



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA

RELATÓRIO DO ESTÁGIO SUPERVISIONADO OBRIGATÓRIO (ESO), REALIZADO NO LABORATÓRIO DE ANÁLISES EM ALIMENTOS E PATOLOGIA ANIMAL LTDA, MUNICÍPIO DE RECIFE – PE, BRASIL.

DESCRIÇÃO DE CASO: ISOLAMENTO E TIPIFICAÇÃO SOROLÓGICA DE *SALMONELLA* spp PROVENIENTES DE MATERIAIS AVÍCOLAS, PROCESSADOS NO LANAPA NO PERÍODO DE MARÇO A SETEMBRO DE 2020.

RAISSA SANTANA RENOVATO

RECIFE, 2020



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA

DESCRIÇÃO DE CASO: ISOLAMENTO E TIPIFICAÇÃO SOROLÓGICA DE *SALMONELLA* spp PROVENIENTES DE MATERIAIS AVÍCOLAS, PROCESSADOS NO LANAPA NO PERÍODO DE MARÇO A SETEMBRO DE 2020.

Relatório de Estágio Supervisionado Obrigatório (ESO) realizado como exigência parcial para a obtenção do grau de Bacharel(a) em Medicina Veterinária, sob Orientação da Profa. Dra. Mércia Rodrigues Barros.

RAISSA SANTANA RENOVATO

RECIFE, 2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- R419r Renovato, Raissa Santana
Relatório do estágio supervisionado obrigatório (ESO), realizado no Laboratório de Análises em Alimentos e Patologia Animal LTDA, município de Recife - PE, Brasil: Descrição de caso: Isolamento e tipificação sorológica de *Salmonella* spp provenientes de materiais avícolas, processados no LANAPA no período de março a setembro de 2020. / Raissa Santana Renovato. - 2021.
39 f. : il.
- Orientadora: Mercia Rodrigues Barros.
Inclui referências.
- Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Bacharelado em Medicina Veterinária, Recife, 2021.
1. Avicultura. 2. Sanidade. 3. Salmonella. 4. Sorologia. 5. Diagnóstico. I. Barros, Mercia Rodrigues, orient. II. Título

CDD 636.089



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA

DESCRIÇÃO DE CASO: ISOLAMENTO E TIPIFICAÇÃO SOROLÓGICA DE *SALMONELLA* spp PROVENIENTES DE MATERIAIS AVÍCOLAS, PROCESSADOS NO LANAPA NO PERÍODO DE MARÇO A SETEMBRO DE 2020.

Relatório elaborado por:

RAISSA SANTANA RENOVATO

Aprovado em 14/01/2021

BANCA EXAMINADORA

[REDACTED]

Profa. Dra. MÉRCIA RODRIGUES BARROS

Departamento de Medicina Veterinária – UFRPE

[REDACTED]

EDUARDO FELIPE DA COSTA

Laboratório de Análises de Alimentos e Patologia Animal

[REDACTED]

Msc. SARUANA MILLENA DOS SANTOS CLEMENTE

Médica Veterinária

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me dado saúde e força, além de ter me guiado por todo este caminho.

A Universidade Federal Rural de Pernambuco, por ter me acolhido por seis anos praticamente.

A turma SV3 por ter me recebido tão bem no último ano de faculdade.

A todos os meus grandes professores, por serem a base para tudo que sei hoje.

A minha orientadora Mércia Rodrigues Barros, pelo carinho, suporte e grande paciência, que continua me inspirando todos os dias.

A todos os discípulos da Professora Mércia, já que sem eles eu não saberia nem 10% do que sei hoje.

Aos meus pais Roger Renovato e Rosemary Santana e a minha família, por estarem sempre por perto, me ajudando por todo este caminho.

A minha irmã Raiane Renovato, por estar sempre me ouvindo e me ajudando nas apresentações.

Aos meus primos, especialmente Camilla, Marcelo e Ruan, por, mesmo de longe sempre estarem por perto desde que nascemos.

As pessoas que cresceram comigo no colégio e querendo ou não, me aturam até hoje, Catarina Gama, Juliana Rodrigues, Marco Antônio, Maria Beatriz, Maria Luiza Maranhão e Sandrelly Menezes.

Clara Corrêa e Luiza Almeida por todos os momentos e companheirismo.

Ao meu supervisor Eduardo Costa e toda equipe do LANAPA por terem me recebido de braços abertos e não pouparem esforços ao me ensinarem.

A todos que estiveram ao meu lado por estes seis anos, muito obrigada!

EPÍGRAFE

*Diga-me, e eu esquecerei, ensina-me,
e eu poderei lembrar,
envolva-me, e eu aprenderei.
Benjamin Franklin.*

LISTA DE IMAGENS

Imagem 1. Caldo Tetracionato sendo transferido para os tubos de ensaio.....	16
Imagem 2. Amostras de SAR reagentes e não reagentes.....	17
Imagem 3. Exposição de placas com meios de cultura, em incubatório ao lado da placa controle.....	19
Imagem 4. Coleta de papel e de penugem, respectivamente.....	20
Imagem 5. Coleta de papel e de penugem, respectivamente.....	20
Imagem 6. Teste de contato dos ovos.....	22
Imagem 7. Etapa do plaqueamento.....	28
Imagem 8. Bioquímico suspeito para <i>Salmonella</i>	30
Imagem 9. Bioquímico complementar citados no quadro 4, suspeito para <i>Salmonella</i>	31
Imagem 10. Bioquímico complementar citados no quadro 4, suspeito para <i>Salmonella</i>	31
Imagem 11. Fluxograma referente a sorologia para tipificação de <i>Salmonella</i>	33

LISTA DE QUADROS E GRÁFICO

Quadro 1. Quantidades de amostras de soro necessárias para realizar a Soro aglutinação rápida (SAR) frente a MG, MS e <i>Salmonella Pullorum</i> (SP) de acordo com a idade das aves.....	17
Quadro 2. Características das colônias suspeitas para <i>Salmonella</i> spp. de acordo com o ágar utilizado.....	29
Quadro 3. Característica de cada bioquímico quando positivo para os sorovares de <i>Salmonellas</i> que constam no PNSA.....	30
Quadro 4. Resultado positivo do bioquímico complementar para os sorovares de <i>Salmonellas</i> que constam no PNSA.....	30
Quando 5. Fórmulas antigênicas dos soros polivalentes para cada sorovar de <i>Salmonella</i>	31
Quadro 6. Diferenciação bioquímica de <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> sorovares Pullorum e Gallinarum.....	32
Gráfico 1. Sorovares de <i>Salmonellas</i> presentes em materiais avícolas, processados no LANAPA de março a setembro de 2020, de acordo com a idade do lote de aves.....	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AE	Encefalomielite Aviária
APV	Pneumovirus Aviário
AS	Ágar Sabouraud
AVB	Ágar Verde Brilhante
BHI	Caldo de Infusão de Cérebro e Coração
CAV	Anemia infecciosa das galinhas
DMV	Departamento de Medicina Veterinária
DSA	Departamento de Saúde Animal
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
ESO	Estágio Supervisionado Obrigatório
Fi	Frequência Absoluta
IBD	Doença infecciosa da bolsa de Fabricius
IBV	Bronquite infecciosa aviária
IEC	International Electrotechnical Commission
IN	Instrução Normativa
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
ISO	International Organization for Standardization
LANAPA	Laboratório de Análises de Alimentos e Patologia Animal
LIA	Ágar Lisina Descarboxilase
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MG	<i>Mycoplasma galisepticum</i>
µl	Microlitros
MS	<i>Mycoplasma synoviae</i>
NA	Ágar Nutriente Semi-sólido
NBR	Norma Brasileira
NDV	Doença de Newcastle
OIML	International Organization of Legal Metrology
PNSA	Programa Nacional de Sanidade Avícola
REO	Reovírus Aviário
SAR	Soro Aglutinação Rápida
SIM	Sulfeto Indol Motilidade
SVO	Serviço Veterinário Oficial
TSI	Tríplice Açúcar Ferro
UFRPE	Universidade Federal Rural de Pernambuco

RESUMO

Este presente trabalho relata as atividades que foram desenvolvidas durante o Estágio Supervisionado Obrigatório (ESO), iniciado dia 02 de março de 2020, que foi pausado no dia 19 de março de 2020 devido à pandemia e retomado dia 24 de agosto de 2020, sendo finalizado no dia 12 de novembro de 2020 no Laboratório de Análises de Alimentos e Patologia Animal (LANAPA), onde foi realizado o isolamento, bioquímico e tipificação sorológica de *Salmonella* spp provenientes de propé e swab de fundo de caixa, que foram processados no LANAPA no período de março a setembro 2020, realizado em aves de um dia de vida até 29 dias de vida. A posterior sorotipagem dos isolados sugestivos de *Salmonella* spp foi realizada, com envio das amostras para o laboratório INTEGRALAB, quando o cliente solicitava. Os dados obtidos a partir da sorologia para tipificação e sorotipagem foram que das 28 amostras positivas, 3,57% das amostras foram positivas em aves de um a nove dias de vida para *Salmonella enterica* subsp. Havana, 46,42% das aves apresentaram amostras positivas para aves com 10 a 19 dias de idade para *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar: Anatum, Muenchen, Schwarzengrund, Minnesota, Ohio, Saintpaul, Entérica e Abany, e 50,0% das amostras positivas foram de aves com 20 a 29 dias para *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar: Havana, Anatum, Muenchen, Schwarzengrund, Newport, Infantis e Meleagridis. 12 subespécies diferentes de *Salmonellas* foram identificadas pela sorologia, tipificação e sorotipagem, dentre elas estavam as *Salmonellas enterica* subsp. *enterica* sorovar: Abany, Meleagridis, Saintpaul, Infantis, Ohio, Newport, Minnesota, Schwarzengrund, Muenchen, Anatum e Havana, sendo o sorovar Havana tido como o mais prevalente. O que alerta para a necessidade de uma melhora na sanidade das granjas para que haja uma maior qualidade de vida das aves e conseqüentemente dos produtos provenientes das mesmas, entregando para os consumidores um produto de qualidade.

Palavras-chaves: avicultura; sanidade; *salmonella*; sorologia; diagnóstico.

ABSTRACT

The present project reports the activities devolved on the Obligated Supervised Internship, started on March 2, 2020, which was interrupted on March 19, 2020, because of the pandemic and restarted August 24, 2020, and concluded on November 12, 2020, on Laboratório de Análises de Alimentos e Patologia Animal (LANAPA), place where the isolation was made, biochemical test and serologic typification of *Salmonella* spp, whose came from medical shoe cover and swab from transport's box and processed on LANAPA during March to September 2020 on poultry with one day to 29 days life. After the serologic typification, the suggestive isolates of *Salmonella* were sent to INTEGRALAB laboratory when the client requested. The results obtained from the serology and typification are 28 positive samples, 3,57% of the samples are positive on poultry between one and nine days of living to *Salmonella enterica* subsp. Havana, 46,42% of the samples are positive on poultry between 10 to 19 days of living to *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar: Anatum, Muenchen, Schwarzengrund, Minnesota, Ohio, Saintpaul, Enterica e Abany, and 50,0% of the samples are positive on poultry between 20 to 29 days of living to *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar: Havana, Anatum, Muenchen, Schwarzengrund, Newport, Infantis and Meleagridis. 12 different subspecies of *Salmonella* were identified with the serology and tipification, those were *Salmonellas enterica* subsp. *enterica* serovar: Abany, Meleagridis, *enterica* subsp. *enterica*, Saintpaul, Infantis, Ohio Newport, Minnesota, Schwarzengrund, Muenchen, Anatum and Havana, and the Havana serovar being the most prevalent. That alerts to the claim on an improvement of the sanity of the poultry to develop the quality of life of the poultry and consequently, the improvement on the products, giving to the consumers a product with quality.

Keywords: poultry; health; *salmonella*; serology; diagnostic.

SUMÁRIO

1. CAPÍTULO I	13
1.1. INTRODUÇÃO	13
1.2. DESCRIÇÃO DO LOCAL	13
1.3. DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES DO ESO	15
1.3.1. Limpeza.....	15
1.3.2. Recebimento das Amostras.....	15
1.3.3. Preparação dos Caldos e Meios de Cultura.....	15
1.3.4. Sorologia.....	16
1.3.4.1. Soro Aglutinação Rápida (SAR).....	17
1.3.4.2. Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA).....	18
1.3.5. Isolamento e sorotipagem de <i>Salmonella</i>	18
1.3.6. Teste Micológico de Pulmão.....	19
1.3.7. Monitoria.....	19
1.3.7.1. Exposição de Placa.....	19
1.3.7.2. Coleta de Papel e Penugem.....	20
1.3.7.3. Análise Bacteriológica da Água e Análise do Desinfetante.....	21
1.3.7.4. Teste de Contato dos Ovos.....	22
2. CAPÍTULO II	23
2.1 REVISÃO DE LITERATURA	23
2.2 DESCRIÇÃO DO CASO	26
2.2.1. Pré-enriquecimento.....	27
2.2.2. Enriquecimento.....	27
2.2.3. Plaqueamento.....	28
2.2.4. Testes bioquímicos.....	29
2.2.5. Sorologia para Tipificação.....	31
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
2.4 CONCLUSÃO	36
REFERÊNCIAS	37

1. CAPÍTULO I

1.1 INTRODUÇÃO

Para a elaboração do presente trabalho, foi realizado o Estágio Supervisionado Obrigatório (ESO) no Laboratório de Análises de Alimentos e Patologia Animal LTDA (LANAPA), iniciado no dia 02 de março de 2020, que foi pausado no dia 19 de março de 2020 devido a pandemia e retomado dia 24 de agosto de 2020, sendo finalizado no dia 12 de novembro de 2020, totalizando 420 horas totais sobre a supervisão do Médico Veterinário Eduardo Felipe da Costa. Objetivou-se com o presente trabalho relatar a rotina exercida em um laboratório de diagnóstico credenciado, obter experiência para exercer a profissão no mercado de trabalho e colocar em prática o conhecimento teórico-prático adquirido durante o curso de Bacharelado em Medicina Veterinária do Departamento de Medicina Veterinária (DMV) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

1.2. DESCRIÇÃO DO LOCAL

O LANAPA é um laboratório particular credenciado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA pela portaria 261, de 06 de dezembro de 2019 e acreditado pelo Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia – INMETRO, número de acreditação CRL 0899, localizado na Rua Paes Cabral, Nº 228, Bairro do Cordeiro em Recife – PE. Sua estrutura compreende em: Recepção, sala de triagem, sala de sorologia, sala de bacteriologia, sala de meio de cultura, sala de esterilização, área externa, copa, sala de reunião, administração e sanitário.

O LANAPA tem como principal objetivo a análise de produtos oriundos de incubatórios, granjas de frangos de corte, granjas de poedeiras comerciais e granjas de matrizes. Todos os protocolos seguidos pelo laboratório são baseados nas seguintes Instruções Normativas (IN) e Portarias:

- Instrução Normativa do MAPA Nº 20, de 21 de outubro de 2016.
- Instrução Normativa do MAPA Nº 44, de 23 de agosto de 2001.
- Instrução Normativa do MAPA Nº 57, de 11 de dezembro de 2013.
- Instrução Normativa do MAPA Nº 78, de 3 de novembro de 2003.
- Portaria do MAPA Nº 126, de 03 de novembro de 1995.
- Portaria Nº 208, de 20 de dezembro de 1994.
- Norma NBR ISO/IEC 17025:2017

São realizadas análises tanto de amostras oficiais quanto não oficiais. Por mês, são recebidos em média 4650 soros de aves para análise oficial e 1098 amostras para realização do isolamento de *Salmonella* spp. As análises oficiais são para o diagnóstico de *Salmonellas enterica* subsp. *enterica* sorovar: Gallinarum, Pullorum, Enteritidis e Typhimurium e para *Mycoplasma gallisepticum* (MG) e *Mycoplasma synoviae* (MS) presentes no Programa Nacional de Sanidade avícola – PNSA, para realização dos seguintes testes:

- Diagnóstico bacteriológico realizando isolamento, identificação bioquímica e caracterização antigênica dos sorovares de *Salmonella* Gallinarum, Pullorum, Enteritidis e Typhimurium.
- Diagnóstico imunológico para pesquisa de anticorpos contra *Mycoplasma gallisepticum* (MG) e *Mycoplasma synoviae* (MS) através da técnica de soro aglutinação rápida (SAR).
- Diagnóstico sorológico através de soro aglutinação rápida (SAR), pesquisando anticorpos para a *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Pullorum.
- Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA) para *Mycoplasma gallisepticum* (MG) e *Mycoplasma synoviae* (MS).

Além dos exames oficiais, credenciados pelo MAPA, também são realizados ensaios não oficiais sendo estes:

- Análise e diagnóstico bacteriológico para *Salmonella* spp., *Escherichia coli* e *Clostridium* sp. em swab de fundo de caixas de transporte, swab de arrasto, swab de cloaca, propé de cama aviária, órgãos ovos comerciais, ovos férteis bicados, material de cama aviária, cama de ninho e fezes.
- Monitoria sanitária de incubatórios, realizando a análise bacteriológica e micológica da água, das penugens de pintos de um dia, ovos férteis e do papel que é colocado nas caixas de transporte de pintos de um dia de idade provenientes de incubatório.
- Teste de antibiograma.
- Teste de eficiência de desinfetante.
- Necropsia de aves.
- Micológico de pulmão.
- Análise e diagnóstico bacteriológico de ovos comerciais.

- Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA) para Bronquite infecciosa aviária (IBV), Doença infecciosa da bolsa de Fabricius (IBD), Doença de Newcastle (NDV), Anemia infecciosa das galinhas (CAV), Pneumovírus Aviário (APV), Retrovírus Aviário (REO) e Encefalomielite Aviária (AE).

1.3. DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES DO ESO

1.3.1. Limpeza

A limpeza do laboratório é feita todos os dias antes do expediente começar com hipoclorito de sódio a 1%. As geladeiras e estufas são higienizadas quinzenalmente. Para a avaliação da eficiência da higienização, é feita a cada 15 dias a exposição de placas em todas as salas do laboratório, utilizando placas contendo ágar nutriente (AN) para a pesquisa de bactérias e ágar sabouraud (AS) para a pesquisa de fungos. As placas são expostas ao ambiente durante 15 minutos, incubadas a 35°C a 37°C por no mínimo 48 horas para em seguida serem lidas.

1.3.2. Recebimento das Amostras

As amostras que são enviadas para o laboratório passam por uma triagem onde são avaliados: acondicionamento, temperatura, documentação (Termo de colheita oficial), sua conformidade com as legislações e adequação aos procedimentos do LANAPA. As amostras que estiverem de acordo, são identificadas e etiquetadas pelo laboratório. Também é preenchido um formulário com os dados essenciais do cliente, onde são preenchidas, assinadas e arquivadas permitindo assim a rastreabilidade das amostras, devendo ser guardadas por cinco anos, de acordo com o que é preconizado pelas portarias N° 126, de 03 de novembro de 1995 e N° 208, de 20 de dezembro de 1994. Após a identificação as amostras passam para a bacteriologia ou sorologia.

Quanto aos tipos de amostras, são recebidas e analisadas: Propé de cama aviária, ovos comerciais, ovos férteis bicados, soro sanguíneo, carcaça de frango, mecônio, aves mortas, swab de cloaca, swab de arrasto, órgãos (coração, fígado, baço, ceco, oviduto), farinha de pena, farinha de víscera, farinha de carne, gordura animal e óleo de frango.

1.3.3. Preparação dos Caldos e Meios de Cultura

Uma vez por semana, todos os meios de cultura são preparados para atender o montante de amostras recebidas na rotina. Para isto, primeiramente é feita a higienização da sala de meio de cultura com hipoclorito de sódio a 1%, e todos os equipamentos que vão ser utilizados são

previamente testados para comprovar sua eficiência. Para a autoclave, é utilizado previamente um emulador químico (fita que ao atingir 121°C, muda sua coloração) juntamente com um controle biológico para comprovar a eficiência da esterilização. A balança utilizada é calibrada anualmente por uma empresa pertencente à rede Brasileira de Acreditação e acreditado pelo INMETRO, e uma vez ao mês é realizada a verificação intermediária do equipamento utilizando pesos padrões de classe F1 (caracterizados segundo a OIML R111 por serem pesos destinados à verificação inicial dos pesos de classe F₂ e para o uso como instrumento de pesagem para a classe I de precisão especial e para a classe II de alta precisão), que são calibrados e certificados. Para conferir o pH dos meios preparados, é utilizado um pHmetro que, por sua vez, antes de ser utilizado, é feita a calibração utilizando três soluções tampões de referência e certificados, onde é conferido a capacidade do pHmetro de medir pH ácido, neutro e alcalino. Após o teste dos equipamentos, os meios são feitos a partir das instruções do fabricante presentes no rótulo e as instruções presentes na Portaria N° 126, de 03 de novembro de 1995. Após serem preparados, os caldos e meios podem ser utilizados imediatamente ou serem armazenados em refrigeração em temperatura entre 2°C e 8°C.



Imagem 1. Caldo tetratonato sendo transferido para os tubos de ensaio.
Fonte: Arquivo pessoal (2020).

1.3.4. Sorologia

A sorologia é um método de triagem bastante utilizado na avicultura para o estudo e mensuração da reação antígeno-anticorpo, tendo como objetivo averiguar a produção de anticorpos das aves, monitorar a resposta imunológica das vacinas utilizadas, adequar o esquema de vacinação das granjas, detectar desafios de campo, etc.

1.3.4.1. Soro Aglutinação Rápida (SAR)

A sorologia rápida é um dos testes indireto de triagem utilizado para a pesquisa de anticorpos para *Mycoplasma gallisepticum* (MG), *Mycoplasma synoviae* (MS) e *Salmonella enterica* subsp *enterica* sorovar Pullorum. A SAR é um método qualitativo de eleição para a triagem de animais que apresentam anticorpos anti-micoplasma, sendo considerado um teste extremamente rápido, sensível na detecção de imunoglobulinas do tipo IgM, e barato quando comparado a outros métodos (CARDOSO, 2009). Para a realização do teste, utiliza-se o antígeno comercial da marca INATA®, uma placa de vidro dividida em quadrados de aproximadamente 3x3 cm, onde, com um micropipetador, são colocados inicialmente em uma proporção de 1:1, 30µl do soro juntamente 30µl do antígeno para serem homogeneizados e misturados durante dois minutos. O resultado é considerado reagente quando há formação de grânulos dentro do intervalo de dois minutos. As amostras que forem reagentes na diluição de 1:2, vão ser diluídas em 1:4, utilizando 90µl de solução salina a 0.85 % com 30µl do soro. As amostras que forem reagentes nas diluições de 1:4 são separadas para a realização do ELISA. A quantidade de soros testados varia de acordo com a idade da ave e para qual doença está se procurando os anticorpos, como está descrita no quadro 1, de acordo com o que é preconizado pela Instrução Normativa do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) N° 44, de 23 de agosto de 2001.

Quadro 1. Quantidade de amostras de soro necessárias para realizar a Soro aglutinação rápida (SAR) frente a MG, MS e *Salmonella* Pullorum (SP) de acordo com a idade das aves.

Idade das aves	Nº de soros para MG	Nº de soros para MS	Número de soros para SP*
12 Semanas	300	100	100
Início de produção (5%)	150	100	500
A cada 3 meses	150	100	100

**Salmonella* Pullorum, a SAR é realizada apenas em aves que não são vacinadas.

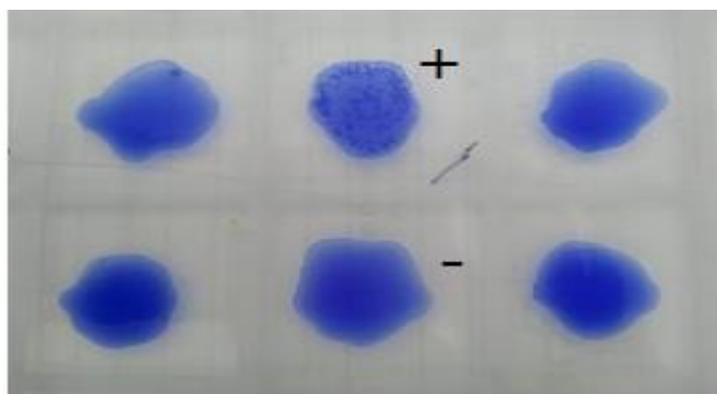


Imagem 2. Amostras de SAR reagentes e não reagentes. += Amostra reagente; - = Amostra não reagente.
Fonte: Arquivo pessoal (2020).

1.3.4.2. Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA)

É um método de diagnóstico que se destaca, devido a sua elevada sensibilidade e especificidade, baseando-se na reação entre antígeno-anticorpo, sendo monitorada por medida da atividade enzimática, detectando quantidades extremamente pequenas de antígenos ou anticorpos, podendo ter elevada precisão se os reagentes e os parâmetros utilizados forem padronizados. Dentre suas vantagens, destaca-se a utilização de reagentes estáveis, poder ser adaptado tanto para testes simples como para automação sofisticada, podendo ser empregado com uma variedade de sistemas de detecção, que vão de leituras visuais a fotométricas, com substratos coloridos, fluorescentes ou luminescentes, etc.

Para a realização do teste, são adquiridos kits comerciais específicos para cada doença que é diagnosticada pelo LANAPA, onde cada kit contém placas que foram previamente impregnadas com antígenos inativados do patógeno. Primeiramente é realizada a diluição de 1:500, onde se utiliza 1µl da amostra com 500µl da solução diluente para assim, serem colocados na placa impregnada com o antígeno. A placa é colocada para descanso por 30 minutos, neste período, se houver anticorpos contra o patógeno procurado no soro, haverá ligação do mesmo com o antígeno impregnado presente na placa, formando um complexo antígeno anticorpo. Após os 30 minutos, é feita a lavagem da placa onde os orifícios que não tiverem gerado o complexo antígeno anticorpo serão removidos. Após a lavagem, é adicionado o reagente conjugado, que é marcado com uma enzima cuja função é de se ligar aos anticorpos que atuam no patógeno. Este processo acontece em um intervalo de 30 a 60 minutos, dependendo do kit utilizado. Após este período, é feita outra lavagem da placa para remover o conjugado não reativo, para em seguida, adicionar o substrato tamponado, este contém um tampão com cofatores enzimáticos responsáveis por alterar a cor do orifício que tiver a presença de anticorpos, também variando sua duração de 15 e 30 minutos para ocorrer à reação, dependendo do kit utilizado. Por fim é adicionada a solução de interrupção com a finalidade de parar a reação e conseguir medir a absorbância a partir da mensuração dos títulos de anticorpos utilizando um espectrofotômetro.

1.3.5. Isolamento e sorotipagem de *Salmonella*

No Brasil, o método de isolamento e sorotipagem para *Salmonella* spp., de amostras oficiais e não oficiais é preconizado no Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA) pela portaria N° 126, de 03 de novembro de 1995 denominado "método microbiológico

convencional". Este método por sua vez é dividido em cinco etapas: pré-enriquecimento, enriquecimento seletivo, plaqueamento, testes bioquímicos e sorotipagem.

1.3.6. Teste Micológico de Pulmão

O micológico de pulmão é um teste não oficial realizado pelo LANAPA para a pesquisa qualitativa de fungos, onde é retirado da carcaça da ave que foi enviada, um fragmento do pulmão para serem plaqueado em ágar sabouraud (AS), que por sua vez são incubados em estufa entre 35°C a 37°C por 72 horas, para posteriormente ser realizada a leitura.

1.3.7. Monitoria

A monitoria é feita nos incubatórios uma vez no mês, onde preferencialmente um dos médicos veterinários do laboratório vai para o incubatório e realiza testes não oficiais para diagnóstico, dentre eles estão: o teste de exposição de placa contendo meios de cultura, teste de imprint da casca dos ovos em placas contendo meio de cultura, análises bacteriológicas: da água, do desinfetante, de penugem e de papel.

1.3.7.1. Exposição de Placa

São utilizadas placas que contém ágar nutriente (AN) para a pesquisa de bactérias e ágar sabouraud (AS) para a pesquisa de fungos, onde são expostas em pontos de controle para confirmar a eficiência da higienização do local. As placas são colocadas abertas em salas como: sala de incubação, sala de pré-aquecimento, sala de eclosão, dentro das máquinas de incubação, sala de papel e na sala de vacina durante 15 minutos. Além das placas abertas, é colocada no ambiente uma placa controle fechada e lacrada, para determinar se houve contaminação do meio no laboratório, enquanto estava sendo produzido.

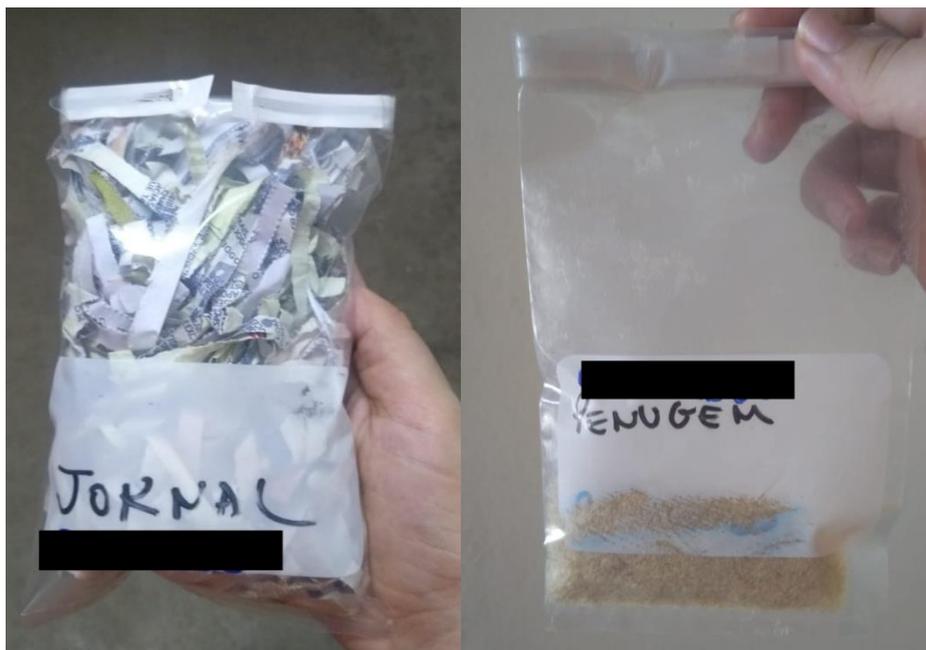
Ao chegarem ao laboratório, às placas são incubadas em estufa com 35°C a 37°C por 48 horas, e posteriormente são lidas. É verificada a presença ou ausência de bactéria e fungo nos respectivos ágares citados acima, sendo uma análise quantitativa.



Imagem 3. Exposição de placas com meios de cultura, em incubatório ao lado da placa controle.
Fonte: Arquivo pessoal (2020).

1.3.7.2. Coleta de Papel e Penugem

São coletados em média no mínimo um grama do papel que fica armazenado na sala de papéis e um grama de penugem presentes nas máquinas de nascimento, utilizando um saco plástico estéril e uma tesoura também esterilizada, para a realização do teste micológico a partir do papel e da penugem, onde é pesquisando apenas a presença de fungos que podem ser observados macroscopicamente.



Imagens 4 e 5. Coleta de papel e de penugem, respectivamente.
Fonte: Arquivo pessoal (2020).

Ao chegar ao laboratório, tanto a penugem quanto o papel são pesados individualmente em uma balança previamente calibrada, retirando um grama de penugem e um grama de papel, que são colocados separadamente em sacos plásticos estéreis e adicionados em cada um, 10 ml de água peptonada a 1%.

O saco plástico estéril contendo o papel com água peptonada a 1% é levado para uma cabine de segurança biológica e utilizando um pipetador, são retirados 1 ml e colocado em uma placa estéril, onde será adicionado 15 ml de ágar sabouraud. O processo é repetido desta vez utilizando 0,1ml. O método utilizado neste caso é o “método pour plate”, onde as placas são incubada em estufa a 35°C por no mínimo 48 horas, posteriormente as placas são lidas.

O mesmo processo é utilizado para as penugens, utilizando o “método pour plate” onde a saco contendo a penugem com água peptonada a 1% é levado para uma cabine de segurança biológica, retirados 1 ml da água e colocado em uma placa estéril, onde será adicionado 15 ml

de ágar sabouraud. O processo é repetido utilizando 0,1ml. Após no mínimo 48 horas em estufa a 35°C, em seguida as placas são lidas.

1.3.7.3. Análise Bacteriológica da Água e Análise do Desinfetante

A água a ser analisada é proveniente das torneiras dos incubatórios, para a coleta, primeiramente a torneira é aberta e os primeiros mililitros são desprezados para em seguida a água ser colocada em um frasco esterilizado. Ao chegar no laboratório, é feita a análise de coliformes totais utilizando o número mais provável, onde a água coletada é colocada em três tubos com três diluições diferentes (10ml, 1ml e 0,1ml) contendo caldo verde brilhante e o tubo de Durhan para identificar a formação de gás. A amostra fica por 48 horas a 35°C e é positiva se após as 48 horas o caldo ficar turvo e houver a presença de gás no tubo de Durhan. Caso seja positivo, com o auxílio de uma tabela, é verificado o nível de contaminação da água de acordo com a quantidade de tubos que forem positivos para a presença de coliformes nas diferentes diluições.

Para testar a eficiência do desinfetante, primeiramente é preparado um pool de bactérias em dois mililitros de solução salina a 0,85%. O desinfetante, por sua vez, é diluído previamente de acordo com a recomendação do fabricante. São separados quatro tubos para diferentes diluições. São feitas as diluições:

Tubo 1: 9,9 ml de solução salina a 0,85% para 0,1 ml do pool de bactérias,

Tubo 2: 9,7 ml da solução salina a 0,85% para 0,3 ml do pool de bactérias.

Tubo 3: 1 ml do desinfetante diluído para 1 ml do pool de bactérias retirado do tubo contendo 0,1 ml do pool de bactérias (tubo 1).

Tubo 4: 1 ml do desinfetante diluído para 1 ml do pool de bactérias retirado do tubo contendo 0,3 ml do pool de bactérias (tubo 2).

Os tubos 3 e 4 são agitados e são aguardados entre 20 a 40 minutos. Após este período, são separadas duas placas de petri, uma para ser adicionado 1 ml da solução do tubo 3 e uma para ser adicionado 1 ml da solução do tubo 4. Em seguida é adicionado nas duas placas ágar nutriente a 35°C e as placas são incubadas entre 36°C a 37°C por 24 a 36 horas. Após a incubação, é realizada a leitura das placas. Se houver crescimento de colônias nas placas, o ensaio é considerado positivo.

1.3.7.4. Teste de Contato dos Ovos

Para este teste, são utilizadas placas contendo ágar nutriente (AN). Após a higienização das mãos com álcool a 70%, são escolhidos quatro ovos de lotes pré-determinados pelo médico veterinário do local, e é feito o imprint da casca do ovo das regiões do ápice, base e média, em placas contendo ágar nutriente, com o objetivo de pesquisar a presença de leveduras. Ao chegar ao laboratório, às placas são mantidas por 24 horas em uma estufa de 35°C, após este período é feita a análise quantitativa da presença de leveduras.



Imagem 6. Teste de contato dos ovos.
Fonte: Arquivo pessoal (2020).

2. CAPÍTULO II

DESCRIÇÃO DE CASO: ISOLAMENTO E TIPIFICAÇÃO SOROLÓGICA DE *SALMONELLA* spp PROVENIENTES DE MATERIAIS AVÍCOLAS, PROCESSADOS NO LANAPA NO PERÍODO DE MARÇO A SETEMBRO DE 2020.

2.1. REVISÃO DE LITERATURA

Segundo a Embrapa (2019), em 2019 foram produzidos no Brasil aproximadamente 13,245 milhões de toneladas de carne de frango, tornando o Brasil o 3º maior produtor de carne de frango do mundo, sendo 68% da produção voltada para mercado interno e 32% voltados para a exportação. Quanto o ranking mundial voltado para exportação, o Brasil ocupa o 1º lugar tendo em média 4,2 milhões de toneladas de carne de frango produzidas sendo exportadas. Já no mercado de ovos, em 2019 foram produzidas 49,055 bilhões de unidades, tendo 99,59% da produção voltadas para o mercado interno e 0,41% voltados para a exportação (sendo em média 7,698 mil toneladas de ovos exportados).

Infecções alimentares tem se enquadrado nos últimos anos, como um grande problema de saúde pública, devido às ocorrências de contaminação alimentar por microrganismos patológicos (ANDRADE, 2010). No caso, infecções alimentares ocasionadas por *Salmonella* é considerado um problema de escala mundial para a saúde pública (Rodrigues, 2002). Estima-se que infecções por *Salmonella* causem mais de 90 milhões de casos de diarreia por ano em todo o mundo, sendo 85% dos casos associados a alimentos (CHLEBICZ, 2018).

A *Salmonella* é uma bactéria que pertencente à família Enterobacteriaceae, sendo caracterizadas em um gênero de duas espécies: *Salmonella enterica*, com 2.610 sorovares, e *Salmonella bongori*, com 23 sorovares. A espécie *enterica* é subdividida em seis subespécies sendo elas: *enterica*, *salamar*, *arizonae*, *diarizonae*, *hutnae* e *indica* (BRASIL, 2011). São caracterizadas por se tratarem de bacilos, Gram negativos, não esporulados (BARATTO, 2012), móveis em sua grande maioria com exceção dos sorovares Pullorum e Gallinarum que não apresentam motilidade (ICMSF, 1996). Destas, a espécie *enterica* subespécie *enterica* são consideradas as mais importantes, contemplando os sorovares: Gallinarum (biovars Gallinarum e Pullorum) e ainda Enteritidis e Typhimurium (BRASIL, 2011)

Essa bactéria em aves pode causar três enfermidades, a pulorose causada pela *Salmonella* Pullorum, o tifo aviário causado pela *Salmonella* Gallinarum que são sorovares que ao serem consumidos não afetam a saúde humana, mas podem causar perdas significativas na indústria de produção. A outra enfermidade é o paratifo aviário que tem como agente causador em destaque a *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium (BRASIL, 2011).

A pulorose é uma enfermidade causada pela *S. Pullorum* e pode afetar aves de qualquer idade, porém é mais comum nas três primeiras semanas, provoca alta taxa de mortalidade e refugagem em pintainhos e a principal forma de disseminação é a transmissão vertical. O tifo aviário por sua vez tem como agente etológico a *S. Gallinarum* que é extremamente semelhante a *S. Pullorum* (JÚNIOR, 2018). Ela se destaca por poder levar a grandes perdas causando queda na produção, alta mortalidade (podendo chegar a 40 a 80%) sendo as aves adultas mais susceptíveis podendo apresentar apatia, prostração, anorexia, dispnéia, anemia e diarreia amarelo-esverdeada (JÚNIOR, 2018). A terceira enfermidade é o paratifo aviário que tem como agente causador qualquer outro agente que não foi citado anteriormente, mas pode ser destacado a *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium, neste caso ao ser consumido um alimento contaminado os humanos podem adoecer (CORRÊA, 2020).

Alguns sorovares de *Salmonella* estão mundialmente disseminadas, como é o caso de *Salmonella* sorovar Enteritidis e *Salmonella* sorovar Typhimurium, que são os principais sorovares encontrados em infecções de humanos em todos os continentes, em uma proporção geral de 43,5% e 17,1%, respectivamente. Outros sorovares, como *Salmonella* sorovar Infantis também apresentam distribuição mundial, mas com menor prevalência (HENDRIKSEN, 2011). A *Salmonella* sorovar Minnesota já foi relatada como um dos cinco principais sorovares encontrados em carne de frango no Brasil, entre 2007 e 2011 (COSTA, 2013). Segundo Oliveira (2016), em sua pesquisa foi isolado em alimentos de origem avícola, ambiente de abate, abatedouros e estabelecimentos comerciais um total de 59 sorovares de *salmonella enterica* no estado de Goiás, e foram destacadas algumas subespécies como: Schwarzengrund (45,76%), Anatum (10,16%), Infantis (3,38%), Newport (3,38%), Saintpaul (3,38%) e Ohio (1,69%). Scur (2014) pesquisou *Salmonella* em swab de arrasto de galpões de granjas de aves, de cloaca de frangos de corte e de ração entre o período de 2006 a 2010, no estado do Paraná, e identificaram os sorovares Enteritidis (16,1%) e Saintpaul (4,2%).

De acordo com Silva (2012) as contaminações em alimentos acontecem por meio de agentes químicos, físicos e biológicos. Produtos agrícolas não processados, como hortaliças e frutas, e os alimentos de origem animal, como as carnes cruas, o leite e os ovos são veículos frequentes de *Salmonellas*. A contaminação de origem fecal é geralmente a fonte para os produtos agrícolas, pela exposição à água contaminada. Segundo o Ministério da Saúde para o leite e os ovos, por meio da exposição direta; e para a carne, usualmente durante as operações de abate. Seu principal reservatório é o trato gastrointestinal (TGI) do homem e animais, entre a última categoria destaque para as aves. É uma bactéria transmitida principalmente por

consumo de produtos de origem avícola contaminados (RINCÓN, 2011). Além disso, é amplamente difundida na natureza e pode ser encontrada em todos os elos da produção de aves (BARATTO, 2012).

Ao ser ingerida, a bactéria *Salmonella* penetra e passa pela camada epitelial intestinal, atinge e penetra na camada onde as células epiteliais estão ancoradas (lâmina própria), e se multiplicam. As células de defesa do sistema imunológico como macrófagos e monócitos fagocitam essas bactérias, ocasionando uma resposta inflamatória. Neste caso, ocorre uma infecção na mucosa intestinal, resultando em uma diarreia aquosa. Vale ressaltar que para ocorrer uma gastroenterite, é necessário que seja ingerida uma quantidade significativa do número de *Salmonellas* e depende também do sorotipo, alcançando a dose infectante (SHINOHARA, 2008).

Para a realização do diagnóstico de *Salmonella*, o Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA) recomenda como teste de monitoramento dos plantéis, a detecção de anticorpos anti-*Salmonella* por meio de provas de SAR, aglutinação lenta em tubos, microaglutinação e como teste de diagnóstico confirmatório o isolamento e identificação de *Salmonella* por bacteriologia convencional e métodos moleculares. O PNSA, regulamentado em 1994, estabeleceu o controle permanente de *Salmonella* em aves destinadas à reprodução e em incubatórios e, além destes, o controle eventual em frangos de corte e poedeiras comerciais (BRASIL, 2009)

De acordo com a Instrução Normativa Nº 20, de 21 de outubro de 2016, núcleos de frangos ou perus de corte que apresentarem aves positivas para *Salmonella* deverão realizar: fermentação das camas de todos os aviários do núcleo ou outro tratamento aprovado pelo Departamento de Saúde Animal - DSA/SDA/MAPA, capaz de inativar as *Salmonellas*; remoção e descarte de toda a cama e do esterco do núcleo após o tratamento previsto na legislação, sendo proibida a reutilização no alojamento de aves; limpeza e desinfecção das instalações e equipamentos após a remoção de toda a cama e esterco do aviário; adoção de vazio sanitário de no mínimo, de quinze dias depois de concluídos os procedimentos de limpeza e desinfecção dos galpões; e investigação para identificar a fonte de infecção e as vias de transmissão para as aves, bem como adoção de um plano de ação para prevenção de novas infecções (BRASIL, 2016). Sendo de responsabilidade do médico veterinário a comprovação da realização desses procedimentos para o Serviço Veterinário Oficial (SVO).

O PNSA exige como medida de biossegurança e controle sanitário o sacrifício ou abate sanitário das aves reprodutoras de linhagem puras, bisavós e avós positivas para *Salmonella*

Gallinarum, *Salmonella Pullorum*, *Salmonella* sorovar Enteritidis e Typhimurium. Em matrizes é permitido o controle para *Salmonellas* paratíficas, como é o caso das *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovares Typhimurium e Enteritidis) através de antibioticoterapia e vacinação (ALCÂNTARA, 2015)

2.2. DESCRIÇÃO DO CASO

Foi feito um levantamento dos resultados que foram positivos para os sorovares de *Salmonella*, de materiais avícolas exigidos no PNSA enviados para o LANAPA durante o período de março a setembro de 2020, sendo estes Propé de cama aviária, ovos comerciais, ovos férteis bicados, soro sanguíneo, carcaça de frango, mecônio, aves mortas, swab de cloaca, swab de arrasto, órgãos (coração, fígado, baço, ceco, oviduto), farinha de pena, farinha de víscera, farinha de carne, gordura animal e óleo de frango. No total, foram 28 isolados positivos neste período provenientes de propés e swab de fundo de caixa.

Para diagnosticar a *Salmonella*, foi feito o isolamento, bioquímico, tipificação sorológica de diversas amostras oficiais enviadas ao LANAPA, e a posterior sorotipagem dos isolados positivos para *Salmonella* spp., com envio das amostras para o laboratório INTEGRALAB, quando o cliente solicitava. Ao chegarem ao laboratório, segundo a Instrução Normativa do MAPA Nº 20, de 21 de outubro de 2016, as amostras devem estar bem acondicionadas, em temperatura entre 2°C a 8°C e apresentarem no seu formulário de coleta no mínimo: número do formulário de coleta, o número do lacre da amostra, a data da coleta da amostra, o Município e Unidade Federativa (UF) do estabelecimento avícola, identificação do estabelecimento avícola, o número de registro do estabelecimento avícola no Serviço Veterinário Oficial (SVO), a identificação da empresa integradora ou cooperativa (quando houver), o nome do proprietário do estabelecimento avícola, o cadastro de Pessoa Física (CPF) ou Cadastro Nacional de Pessoa Jurídica (CNPJ) do proprietário (quando for o caso), a identificação do núcleo de origem das aves e o número total de galpões existentes no núcleo, a identificação do galpão amostrado, a idade das aves, o tipo de ave: frango ou galinha, o tipo e quantidade de amostras coletadas, o meio de conservação utilizado e a identificação e assinatura do médico veterinário. Se estiverem de acordo, as amostras são identificadas e etiquetadas pelo laboratório para ser realizado o isolamento, que é dividido em cinco etapas: pré-enriquecimento, enriquecimento seletivo, plaqueamento, testes bioquímico e sorologia para tipificação.

2.2.1. Pré-enriquecimento

Foi realizado de swab de fundo de caixas de transporte, swab de arrasto, swab de cloaca e propé de cama aviária são as amostras que necessitam do pré-enriquecimento, etapa realizada para recuperar células injuriadas. Para isto, é adicionado ao material água peptonada 1% para ser incubado em temperatura de 35°C a 37°C entre 18 a 24 horas, para em seguida ir para a etapa de enriquecimento seletivo.

2.2.2. Enriquecimento

Para os órgãos coletados (coração, fígado e baço), é feito o enriquecimento não seletivo homogeneizando o material e inoculando proporcionalmente 2g em 20ml de caldo de infusão de cérebro e coração (BHI) para serem incubados entre 35°C a 37°C por 18 a 24 horas. Para o enriquecimento seletivo, o material é homogeneizado e é colocado proporcionalmente 2g em 20ml de caldo Tetrionato e 0,2g em 20ml de caldo Rappaport-Vassiliadis, para serem incubados em temperatura de 42°C a 43°C por 18 a 24 horas.

No caso de ovos comerciais, primeiramente é feita a desinfecção da casca do ovo utilizando álcool a 70%. O ovo é aberto e a gema é separada da clara para ser homogeneizada em um saco plástico estéril ou stomacher, para ser transferido proporcionalmente 10ml em 100ml de caldo BHI. As amostras são incubadas entre 35°C a 37°C por 18 a 24 horas.

Para os ovos férteis bicados, também é feita a desinfecção da casca do ovo com álcool a 70%, para assim coletar dos pintos separadamente um pool de órgãos: coração, fígado e baço; um pool de ceco e um pool de gema, para serem homogeneizados e inoculados separadamente em uma proporção de 2g em 20ml de caldo Tetrionato e 0,2g em 20ml de caldo Rappaport-Vassiliadis, para serem incubados em temperatura de 42°C a 43°C por 18 a 24 horas.

Para material de cama aviária, cama de ninho e swab de arrasto é realizado o enriquecimento não seletivo, homogeneizando o material e inoculando proporcionalmente 2g em 20ml de caldo de infusão de cérebro e coração (BHI) para serem incubados entre 35°C a 37°C por 18 a 24 horas. Para o enriquecimento seletivo, o material é homogeneizado e é colocado proporcionalmente 2g em 20ml de caldo Tetrionato e 0,2g em 20ml de caldo Rappaport-Vassiliadis, para serem incubados em temperatura de 42°C a 43°C por 18 a 24 horas.

Fezes passam apenas pelo enriquecimento seletivo, onde o material é homogeneizado e é colocado proporcionalmente 2g em 20ml de caldo Tetrionato e 0,2g em 20ml de caldo Rappaport-Vassiliadis, para serem incubados em temperatura de 42°C a 43°C por 18 a 24 horas.

2.2.3. Plaqueamento

A etapa seguinte é a do plaqueamento, onde, segundo o MAPA devem ser utilizados no mínimo dois meios de cultura seletivos para *Salmonella* spp. No caso do LANAPA, os ágares que são utilizados podem ser o ágar MacConkey, o ágar Hecktoen e/ou o ágar Verde Brilhante (AVB).

A partir dos caldos de enriquecimento seletivo e não seletivo, utilizando uma alça descartável, são feitas estrias em placas contendo um dos três ágaros citados para serem incubados a 35°C a 37°C por 18 a 24 horas. Após este período é feita a leitura das placas, procurando por colônias características de *Salmonella*, que variam suas características fenotípicas de acordo com o ágar utilizado, como é descrito no quadro 2. Caso as placas apresentem elevado grau de contaminação, é feito o re-isolamento, selecionando colônias características para *Salmonella* e estriando novamente nas placas contendo um dos três ágaros citados para serem novamente incubados a 35°C a 37°C por 18 a 24 horas. As colônias que forem suspeitas para *Salmonella* são submetidas aos testes bioquímicos.



Imagem 7. Etapa do plaqueamento a partir do caldo Tetratonato e caldo Rappaport-Vassiliadis.
Fonte: Arquivo pessoal (2020).

Quadro 2. Características das colônias suspeitas de *Salmonella* spp de acordo com o ágar utilizado.

Ágar	Colônias Suspeitas
Ágar macconkey	Colônias pequenas, incolores e translúcidas
Ágar hecktoen	Colônias verde azuladas com ou sem centro negro
Ágar verde brilhante	Colônias rosáceas, translúcidas ou ligeiramente opacas

2.2.4. Testes bioquímicos

As colônias que forem suspeitas de *Salmonella* spp na etapa de plaqueamento passam para a próxima etapa que são os testes bioquímicos, onde as colônias são repicadas em: ágar tríplice açúcar ferro (TSI), ágar lisina descarboxilase (LIA), sulfeto indol motilidade (SIM) e caldo ureia. Além destes, a amostra também é adicionada em ágar nutriente para caso seja

necessário, ser possível utilizar as colônias suspeitas na próxima etapa. Os meios de cultura são incubados a 35°C a 37°C por 18 a 24 horas, para em seguida serem interpretados, onde serão considerados característicos para *Salmonella* se os quatro meios estiverem como é descrito no quadro 3, que por sua vez, está de acordo com o que é mencionado na portaria do MAPA N° 126, de 03 de novembro de 1995.

Para o TSI, é necessário realizar três interpretações: Caso a base esteja inalterada: Significa que a glicose não foi fermentada, caso contrário a base torna-se amarela. Se houver produção de gás surgem algumas bolhas ou ocorre o deslocamento do meio de cultura. Se a superfície permanece inalterada ou se torna vermelha: Significa que a lactose e a sacarose não foram fermentadas, se houver fermentação, a superfície fica amarela. Já a produção de H₂S se traduz por escurecimento do meio na junção da base com o bisel.

No caso do LIA, nota-se alteração na base e na superfície. A base púrpura e a superfície púrpura: significa que há presença de lisina descarboxilase. Caso a base seja amarela e superfície vermelha ou púrpura: Significa que há ausência de lisina descarboxilase. A presença de H₂S se traduz por escurecimento do meio na junção da base com bisel.

Já para o SIM, A presença de H₂S se traduz por escurecimento do meio no ponto ou ao redor da picada. O crescimento limitado ao ponto da picada significa que a cepa é imóvel, enquanto que o crescimento difuso representa motilidade. E a pesquisa de indol será feita pela adição de algumas gotas do reativo de Kovacs, que se apresentar anel vermelho o teste é positivo, caso o anel torne-se amarelo, o teste é negativo.

Por fim, para a ureia, se o caldo apresentar a mudança da cor laranja para vermelho-cereja indica a presença de urease.

Quadro 3. Característica de cada bioquímico quando positivo para os sorovares de *Salmonella* que constam no PNSA.

Reação bioquímica	S. Enteritidis e Typhimurium	S. Gallinarum	S. Pullorum
TSI	Base: Amarela com gás Bisel: Vermelho Produção de H ₂ S	Base: Amarela com gás Bisel: Vermelho Produção de H ₂ S	Base: Amarela com gás Bisel: Vermelho Produção de H ₂ S variável
LISINA	Púrpura	Púrpura	Púrpura
SIM	Motilidade: + Indol: Amarelo	Motilidade: - Indol: Amarelo	Motilidade: - Indol: Amarelo
UREIA	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração



Imagem 8. Bioquímico suspeito de *Salmonella* spp. *SIM com indol negativo (anel amarelado)
Fonte: Arquivo pessoal (2020).

As amostras que apresentarem o perfil bioquímico compatível com o gênero *Salmonella* spp., passaram para a série bioquímica complementar, onde foram testadas para 16 meios, para assim identificar a subespécie da *Salmonella* agrupados no quadro 4.

Quadro 4. Resultado positivo do bioquímico complementar para os sorovares de *Salmonellas* que constam no PNSA.

Reação	<i>S. Enteritidis e Typhimurium</i>	<i>S. Gallinarum</i>	<i>S. Pullorum</i>
Vermelho de Metila (VM)	Vermelho +	Vermelho +	Vermelho +
Voges Proskauer (VP)	Amarelo -	Amarelo -	Amarelo -
Citrato de Simmons	Azul +	Verde -	Verde -
Fenilalanina	Sem alteração -	Sem alteração -	Sem alteração -
Lisina	Púrpura +	Púrpura +	Púrpura +
Arginina	Diferentes tipos	Amarelo -	Diferentes tipos
Ornitina	Púrpura +	Amarelo -	Púrpura +
Caldo base	Amarelo +	Amarelo +	Amarelo +
Malonato	Verde -	Verde -	Verde -
Glicose	Amarelo +	Amarelo +	Amarelo +
Produção de gás	Gás +	-	Diferentes tipos
Lactose	Rosa -	Rosa -	Rosa -
Sacarose	Rosa -	Rosa -	Rosa -
Manitol	Amarelo +	Amarelo +	Amarelo +
Dulcitol	Amarelo +	Amarelo +*	Rosa -
Maltose	Amarelo +	Amarelo	Rosa -**

(+*) Ocasionalmente pode ser negativo; (-**) Tardamente positiva.



Imagens 9 e 10. Bioquímico complementar citados no quadro 4, suspeito de *Salmonella*.
Fonte: Arquivo pessoal (2020).

2.2.5. Sorologia para Tipificação

Caso os isolados fossem positivos na série bioquímica complementar, era feita a sorologia para tipificação através da SAR para a caracterização antigênica das quatro *Salmonellas* descritas no PNSA (*Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovares Enteritidis, Typhimurium, Pullorum e Gallinarum). Para a identificação dos sorogrupos, são utilizados: o soro somático (O), o soro anti somático B (O4), o soro anti somático D (O9), o soro anti flagelar (H:i), o soro anti flagelar (H:2) e os soros antflagelar: H:g, H:m, H:p e H:q. Cada sorovar possui uma aglutinação específica, como é mostrado no quadro 5.

Quadro 5. Fórmulas antigênicas dos soros polivalentes para cada sorovar de *Salmonella*.

<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> sorovar	Aglutinação Positiva
Enteritidis	Poli O, O9, H:g e H:m
Typhimurium	Poli O,O4, Poli H, H:i, H:2
Gallinarum	Poli O, O9
Pullorum	Poli O, O9

O antígeno somático “O” é o primeiro a ser testado por ser o antígeno presente em todas as espécies de *Salmonella*, para isto, é adicionada em uma placa de vidro uma gota de solução salina 2% e separadamente uma gota do soro antissomático O, para acrescentar em cada uma, uma gota da suspensão bacteriana. Serão consideradas positivas, as amostras que apresentarem aglutinação enquanto estão sendo homogeneizadas dentro de um intervalo de dois minutos. Apresentando aglutinação para o antígeno O, as cepas que forem móveis, testado para o soro antissomático B (O4) e o soro antissomático D (O9), repetindo as mesmas etapas utilizadas para o antígeno O.

As cepas que aglutinarem para O4 devem ser testadas para os soros: anti-flagelar H:i, e anti-flagelar H:2, que quando positivo para os dois é confirmado o diagnóstico para *Salmonella*

enterica subsp. *enterica* sorovar Typhimurium. Neste caso em particular, deve ser observado se tanto o H:i quanto o H:2 apresentaram aglutinação no SAR. Caso apenas um dos dois apresente aglutinação, é necessário fazer com que a fase que não apareceu seja expressa para que o diagnóstico seja definitivo. Para isto, é realizada a inversão de fases, que consiste em inativar o antígeno que a *Salmonella* está expressando e promover a expressão do outro que está inativado, para isto, em uma placa contendo ágar nutriente semissólido (AN) ou SIM é adicionado o antissoro para a fase que foi expressa na aglutinação juntamente com a cepa, que é inoculada no centro da placa para ser incubada por aproximadamente 18 horas em uma estufa de 37°C. Para haver a inversão de fases, deve ser observado o crescimento difuso da cepa na placa após as 18 horas de incubação, confirmando que a cepa é positiva para *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Typhimurium. Caso não ocorra o crescimento difuso, significa que não houve inversão de fases, caracterizando a cepa como monofásica.

Cepas móveis que aglutinarem para O9 devem ser testadas para os soros anti-flagelar: H:g, H:m, H:p e H:q, se o resultado da SAR for: positivo para H:g e H:m e negativo para H:p e H:q, a cepa é positiva para *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Enteritidis.

No caso de cepas que aglutinarem para o antígeno O9 e forem imóveis, devem ser diferenciadas bioquimicamente para *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Pullorum e *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Gallinarum (quadro 6).

Quadro 6. Diferenciação bioquímica de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovares Pullorum e Gallinarum.

Diferenciação bioquímica	Sorovar Pullorum	Sorovar Gallinarum
Produção de H₂S (TSI)	Variável	H ₂ S Positivo
Fermentação do dulcitol	Rosa	Amarelo
Fermentação da maltose	Rosa	Amarelo
Fermentação de glicose/gás	Diferentes tipos	Negativo
Descarboxilação da Ornitina	Púrpura	Amarelo

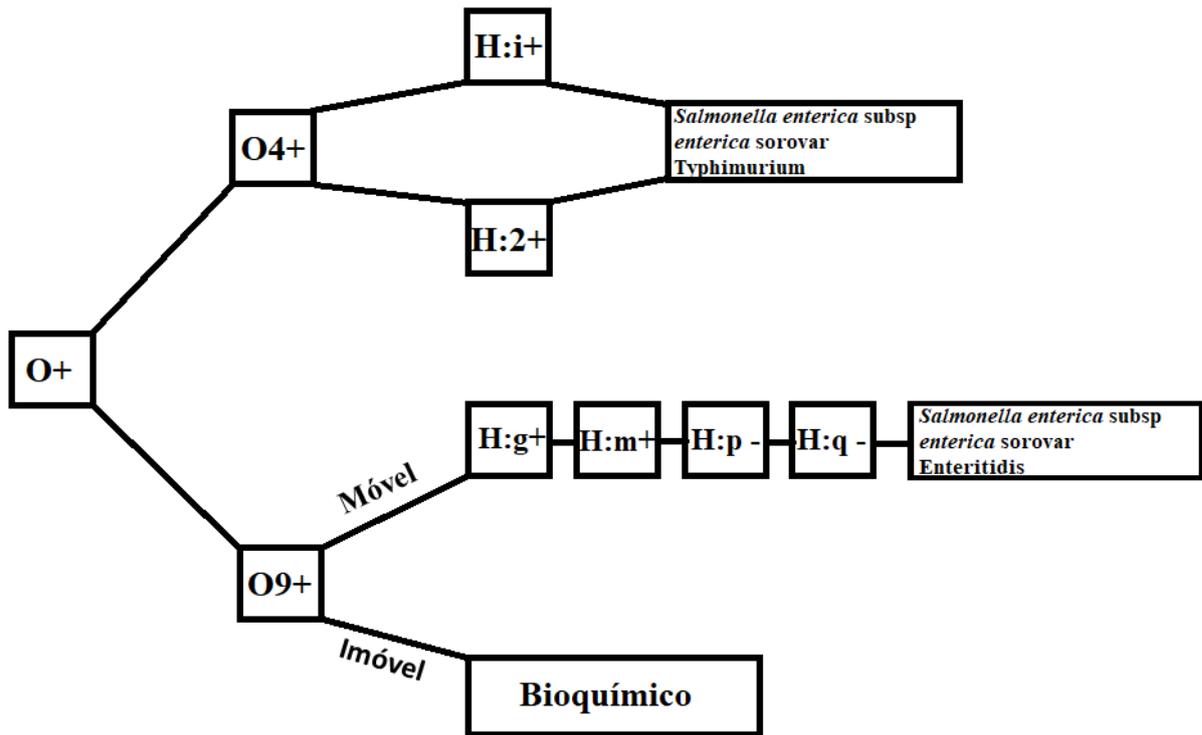


Imagem 11. Fluxograma referente a sorologia para tipificação de *Salmonella*.
Fonte: Arquivo pessoal (2020).

Todas as amostras que forem positivas para *Salmonella*, na tipificação sorológica são adicionadas em ágar nutriente (AN) para serem enviadas para o Laboratório Federal de Defesa Agropecuária (LFDA), localizado em São Paulo, responsável por receber todas as amostras positivas para *Salmonella* e armazená-las. A pedido de cada cliente do laboratório, caso as amostras enviadas sejam positivas para *Salmonella* spp, a cepa é enviada para outro laboratório (INTEGRALAB), que realiza a sorotipagem para saber exatamente qual é o sorovar da *Salmonella*.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No período de coleta de dados para o presente trabalho, não houve nenhuma amostra positiva para os quatro sorovares de *Salmonellas* descritos no PNSA, porém, foram identificadas 28 amostras positivas para outros sorovares de *Salmonella*, que estão descritos no gráfico 1, de acordo com a idade das aves (1-9 dias, 10-19 dias e 20-29 dias) provenientes de amostras de propés e swab de fundo de caixa. Os resultados obtidos a partir da sorotipagem realizada pelo INTEGRALAB foram que, 3,57% das amostras foram positivas em aves de um a nove dias de vida para *Salmonella enterica* subsp. Havana (Fi=2), 46,42% das aves

apresentaram amostras positivas para aves com 10 a 19 dias de idade para *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar: Anatum (Fi=10), Muenchen (Fi=3), Schwarzengrund (Fi=3), Minnesota (Fi=3), Ohio (Fi=1), Saintpaul (Fi=1), Entérica (Fi=1) e Abany (Fi=1), e 50,0% das amostras positivas foram de aves com 20 a 29 dias para *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar: Havana, Anatum, Muenchen, Schwarzengrund, Newport (Fi=1), Infantis (Fi=1) e Meleagridis (Fi=1).

De todos os materiais coletados de acordo com o que é preconizado pela IN do MAPA Nº 78, de 03 de Novembro de 2003, apenas os propés e uma amostra de swab de fundo de caixa obtiveram resultados positivos para *Salmonella*.

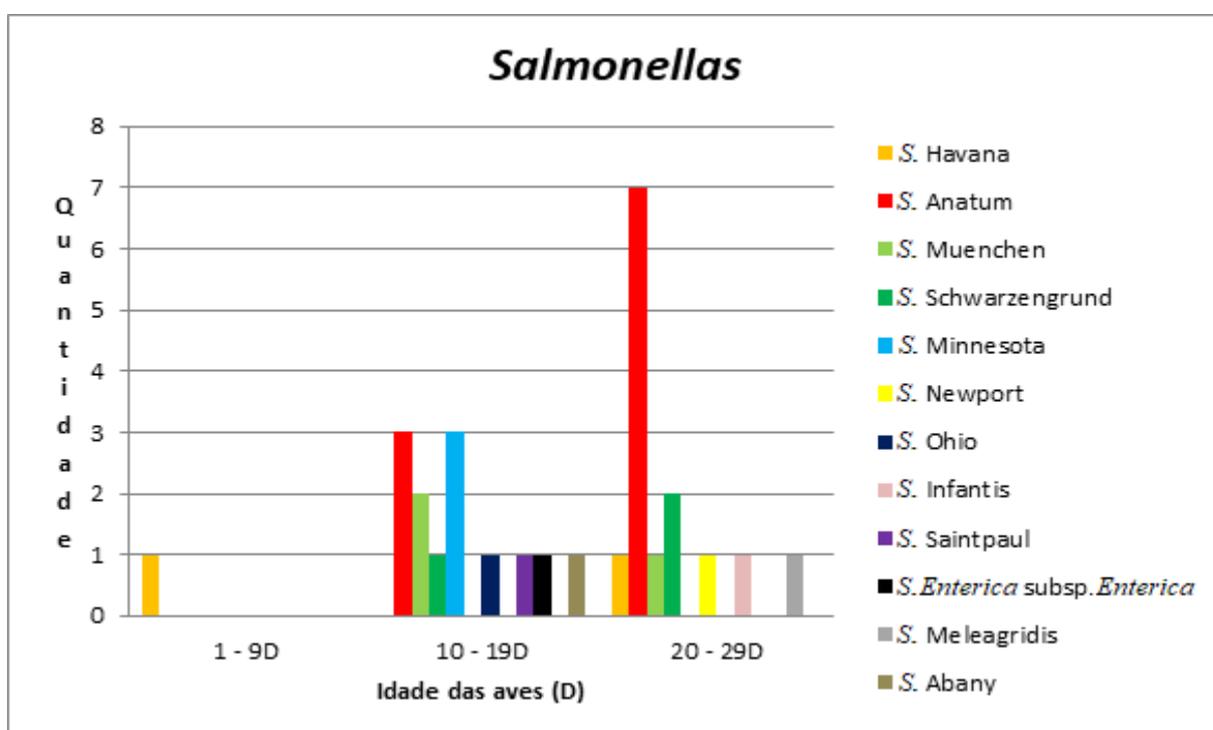


Gráfico 1. Sorovares de *Salmonellas* presentes em materiais avícolas, processados no LANAPA de março a setembro de 2020, de acordo com a idade do lote de aves.

De todas as amostras positivas, duas coisas importantes devem ser ressaltadas, primeiro que apenas a amostra positiva em aves de um a nove dias foi proveniente de swab de fundo de caixa de transporte das aves e esta mesma amostra é a única que pertence a uma granja de matriz, todos os outros resultados foram provenientes de propés que foram coletados em granjas de frangos de corte. Este resultado se deu devido ao nível de biosseguridade presente nas granjas de aves de matriz, que são muito mais criteriosas quando comparadas as granjas de aves para corte, o que consequentemente diminui a incidência de patógenos na granja.

Quanto aos materiais analisados, das 28 amostras que apresentaram positividade para *Salmonella*, 27 foram provenientes de propés (*Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar:

Havana (Fi=2), Anatum (Fi=10), Muenchen (Fi=3), Schwarzengrund (Fi=3), Minnesota (Fi=3), Newport (Fi=1), Ohio (Fi=1), Infantis (Fi=1), Saintpaul (Fi=1), Entérica (Fi=1), Meleagridis (Fi=1), Abany (Fi=1)) enquanto apenas uma amostra foi proveniente de swab de fundo de caixa (*Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Havana (Fi=2)).

No total, 3,57% das amostras foram positivas em granjas que possuíam aves de um a nove dias de vida, 46,42% das granjas apresentaram amostras positivas para aves com 10 a 19 dias de idade e 50,0% das amostras positivas foram de granjas com aves entre 20 a 29 dias de idade.

A idade de aves que apresentaram a maior incidência de amostras positivas foram as de 20 a 29 dias, que é a idade mais próxima do abate das aves que são destinadas para corte, isto ocorre porque o tempo de incubação da *Salmonella* pode chegar até 21 dias, então torna-se mais difícil o diagnóstico da bactéria em aves mais jovens por causa do período incompleto da incubação. Segundo o Programa Nacional de Sanidade Avícola o lote que vai ser abatido deve apresentar resultado negativo para os quatro sorovares de *Salmonellas* que constam no PNSA.

De acordo com Tessari (2003), no período de junho a dezembro de 2002, foram examinados 130 lotes de pintos de corte recém-nascidos, onde cada lote continha 10 pintainhos. Os resultados mostraram que dos 130 lotes examinados, 32 (24,62%) apresentaram resultado positivo para *Salmonella*, sendo 24 (18,46%) *Salmonella* Enteritidis e 8 (6,15%) *Salmonella enterica* subespécie *enterica* (O: 9,12). Enquanto Queiroz (2020) relatou que os principais sorovares isolados em amostras de carcaças de frango na região Oeste do estado do Paraná, no período entre março de 2017 e fevereiro de 2019 foram a *Salmonella* Typhimurium, *S. Infantis* e *S. Minnesota* que ocorreram em 1,3% das amostras analisadas.

Segundo Falabretti (2019) que pesquisou *Salmonella* em diferentes substratos de cama de aviário e em 14 swabs de arrasto, 7,14% foi positiva para *Salmonella* Havana, 28,57% para *Salmonella* Muenchen e a maior prevalência foi do sorovar da *Salmonella* Schwarzengrund com 35,72%. De acordo com Oliveira (2016), em sua pesquisa realizada no estado de Goiás em alimentos de origem avícola, ambiente de abate, abatedouros e estabelecimentos comerciais foram identificadas no total 59 sorovares de *salmonella enterica* subsp. *enterica*, onde foram destacadas Schwarzengrund (45,76%), Anatum (10,16%), Infantis (3,38%), Newport (3,38%), Saintpaul (3,38%) e Ohio (1,69%).

Com estes dados podemos observar que apesar de todas as medidas de prevenção adotadas pelas granjas, as *Salmonellas* continuam sendo um grave problema para a avicultura industrial e, conseqüentemente, para a saúde pública, já que o consumo de carne de frango

continua crescendo, havendo necessidade de estudos que mostrem a importância de programas de controle e prevenção para *Salmonella* e se esses sorovares tem importância para saúde pública.

2.4. CONCLUSÃO

De acordo com o presente trabalho, foi identificada a presença de vários sorovares de *Salmonella* em diferentes idades de produção, porém em apenas dois tipos de amostras oriundas de aves, pontuando que primeiramente, quanto maior a idade das aves, maior a possibilidade de ser diagnosticada *Salmonella* na produção avícola, e amostras como propés e swab de fundo de caixa, de todos os materiais analisados como é preconizado pela IN do MAPA N° 20, de 21 de outubro de 2016, são os que oferecem melhor ambiente para o crescimento de *Salmonella*, o que nos alerta para a necessidade de tanto melhorar a sanidade das granjas quanto a necessidade de atualizar as instruções normativas, que regem todas as normas que as granjas devem seguir, para que assim haja uma melhora tanto na qualidade de vida das aves quanto na qualidade dos produtos provenientes das mesmas, entregando para os consumidores um produto de qualidade.

REFERÊNCIAS

ALCÂNTARA, J. B.; Pesquisa de *Salmonella sp.* em aves criadas em sistema industrial e alternativo, 74 f., Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2015.

ANDRADE, R. B.; GEMELLI, t.; ONDER, L. P. D.; CRISTINA, K.; BRITO, T.; BARBOZA, A. A. L.; BRITO, B. G. Métodos Diagnósticos para os Patógenos Alimentares: *Campylobacter sp.*, *Salmonella sp.* e *Listeria Monocytogenes*. **Arquivo Instituto Biológico**, São Paulo, v. 77, n. 4, p. 741-750, 2010.

BARATTO, C. M; GELINSKI, J. M. LN.; BERNARDI, A. Z; MARAFON, A; BRAUN, F. Potential use of molecular-typing methods for the identification and characterization of *Salmonella enterica* serotypes isolated in the poultry production chain. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 14, n. 3, p. 173-179, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. 2011. Manual Técnico de Diagnóstico Laboratorial da *Salmonella spp.* Brasília, DFF, 2011.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. Instrução Normativa Nº 78/2003.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - Instrução Normativa Nº 20, de 20 de outubro de 2016. Estabelece o controle e o monitoramento de *Salmonella spp.* nos estabelecimentos avícolas comerciais de frangos e perus de corte e nos estabelecimentos de abate de frangos, galinhas, perus de corte e reprodução, registrados no Serviço de Inspeção Federal (SIF) D.O.U n. 205, seção 1, p.13.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária Instrução Normativa Nº 78, de 03 de novembro de 2003. Aprova as Normas Técnicas para Controle e Certificação de Núcleos e Estabelecimentos Avícolas como livres de *Salmonella gallinarum* e de *Salmonella pullorum* e Livres ou Controlados para *Salmonella enteritidis* e para *Salmonella typhimurium*. Manual de Legislação. Brasília: Sislegis; 2009. 499p.

CARDOSO, B. Prevenção, Diagnóstico e Controle. Sorologia e Interpretação. **In** REVOLLEDO, L.; FERREIRA, A. J. P. Patologia Aviária, Barueri: **Editora Manole**, p.428-437, 2009.

CHLEBICZ, A.; SLIZEWSKA, K. Campylobacteriosis, Salmonellosis, Yersiniosis, and Listeriosis as Zoonotic Foodborne Diseases: A Review. **International Journal of Environmental Research and Public Health**. v. 15, n. 5, p. 863, 2018.

CORRÊA, D. F. Contaminação por *Salmonella* em Abatedouros de Aves, Programas de Prevenção e Pontos Críticos de Controle: Revisão de literatura (45 f.), Universidade Federal de Santa Catarina, Curitiba- SC, 2020.

COSTA, R. G.; FESTIVO, M. L.; ARAUJO, A. S.; REIS, E. M. F.; LÁZARO, N. S.; RODRIGUES, D.P. Antimicrobial susceptibility and serovars of *Salmonella* circulating in commercial poultry carcasses and poultry products in Brazil. **Journal of Food Protection**, v. 76, n. 12, p. 2011-2017, 2013.

EMBRAPA - EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Indicadores EMBRAPA: Estatística de Produção no Brasil. Disponível: <https://www.embrapa.br/suinos-e-aves/cias/estatisticas/ovos>. Acesso: 2020.

FALABRETTI, A. M.; FREITAS, E.; Levantamento de *Salmonella* spp. em Diferentes Substratos de Cama de Aviário, **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária**, v. 2, n. 2, p. 63-74, 2019.

HENDRIKSEN, R. S.; VIEIRA, A. R.; KARLSMOSE, S.; LO FO WONG, D. M. A.; JENSEN, A. B.; WEGENER, H. C.; AARESTRUP, F. M. Global Monitoring of *Salmonella* Serovar *Distribution* from the World Health Organization Global Foodborne Infections Network Country Data Bank: Results of Quality Assured Laboratories from 2001 to 2007. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 8, n. 8, p. 887-900, 2011.

ICMSF – International Commission on Microbiological Specifications for Foods. Microorganisms in Foods. 5ª ed. London: **Blackie Academic and professional**, 513 p, 1996.

JÚNIOR, I. R. M.; Pesquisa de anticorpos anti-*Salmonella Gallinarum* e *Salmonella Pullorum* em galinhas caipiras no município de Areia-PB, (28 f.), Universidade Federal da Paraíba, Areia, 2018.

OLIVEIRA, A. P. Susceptibilidade a antimicrobianos e genes de virulência em *Salmonella enterica* de Origem Avícola, (77 f.), Dissertação de Doutorado, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2016.

RINCÓN, D. P. A.; RAMÍREZ R. Y. R.; VARGAS J. C. M.; Transmisión de *Salmonella* enterica a través de huevos de gallina y su importancia en salud pública. **Revista Salud UIS**, v. 43, n. 2, p. 167-177, 2011.

RODRIGUES, L. B. Levantamento sorológico e detecção de *Salmonella* em granjas de postura comercial de pequeno porte em um município do Estado do Rio Grande do Sul. 2002. 88 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Veterinária – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2002.

SCUR, M. C.; PINTO, F. G. S.; BONA E. A. M.; WEBER, L. D.; ALVES, L. F.; MOURA, A. C. Occurrence and antimicrobial resistance of *Salmonella* serotypes isolates recovered from poultry of Western Paraná, Brazil. (72 f.), **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, 2014.

SHINOHARA, N. K. S., BARROS, V. B., JIMENEZ, S. M. C., MACHADO, E. C. L., DUTRA, R. A. F., FILHO, J. L. L. *Salmonella* spp. importante agente patogênico veiculado em alimentos. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 13, n. 5, p. 1675–1683, 2008.

SILVA, R. A. Ciência do alimento: contaminação, manipulação e conservação dos alimentos. (F. 37). Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira, 2012.

TESSARI, E. N. C.; CARDOSO, A. L. S. P.; CASTRO, A. G. M.; ZANATTA, G. F.; KANASHIRO, A. M. I. Incidência de *Salmonella* spp. em Pintos de Corte Recém-nascidos, **Arquivo Instituto Biológico**, v.70, n.3, p.279-281, 2003.

QUEIROZ, A. C.; Ocorrência da *Salmonella* spp. na Cadeia de Frango de Corte, 2020, 46f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista (Unesp), Araçatuba, 2020.