 a 1999. **Revista CRMV-SP**. v. 4, p. 90-101, 2001.
- ANVISA. **Deteção e identificação de bactérias de importância médica.** Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/servicosade/microbiologia/mod\\_5\\_2004.pdf](http://www.anvisa.gov.br/servicosade/microbiologia/mod_5_2004.pdf)>. Acesso em: 01 de dezembro de 2015.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL. **Relatório anual 2015.** Disponível em: <[http://abpa-br.com.br/files/RelatorioAnual\\_UBABEF\\_2015\\_DIGITAL.pdf](http://abpa-br.com.br/files/RelatorioAnual_UBABEF_2015_DIGITAL.pdf)>. Acesso em: 21 de novembro de 2015.
- \_\_\_\_\_. **História.** Disponível em: <<http://abpa-br.com.br/institucional>>. Acesso em: 21 de novembro de 2015.
- AVICULTURA INDUSTRIAL. **Aves sem *Salmonella*.** Disponível em: <[http://www.aviculturaindustrial.com.br/noticia/aves-sem-salmonela/20101203100242\\_R\\_844](http://www.aviculturaindustrial.com.br/noticia/aves-sem-salmonela/20101203100242_R_844)>. Acesso em: 01 de dezembro de 2015.
- BARCELLOS, D. E. S. N. et al. Avanços em programas de biossegurança para a suinocultura. **Acta Scientiae Veterinarie**. v.36, p. 33-46, 2008.
- BIOMEDICINA BRASIL. **Meio IAL/Rugai.** Disponível em: <<http://www.biomedicinabrasil.com/2011/04/meio-ial-rugai.html#.VmGZ77grKM8>>. Acesso em: 19 de outubro de 2015, il.color.

BIOMEDICINA PADRÃO. **Guia: Meios de cultura para bactérias.** Disponível em: <<http://www.biomedicinapadrao.com.br/2011/11/guia-meios-de-cultura-para-bacterias.html>>. Acesso em: 14 de outubro de 2015, il.color.

BRADEN, C. R. *Salmonella enterica* serotype Enteritidis and eggs: a national epidemic in the United States. **Clinical Infectious Disease**. n.43 v. 4 pg. 512-517, 2006.

CARDOSO, A. L. S. P.; TESSARI, E. N. C. **Salmonela na Segurança dos Alimentos e na Avicultura.** Disponível em: <[http://www.biologico.sp.gov.br/artigos\\_ok.php?id\\_artigo=80](http://www.biologico.sp.gov.br/artigos_ok.php?id_artigo=80)>. Acesso em: 26 de novembro de 2015.

CARDOSO, A. L. S. P.; TESSARI, E. N. C. Interação entre imunidade e nutrição das aves: revisão de literatura. **Revista Científica de Medicina Veterinária**. n. 24, 2015.

CARDOSO, A. L. S. P. et al. Ocorrência de *Salmonella* spp. em carcaças de frango provenientes de abatedouros do estado de São Paulo, Brasil, no período de 2000 a 2010. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**. Periódico Semestral, n.24, 2015.

CARDOZO, M. V. ***Salmonella* spp. e *Clostridium perfringens* em farinhas de origem animal utilizadas na fabricação de rações e avaliação de aditivo na inibição de patógeno.** Jaboticabal: Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2011.

CASTRO, A.M.M.G et al. Detection of genetic characterization of porcine circovirus 2 (pcv2) in brazilian wildlife boars. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.43, n.3, p. 1022-1025, 2012.

CDC. **Pathogens causing US foodborne illnesses, hospitalizations, and deaths, 2000-2008.** Disponível em: <<http://www.cdc.gov/foodborneburden/PDFs/pathogens-complete-list-01-12.pdf>>. Acesso em: 04 de dezembro de 2015.

\_\_\_\_\_. **FoodNet 2012 Surveillance Report.** Disponível em: <[http://www.cdc.gov/foodnet/PDFs/2012\\_annual\\_report\\_508c.pdf](http://www.cdc.gov/foodnet/PDFs/2012_annual_report_508c.pdf)>. Acesso em: 4 de dezembro de 2015.

\_\_\_\_\_. **Incidence and Trends of Infection with Pathogens Transmitted Commonly Through Food — Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10 U.S. Sites, 2006–2013.** Disponível em: <<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm6315a3.htm>>. Acesso em: 04 de dezembro de 2015.

CHAE, C. Postweaning multisystemic wasting syndrome: a review of aetiology, diagnosis and pathology. **The Veterinary Journal**, v. 168, p. 41-49, 2004

CHECK&TRACE *Salmonella*. **List of serotypes identified**. Disponível em: <<http://checkandtrace.com/serotypes.html>>. Acesso em: 22 de outubro de 2015. il. color.

CRITTER, R. B. De O. et al. Métodos de diagnósticos – Microbiológicos, Sorológicos e Anatomopatológicos. In: ANDREATTI Filho, Raphael Lucio (Org.) **Saúde Aviária e Doenças**. 1. ed. São Paulo: Roca, 2006. p.9-17.

EFSA JOURNAL. Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards on a request from the Health and Consumer Protection, Directorate General, European Commission on Microbiological Risk Assessment in feedingstuffs for food-producing animals. **The EFSA Journal** ed. 720, pg. 1-84, 2008.

FDA. **Bacteriological Analytical Manual: Salmonella**. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070149.htm>>. Acesso em: 01 de dezembro de 2015.

FIRTH, C. et al. Insights into the Evolutionary History of an Emerging Livestock Pathogen: Porcine Circovirus. **Journal of Virology**, v. 83, n. 24, p. 12813–12821, 2009.

FRANCHIN, P. R. **Comparação de metodologias alternativas para detecção de Salmonella sp e Listeria monocytogenes em carnes e produtos cárneos**. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

GLOBAL Salm Surv. **Laboratory Protocols**. Disponível em: <[http://www.antimicrobialresistance.dk/data/images/salmonella1\\_pdf.pdf](http://www.antimicrobialresistance.dk/data/images/salmonella1_pdf.pdf)>. Acesso em: 16 de outubro de 2015, il. color.

GUIBOURDENCHEA, M. et al. Supplement 2003–2007 (No. 47) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. **Research in Microbiology**, v. 161, 1. ed., p. 26-29, 2010.

HIRSH, D. C.; ZEE, Y. C.; CASTRO, A.E. Diagnóstico Laboratorial. In: HIRSH, D. C.; ZEE, Y. C. (Org.) **Microbiologia Veterinária**. 2 ed. Rio de Janeiro: Koogan, 2012. p. 26-14

HUMPHREY, T. *Salmonella*, stress responses and food safety. **Nature Reviews Microbiology** 2, pg. 504-509, 2004.

LAZARO, N. S. et al. **Gênero *Salmonella*: Características Epidemiológicas e Laboratoriais**. Disponível em:

<[http://bvs.panalimentos.org/local/file/inclusiones2008/2GSS\\_CURSO\\_CAPACITACAO\\_NI VEL3\\_BRASILIA2008\\_estanaBVS/GSS\\_2008\\_pdf/Manual%20Salmonella%20GSS%202008%20doc..pdf](http://bvs.panalimentos.org/local/file/inclusiones2008/2GSS_CURSO_CAPACITACAO_NI VEL3_BRASILIA2008_estanaBVS/GSS_2008_pdf/Manual%20Salmonella%20GSS%202008%20doc..pdf)>. Acesso em: 01 de novembro de 2015.

JACQUES, M. et al. Persistence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus type 2 in bacterial biofilms. **Journal of Swine and Health Production**, v. 23, p. 132-136, 2015.

JUNEJA, V.K.; EBLEN, B.S.; RANSOM, G.M. Thermal Inactivation of *Salmonella* spp. in Chicken Broth, Beef, Pork, Turkey, and Chicken: Determination of D- and Z-values. **Journal of Food Science**, v. 66, p. 146–152, 2001.

KUMMER, R. et al. Fatores que influenciam o desempenho dos leitões na fase de creche. **Acta Scientiae Veterinarie**, v. 37, p. 195-209, 2009.

KURITZA, L. N.; WESTPHAL, P.; SANTIN, E. Probióticos na avicultura. **Ciência Rural**, v. 44, n.8, p.1457-1465, 2014.

KURTZ, S. et al. Pigs naturally exposed to porcine circovirus type 2 (PCV2) generate antibody responses capable to neutralise PCV2 isolates of different genotypes and geographic origins. **Veterinary Research**, v. 45, 2014.

MADEC, F. et al. Post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs in France: clinical observations from follow-up studies on affected farms. **Livestock Production Science**, v. 63, 3. ed, p. 223 - 233, 2000.

MINHARRO, S. et al. Antimicrobial susceptibility of *Salmonella* serovars isolated from edible offal and carcasses of slaughtered poultry in the state of Tocantins, Brazil **Semina: Ciências Agrárias**, v. 36, n. 4, p. 2661-2670, 2015

MAPA. **Codex Alimentarius**. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/internacional/negociacoes/multilaterais/codex-alimentarius>. Acesso em: 26 de novembro de 2015.

MONROY, M. A. R. et al. Dynamics of porcine circovirus type 2 infection and neutralizing antibodies in subclinically infected gilts, and the effect on their litters. **Revista Colombiana de Ciências Pecuárias**, v. 28, p. 218-228, 2015.

MORÉS, N.; BARCELLOS, D.; ZANELLA, J. C. Circovirose suína. In: SOBESTIANSKY, Jurij; BARCELLOS, David (Org.). **Doenças dos suínos**. 1. ed. Goiânia: Canone, 2007. p.213-225.

PESCADOR, C. A. et al. Co-infection by porcine circovirus type 2 and porcine parvovirus in aborted fetuses and stillborn piglets in southern Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.27, 10. ed., p. 425-429, 2007.

QUINN, P.J. et al. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. 1. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

REGNUM PROKARYOTAE. **Rappaport-Vassiliadis médium**. Disponível em: <<http://www.tgw1916.net/recipes/RV.html>>. Acesso em: 15 de outubro de 2015.il.color.

RITTERBUSCH, G. A. et al. Natural co-infection of torque teno virus and porcine circovirus 2 in the reproductive apparatus of swine. **Research in Veterinary Science**, v. 92, 3. ed., p. 519–523, 2012.

SALGADO, R. L. et al. Identification of an emergent porcine circovirus-2 in vaccinated pigs from a Brazilian farm during a postweaning multisystemic wasting syndrome outbreak. **Genome Announcement**, v. 2, n.2, pg. 1-2, 2014.

SANTOS, J. R. et al. A importância do controle de *Salmonella* na cadeia produtiva de frango de corte. **Scientiae Agraria Paranaensis**, v. 12, n. 3, p. 167-174, 2013.

SANTOS L. R.; NASCIMENTO V. P.; FLORES M. L. *Salmonella* enteritidis isoladas de amostras clínicas de humanos e de alimentos envolvidos em episódios de toxinfecções alimentares, ocorridas entre 1995 e 1996, no estado do Rio Grande do Sul. **Higiene Alimentar**, v. 16, n. 102/103, p. 93-99, 2002.

SCHWARZ, P. et al. Frequência de suínos soropositivos para *Salmonella* sp. em granjas afetadas em diferentes níveis de severidade pela Síndrome Multissistêmica de Definhamento do Leitão Desmamado. **Acta Scientiae Veterinarie**, v. 38, n.2, p. 127 – 132, 2010.

SEARA ALIMENTOS. **História da Marca**. Disponível em: <<http://www.seara.com.br/seara/historia-da-marca/>>. Acesso em: 01 de dezembro de 2015.

SEGALÉS, J.; KEKARAINEN, T.; CORTEY, M. The natural history of porcine circovirus type 2: From an inoffensive virus to a devastating swine disease? **Veterinary Microbiology**, v. 165, 1-2. ed., p. 13-20, 2013.

\_\_\_\_\_. Porcine circovirus 2 immunology and viral evolution. **Porcine Health Management**, v. 1, 1. ed., p. 1-6, 2015.

SEGALÉS, J. **Porcine circovirus diseases: are still important?** Anais do 17º Congresso da ABRAVES, v. 1, 1. ed. online, p. 46-50, 2015.

\_\_\_\_\_. Porcine circovirus type 2 (PCV2) infections: Clinical signs, pathology and laboratory diagnosis. **Virus Research**, v. 164, pg. 10-19, 2012.

SESTI, L.A.C. Biosseguridade em granjas de reprodutores. In: MACARI, Marcos; MENDES, Ariel Antonio. **Manejo de Matrizes de Corte**. 2 ed. Campinas: FACTA, 2005. p. 243-317.

SILVA, E. N. da; ANDREATTI F., R. L. **Probióticos e prebióticos na avicultura**. Anais II Simpósio de Sanidade Avícola. Santa Maria, 2000.

SHINOHARA, N. K. S. et al. *Salmonella* spp., importante agente patogênico veiculado em alimentos. **Ciência & Saúde Coletiva**, v.13, n.5, p. 1675-1683, 2008.

SONCINI, R. A. **Controle da *Salmonella enteritidis* na Avicultura**. Anais do Congresso Brasil Sul de Avicultura, 2004. Disponível em: <[http://www.cnpsa.embrapa.br/sgc/sgc\\_publicacoes/anais0204\\_bsa\\_soncini.pdf](http://www.cnpsa.embrapa.br/sgc/sgc_publicacoes/anais0204_bsa_soncini.pdf)>. Acesso em: 29 de novembro de 2015.

THOMAS, M. E. et al. Quantification of horizontal transmission of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis bacteria in pair-housed groups of laying hens. **Applied and Environmental Microbiology** v. 75, n. 19, p. 6361-6366, 2009.

TROXELL B. et al. Poultry body temperature contributes to invasion control through reduced expression of *Salmonella* pathogenicity island 1 genes in *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Enteritidis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 23, p. 8192–8201, 2015.

UFRGS. **Diagnóstico de infecções virais**. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/labvir/material/CBS6008/CBS6008-3.pdf>>. Acesso em: 03 de dezembro de 2015.

UFT. ELISA. Disponível em: <[http://www.uft.edu.br/parasitologia/pt\\_BR/exames/elisa/definição/index.html](http://www.uft.edu.br/parasitologia/pt_BR/exames/elisa/definição/index.html)>. Acesso em: 02 de dezembro de 2015.

WINN, W. C. et al. **Koneman, diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido**. 6. ed. Rio de Janeiro: Koogan, 2010.

ZLOTOWSKI, P. et al. Necrotic enterocolitis in pigs naturally infected by porcine circovirus type 2. **Ciência Rural**, v. 39, n.6, p. 1801-1807, 2009.

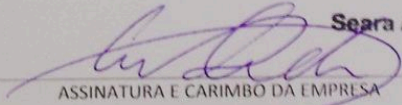
## ANEXO A – Certificado Do Estágio Curricular Supervisionado Em Medicina Veterinária

**ESTAGIAR**  
Programa de Estágio

### ATESTADO HORAS ESTAGIADAS

Atestamos, a pedido que o Senhor (a) ISIS BURTET JANKUS devidamente matriculado (a) no do Curso MEDICINA VETERINÁRIA da UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA, portador do CPF 053.856.669-80, realizou o estágio em nesta Empresa, no período de 17/08/2015 a 02/12/2015, perfazendo um total de 450 horas, onde desenvolveu as atividades destacadas no plano de estágio anexo.

Seara, 02 de Dezembro de 2015.

  
ASSINATURA E CARIMBO DA EMPRESA  
**Seara Alimentos**  
SEARA ALIMENTOS LTDA  
Edson Schneider  
CPF: 036.846.859-33  
Procurador