

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR PALOTINA
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO
ATIVIDADES DO ESTÁGIO SUPERVISIONADO OBRIGATÓRIO

Área: Laboratório de Sanidade Animal

Aluno: Laura Zanella Souza
Orientador: Prof. Dr. Nelson Luís Mello
Fernandes
Supervisor: Med. Vet. Joice Aparecida
Leão

Trabalho de conclusão de curso
apresentado, como parte das exigências
para a conclusão do Curso de Graduação
em Medicina Veterinária da Universidade
Federal do Paraná.

PALOTINA - PR,
Junho de 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

SETOR PALOTINA

CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

ATIVIDADES DO ESTÁGIO SUPERVISIONADO OBRIGATÓRIO

Área: Laboratório de Sanidade Animal

Aluno: Laura Zanella Souza

Orientador: Prof. Dr. Nelson Luís Mello
Fernandes

Supervisor: Med. Vet. Joice Aparecida
Leão

Trabalho de conclusão de curso
apresentado, como parte das exigências
para a conclusão do Curso de Graduação
em Medicina Veterinária da Universidade
Federal do Paraná.

PALOTINA - PR,
Junho de 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR PALOTINA
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO
ATIVIDADES DO ESTÁGIO SUPERVISIONADO OBRIGATÓRIO

Título: Relatório de atividades do estágio supervisionado
obrigatório

Área: Laboratório de Sanidade Animal

Aluno: Laura Zanella Souza GRR: 20113272

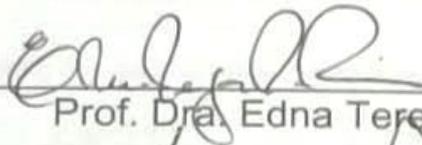
Orientador(a): Prof. Dr. Nelson Luis Mello Fernandes

Supervisor(a): Med. Vet. Joice Aparecida Leão

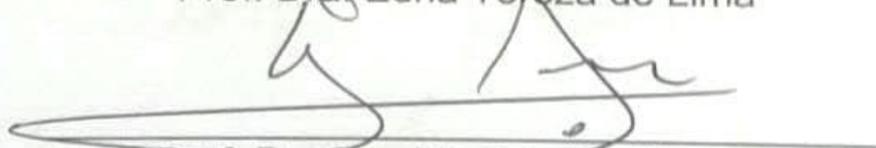
O presente Trabalho de Conclusão de Curso foi apresentado e aprovado
pela seguinte banca examinadora:



Prof. Dr. Nelson Luis Mello Fernandes
Orientador(a)



Prof. Dra. Edna Tereza de Lima



Prof. Dr. Geraldo Camilo Alberton

Palotina, 25, junho de 2018

AGRADECIMENTOS

Por primeiro, gostaria de agradecer aos animais —Chibi e Madonna, em especial—, que são o principal motivo de eu estudar cada vez mais. Não fosse eles eu definitivamente não estaria me graduando.

Agradeço à minha mãe, que me inspira todos os dias com seu amor infinito, mesmo que não esteja mais entre nós. Dedico a ela todas as conquistas da minha vida. Um dia vamos nos ver de novo.

Agradeço também ao meu pai. É graças a ele que estou realizando esse sonho.

Meu irmão Leonardo, que foi meu melhor amigo durante a faculdade, sempre me aconselhando e me amparando. Graças a ele eu enfrentei muitas coisas de cabeça erguida e em paz comigo mesma.

Meu irmão Alexandre, que sempre é a melhor companhia para uma boa conversa, seja qual for o assunto. Sempre vê e ressalta o melhor de mim como pessoa e me inspira a ser cada vez melhor.

Minha irmã Nicole conte sempre comigo, para te lembrar do quanto você é importante, inteligente e capaz do que quiser.

Meu namorado Gustavo, por nunca desacreditar de mim, em vezes que até eu desacreditei.

Agradeço aos professores da Universidade Federal do Paraná, setor Palotina, em especial as professoras Marivone Valentim Zabott, Aline de Marco Viott, Simone Benghi Pinto e ao meu professor orientador Nelson Luis Mello Fernandes. Gostaria de me tornar pelo menos metade do que vocês são.

Agradeço a UFPR – Palotina, pois sinto orgulho de fazer parte dessa casa que vai deixar muitas saudades.

Agradeço ao Laboratório de Análises Veterinárias MercoLab pela oportunidade de estágio e crescimento profissional. Conheci muitas pessoas que me motivaram e profissionais exemplares.

Agradeço aos amigos que fiz durante essa caminhada, e aos amigos que já faziam parte da minha vida antes dela começar. Principalmente Júlia, Izabel, Bárbara e Danielle.

Levo todos em meu coração com muito carinho.

RESUMO

O presente relatório descreve as atividades desenvolvidas e acompanhadas no período de 08 de janeiro a 15 de maio de 2018 no Laboratório de Análises Veterinárias MercoLab, durante a disciplina de Estágio Curricular Obrigatório Supervisionado do curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina. As atividades foram realizadas na área de análises laboratoriais veterinárias com foco em sanidade animal, sob a orientação do Prof. Dr. Nelson Luis Mello Fernandes e supervisão da Med. Vet. Joice Aparecida Leão. Durante o período de realização do estágio foram acompanhados processamentos de mais de 1000 amostras, em sua maioria para diagnósticos de caráter bacteriológico, bem como necropsias de aves, suínos e peixes. O objetivo deste trabalho é descrever a estrutura e o funcionamento do local do estágio, relatar as atividades realizadas e a casuística, além de breves relatos de necropsias acompanhadas.

Palavras-chave: Laboratório Veterinário; Sanidade animal; Necropsias.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Fachada do Laboratório de Análises Veterinárias MercoLab.....	13
Figura 2: Setor de Bacteriologia (A), Setor de PCR (B), Setor de Micotoxinas (C).....	13
Figura 3: Adição de meio de cultura não seletivo BHI em nasco estéril contendo amostra.	20
Figura 4: Tubos de ensaio contendo caldo Tetrionato (mais claro) e tubos de ensaio contendo caldo Rappaport Vassialidis (azul).	21
Figura 5: Colônias características de <i>Salmonella</i> spp. em meio Verde Brilhante e ágar Hektoen (respectivamente).	22
Figura 6: Tubos de ensaio contendo meios de cultura utilizados para teste de comportamento bioquímico de <i>Salmonella</i> spp.....	24
Figura 7: Superfície de vidro para realização do teste de soroglutinação rápida.	25
Figura 8: <i>Kit</i> IDEXX® para teste de ELISA utilizado pela sorologia.	26
Figura 9: Teste de Inibição da hemaglutinação em microcrolacas (fundo em “v”) de 96 orifícios.	27
Figura 10: Leitora de ELISA do setor de Micotoxinas. Modelo <i>Stat fax</i>	31
Figura 11: Termociclador para PCR em tempo real Rotor-Gene Q, MARCA QIAGEN.....	32
Figura 12: Processador automático de tecidos (histotécnico).	35
Figura 13: Posicionamento dos fragmentos de órgãos no fundo dos blocos de parafina.	36
Figura 14: Realizando os cortes do bloco no Micróto.	37
Figura 15: Lesões com aspecto de crostas na região dos olhos, bico e crista de ave, características de bouba aviária na forma cutânea.	41
Figura 16: Lesões cutâneas com aspecto de crostas, características de bouba aviária em uma ave infectada experimentalmente.	41
Figura 17: Lesões características de bouba aviária na forma diftérica, localizadas em bico, cavidade oral, e traquéia da ave.	42

Figura 18: Hiperplasia, degeneração baloniforme das células da epiderme e corpúsculos de inclusão intracitoplasmáticos. (Coloração de Hematoxilina e Eosina, aumento de 1000X).....	43
Figura 19: Hipertrofia e hiperplasia das células com inclusões intracitoplasmáticas da epiderme de Peru com suspeita de Boubá Aviária. (Coloração de Hematoxilina e Eosina, aumento de 400X).	43
Figura 20: Pleurite em leitão com suspeita de Doença de Glässer.	46
Figura 21: Meningite em leitão com suspeita de Doença de Glässer.....	46
Gráfico 1: Distribuição de encaminhamento das amostras acompanhadas no laboratório Mercolab, no período de 08/01 a 11/05/2018.	16
Gráfico 2: Distribuição de atividades realizadas e/ou acompanhadas no setor de Bacteriologia, no período de 08/01 a 11/05/2018.	17
Gráfico 3: Amostras acompanhadas e processadas de acordo com ISO 6579 e MAPA 126 no setor de Bacteriologia, no período de 08/01/2018 a 11/05/2018.	19
Gráfico 4: Distribuição de atividades realizadas e/ou acompanhadas no setor de sorologia, no período de 08/01 a 11/05/2018.	25
Gráfico 5: Necropsias acompanhadas e/ou realizadas no laboratório MercoLab, no período de 08/01 a 11/05/2018.	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação dos tipos de amostras para regulação do volume em relação ao padrão de pesagem.	18
Tabela 2: Identificação de gênero de <i>Salmonella</i> de acordo com comportamento bioquímico.	23
Tabela 3: Testes para diagnósticos sorológicos disponíveis no laboratório MercoLab.	28
Tabela 4: Exemplos de micotoxinas, fungos produtores e alimentos onde as mesmas podem ser encontradas.	29
Tabela 5: Conduta adotada para diluição das amostras com suspeitas de presença de micotoxinas.	30
Tabela 6: Possíveis diagnósticos moleculares para doenças de suínos e aves por meio de análise de PCR convencional e ou Real time, ofertadas pelo Laboratório MercoLab.	33

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BHI – *Brain Heart Infusion* (Infusão de cérebro-coração)

ELISA – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (Ensaio imunoenzimático)

HI – *Haemagglutination Inhibition Test* (Inibição da hemaglutinação)

ISO – *International Organization for Standardization* (Organização Internacional para Normalização)

LIA – *Lysine Iron Agar* (Ágar lisina-ferro)

MAPA – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento

PCR – *Polymerase Chain Reaction* (Reação em cadeia da polimerase)

SAL – Soroaglutinação lenta

SAR – Soroaglutinação rápida

SIM – *Syulphide Indol Motility* (Sulfito de Hidrogênio, Indol e Motilidade)

TSI – *Triple Sugar Iron Agar* (Ágar tríplice de açúcar e ferro)

UHA – Unidade hemaglutinante

UV – Radiação ultra-violeta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. DESCRIÇÃO DO LOCAL DE ESTÁGIO	12
2.1 ESTRUTURA FÍSICA DO LABORATÓRIO VETERINÁRIO MERCOLAB ..	12
3. ROTINA DO LOCAL DE ESTÁGIO	14
4. DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES E CASUÍSTICAS	16
4.1 SETOR DE BACTERIOLOGIA – ISOLAMENTO DE <i>Salmonella</i> spp.	16
4.2 SETOR DE SOROLOGIA	24
4.3 SETOR DE MICOTOXINAS	28
4.4 SETOR DE PCR.....	31
4.5 SETOR DE HISTOPATOLOGIA	34
4.5. SETOR DE NECROPSIAS	38
4.5.1 Necropsia- Boubá Aviária	38
4.5.1.1 Revisão de literatura	39
4.5.2 Necropsia- Doença De Glässer	44
4.5.2.1 Revisão da literatura	45
CONSIDERAÇÕES FINAIS	48
REFERÊNCIAS	49

1. INTRODUÇÃO

O Estágio Supervisionado foi realizado no Laboratório de análises veterinárias MercoLab, localizado na cidade de Cascavel- PR, no período de 08 de janeiro a 15 de maio de 2018. A carga horária total de 720 horas foi cumprida de segunda à sexta-feira, das 8h às 17h, sob a supervisão da Médica Veterinária Joice Aparecida Leão. Diversas rotinas laboratoriais puderam ser acompanhadas, dentre elas análises microbiológicas, histopatológicas, sorológicas, moleculares e necropsias. Também foram acompanhadas visitas aos aviários experimentais da empresa, onde é realizada a avaliação da eficiência de ácidos orgânicos e probióticos no controle da *Salmonella* Heidelberg em frangos de corte.

O presente relatório tem como objetivo descrever a estrutura e o funcionamento do local de estágio, relatar as atividades desenvolvidas e as casuísticas, dentre elas as necropsias acompanhadas.

2. DESCRIÇÃO DO LOCAL DE ESTÁGIO

O Laboratório de análises veterinárias MercoLab se dedica à área de sanidade animal com foco em investigação, diagnóstico e monitoria das doenças de aves, suínos e mais recentemente, de peixes. Sua sede está localizada na Rua Maringá 2388, bairro São Cristóvão, Cascavel-PR e possui uma filial em Chapecó-SC. O laboratório é credenciado pelo MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento para a realização de análises oficiais conforme o PNSA - Plano Nacional de Saúde Avícola, que define estratégias de vigilância epidemiológica para as doenças avícolas de controle oficial, destacando entre elas as salmoneloses e micoplasmoses.

2.1 ESTRUTURA FÍSICA DO LABORATÓRIO VETERINÁRIO MERCOLAB

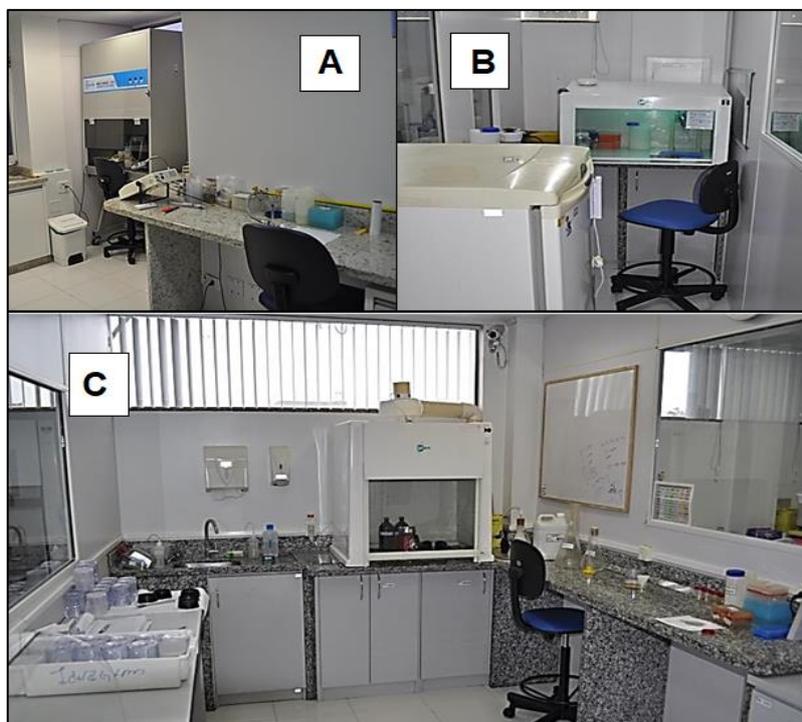
O laboratório de Cascavel (Figura 1) é dividido em diversos setores (Figura 2) como preparação de meios de cultura, recepção de materiais, sala de coleta de materiais, necropsias, bacteriologia, lavagem e esterilização, sorologia, PCR, micotoxinas, histopatologia e salas de experimentos. O horário de atendimento para recebimento de amostras é de segunda a sexta-feira das 8h00 às 17h30. Quando as amostras são encaminhadas sexta-feira à tarde, seu processamento ocorre no sábado pela manhã.

Figura 1: Fachada do Laboratório de Análises Veterinárias MercoLab.



Fonte: Google Imagens, disponível em <https://www.petboop.com/prestadores/Bairro-Sao-Cristovao--Cascavel--PR/MercoLab-Laboratorios-Ltda./20313/>

Figura 2: Setor de Bacteriologia (A), Setor de PCR (B), Setor de Micotoxinas (C)



Fonte: MercoLab, 2018.

3. ROTINA DO LOCAL DE ESTÁGIO

As amostras, ao chegarem ao setor de recebimento, são identificadas por número de protocolo e então encaminhadas para o setor de coleta de materiais, onde são separadas em volume adequado, mantendo uma parte da amostra como contraprova.

No setor de necropsia são coletadas amostras de órgãos de aves, suínos e peixes, que chegam já refrigerados. Se recebidos animais ainda vivos estes são encaminhados para realização de eutanásias de maneira indolor, rápida e sem sofrimento. As amostras coletadas em necropsia são então encaminhadas para análises bacteriológicas, histopatológicas, sorológicas e/ou moleculares.

Quando destinadas ao PCR (do inglês, *Polymerase Chain Reaction*), as amostras são diretamente enviadas ao setor, onde a profissional responsável faz a coleta por meio de *swabs* das amostras – que são geralmente de órgãos ou fezes.

Caso as amostras sejam destinadas à análise Histopatológica, devem estar armazenadas em solução de formalina tamponada neutra (formol) a 10% em proporção de 1:10. As lâminas montadas pelo histotecnologista são enviadas para a médica veterinária histopatologista, que atua fora da empresa e envia o laudo ao laboratório.

Se destinadas à sorologia, as amostras devem estar refrigeradas para que possam ser submetidas aos exames de inibição da hemaglutinação (HI), soroaglutinação rápida em placa (SAR), soroaglutinação lenta (SAL) e/ou teste ELISA (do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*).

As amostras destinadas ao setor de Bacteriologia são pesadas e encaminhadas para o cultivo de acordo com as determinações da Portaria nº126 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, que aponta as normas de credenciamento e monitoramento de laboratórios de diagnóstico das Salmoneloses aviárias. Para incubação de determinadas amostras, também se leva em consideração as determinações de número 6579 da ISO (*International*

Organization for Standardization), uma entidade de padronização e normatização internacional que especifica um método horizontal para detecção de sorotipos de *Salmonella*.

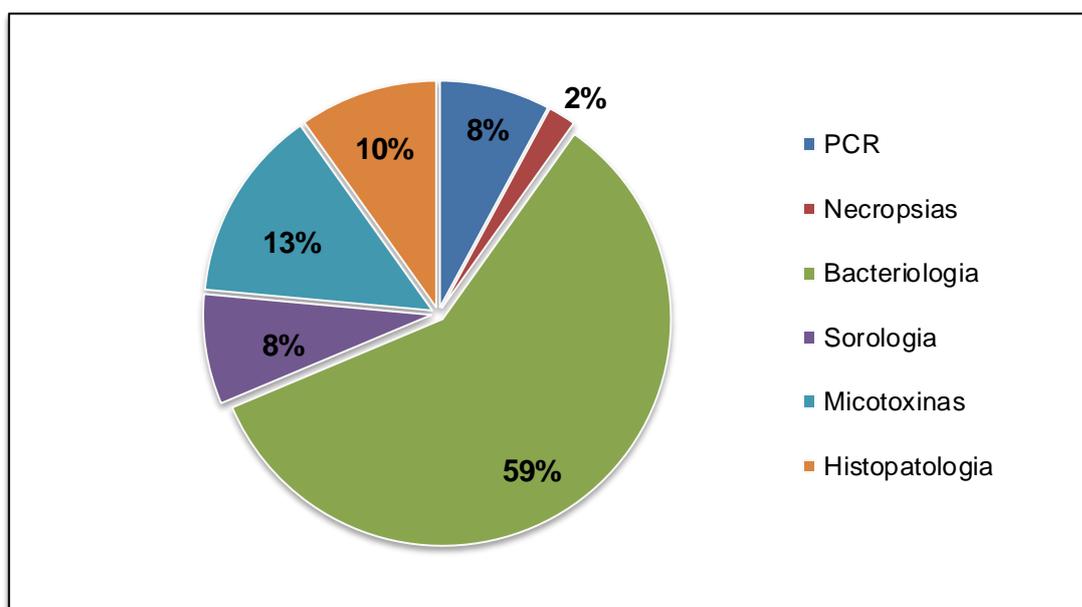
4. DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES E CASUÍSTICAS

Durante o período de estágio, foram acompanhados processamentos de mais de 1000 amostras, além de necropsias de suínos, aves e peixes.

Muitas vezes, uma mesma amostra é destinada, a pedido do cliente, a diferentes exames. É preciso, então, dividi-la de forma que se obtenha um número de amostras suficiente para todos os exames.

Como a maior parte do estágio se passou no setor de Bacteriologia, o número de acompanhamentos de amostras com esse destino supera os demais, como mostra o Gráfico 1.

Gráfico 1: Distribuição de encaminhamento das amostras acompanhadas no laboratório Mercolab, no período de 08/01 a 11/05/2018.



4.1 SETOR DE BACTERIOLOGIA – ISOLAMENTO DE *Salmonella* spp.

Salmonella spp. são bacilos Gram negativos da família Enterobacteriaceae. São bactérias não esporogênicas, tanto aeróbicas, quanto anaeróbicas facultativas. Possuem flagelos móveis, exceto *Salmonella Pullorum* e *Salmonella Gallinarum*. As salmonelas possuem forma de bastonetes com bordas lisas e brilhantes, medem em torno de 0,7 - 1,5 x 2,5

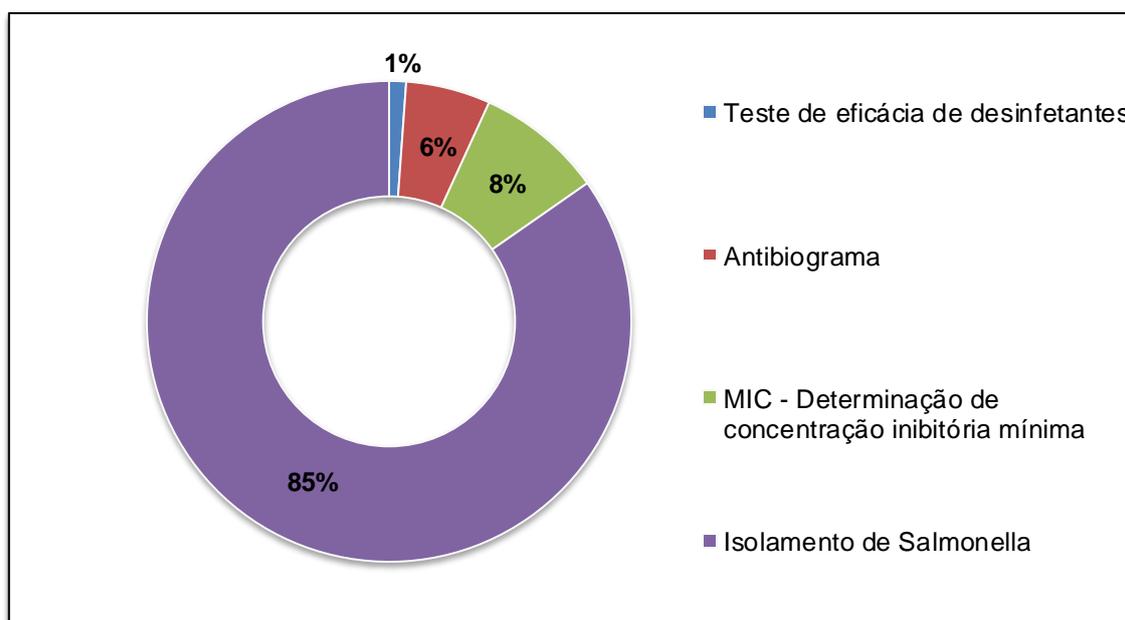
µm. Produzem ácido sulfídrico e gás carbônico a partir da glicose, descarboxilam a lisina e a ornitina e não hidrolisam a ureia. As temperaturas ótimas de crescimento das colônias variam entre 35 e 37°C e pH deve variar entre 6,5 e 7,5 (FORSHELL e WIERUP, 2006).

Os sorotipos diferenciam-se pelos antígenos somáticos (O), capsulares (V) e flagelares (H) (FERREIRA et. al. 2014). Cerca de 2579 sorotipos de *Salmonella* já foram detectados e classificados em duas espécies, *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*. A espécie *Salmonella enterica* é dividida em seis subespécies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica* (GRIMONT e WEILL, 2007).

O isolamento de salmonelas para monitoramento e controle feito no MercoLab é realizado para aquelas de interesse econômico e produtivo, como a *Salmonella Gallinarum*, *Salmonella Pullorum*, *Salmonella Enteritidis* e *Salmonella Typhimurium*, essas salmoneloses tem grande importância econômica na produção animal, podendo representar altos custos dentro da cadeia produtiva e entraves no consumo e na importação de produtos.

O isolamento de *Salmonella* spp. é a principal análise realizada no laboratório, sendo executada diariamente. Conseqüentemente, é a análise mais acompanhada como mostra no Gráfico 2.

Gráfico 2: Distribuição de atividades realizadas e/ou acompanhadas no setor de Bacteriologia, no período de 08/01 a 11/05/2018.



Entre as amostras recebidas neste setor estão órgãos (fígado, coração e ceco) de aves e suínos, mecônios, excretas de aves e fezes de suínos, ovos embrionados e comerciais, camas de aviários, alojamentos de aves e suínos, resíduos de incubatório, alimentos de origem animal —carnes e produtos cárneos—, *swabs* de cloacas, gaiolas, ambientes —superfícies e instalações—, *swabs* de mãos e de fundos de caixa.

As amostras destinadas ao diagnóstico bacteriológico devem ser mantidas de 2 a 8°C por não mais que 48h e devem possuir volume de acordo com a Tabela 1.

Tabela 1: Classificação dos tipos de amostras para regulação do volume em relação ao padrão de pesagem.

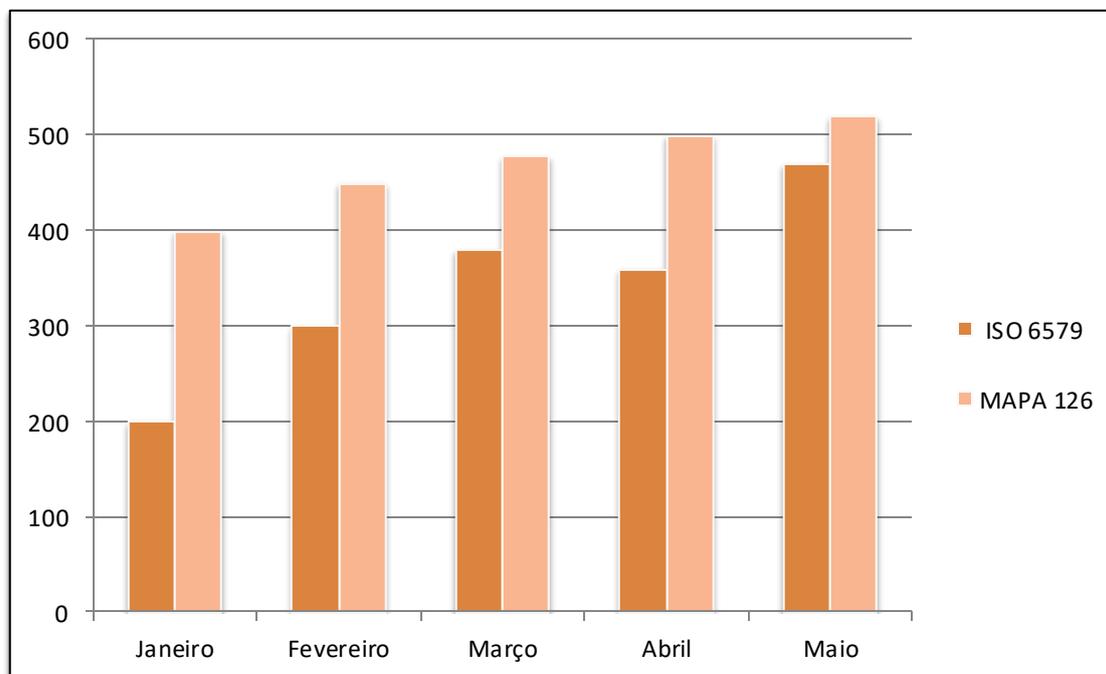
Tipo de amostra recebida	Pesagem
Pintainhos de 1 dia	2,0 ± 0,2g
Ovos embrionados (órgãos, gema, ceco)	2,0 ± 0,2g
Lote de 150 ovos	2,0 ± 0,2g
Farinha	25,0 ± 0,2g
Fezes e fezes frescas	7,0 ± 0,2g
Penugem	7,0 ± 0,2g
Ceco	25,0 ± 0,2g ou a quantidade que vier
Órgãos já coletados	2,0 ± 0,2g ou 7,0 ± 0,2g
Mecônio	2 ml

. Fonte: MercoLab, 2018.

Os procedimentos foram realizados respeitando as determinações da Portaria nº126 do MAPA (Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento). No caso de amostras de farinhas, alimentos, *swabs* de excretas, cloaca e intestino oriundas de propriedades envolvidas com exportação cabe a normativa 6579 da Organização Internacional para Normalização (ISO).

As amostras processadas de acordo com o MAPA foram mais acompanhadas que as processadas de acordo com a ISO, como mostra o gráfico a seguir (Gráfico 3).

Gráfico 3: Amostras acompanhadas e processadas de acordo com ISO 6579 e MAPA 126 no setor de Bacteriologia, no período de 08/01/2018 a 11/05/2018.



Após as pesagens as amostras devem ser enriquecidas com caldos de meios de cultura não seletivos, para melhorar as chances de isolar posteriormente a *Salmonella*. O meio de enriquecimento não seletivo determinado pelo MAPA é o caldo BHI (*Brain Heart Infusion*), uma infusão de cérebro-coração, peptona e dextrose, que é um carboidrato utilizado para fermentação. O caldo BHI possui fontes de nitrogênio, carbono, enxofre e vitaminas, sendo rico em nutrientes necessários para o crescimento de micro-organismos.

O caldo BHI deve ser adicionado dentro dos nascos (sacos estéreis) na proporção 1:10 (Figura 3). Nas amostras não pesadas, deve-se adicionar de forma que a amostra fique totalmente imersa. Deve-se incubar a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 18h – 24h.

Figura 3: Adição de meio de cultura não seletivo BHI em nasco estéril contendo amostra.



Fonte: MercoLab, 2018.

Para enriquecimento seletivo são utilizados os caldos Tetracionato e Rappaport Vassialidis. O caldo Tetracionato é composto de iodo metálico, iodeto de potássio e água destilada. Este caldo possui sais de bile que inibem o crescimento de micro-organismos Gram-positivos. O caldo Rappaport Vassialidis utilizado é composto por peptona de soja, cloreto de sódio, fosfato de potássio monobásico e dibásico, cloreto de magnésio e verde malaquita. Este meio de enriquecimento é seletivo para *Salmonella* spp., pois outras enterobactérias são inibidas pelo Verde Malaquita, alta pressão osmótica e/ou baixo pH. A *Salmonella* Typhi e a *Salmonella* Choleraesuis, porém, são sensíveis ao verde malaquita e podem ser inibidas.

Para a realização deste procedimento são utilizados quatro tubos de ensaio, dois deles contendo 20mL de caldo Tetracionato e dois contendo 20mL de caldo Rappaport Vassialidis (Figura 4). São utilizados 8mL da amostra, 2mL para cada tubo. Após a inoculação dos caldos seletivos, tem-se

então quatro tubos de uma mesma amostra, dois de tetracionato e dois de Rappaport. As duplicatas são exigência da normativa nº126, que afirma que um dos conjuntos deve ser incubado a temperatura de $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ e o outro, de $42-43^{\circ}\text{C}$; ambos por 18-24h, visando aumentar a possibilidade do isolamento de *Salmonella* spp.

Figura 4: Tubos de ensaio contendo caldo Tetracionato (mais claro) e tubos de ensaio contendo caldo Rappaport Vassialidis (azul).



Fonte: MercoLab, 2018.

Os meios de cultura para isolamento de *Salmonella* preconizados pelo MAPA incluem: ágar Rambach, ágar MacConkey, ágar Verde Brilhante e ágar Hektoen. No laboratório MercoLab os meios mais comumente utilizados são ágar Verde Brilhante (VB) e ágar Hektoen (HE). O ágar Verde Brilhante é um inibidor corante verde brilhante muito utilizado para o isolamento de *Salmonella*. Este ágar diferencia micro-organismos fermentadores de lactose ou sacarose, como, por exemplo, a bactéria *Escherichia coli*, dos que não fermentam a partir dos referidos açúcares, como a *Salmonella*. A diferenciação é possível porque quando estes açúcares não são fermentados, as colônias apresentam cor vermelha e, quando fermentados, verde-amarelada (TRABULSI, 2002).

O ágar Entérico de Hektoen (HE), por sua vez, possui sais biliares, corante azul de bromotimol e fucsina ácida, que inibem o crescimento da

maioria dos micro-organismos Gram-positivos. Este meio diferencia as enterobactérias pela fermentação dos açúcares salicilina, sacarose e lactose. Os micro-organismos que produzem hidróxido de enxofre, como é o caso da *Salmonella*, desenvolverão cor negra no centro da colônia enquanto que os fermentadores de salicina e/ou lactose formarão colônias de amarelas a laranjas. Os não fermentadores desses açúcares desenvolverão colônias verdes e verdes azuladas. É um ótimo meio para diferenciar a *Salmonella* de outras enterobactérias (TORTORA, 2003).

Uma alíquota do cultivo do caldo de Tetrionato e Rappaport Vassialidis proveniente dos tubos é transferida para placas de Petri contendo Ágar Verde Brilhante e Ágar Hektoen. A semeadura em superfície é realizada por esgotamento, de forma a obter colônias isoladas. As placas são incubadas a 37°C, por 24 horas. Após este período de incubação é possível visualizar as colônias suspeitas de *Salmonella* spp. No ágar Hektoen se apresentam com centro preto por produzirem hidróxido de enxofre e no ágar verde brilhante se apresentam rosadas, por não fermentarem lactose ou sacarose (Figura 5). O processo de semeadura também é feito em duplicata, para melhorar as chances de isolamento.

Figura 5: Colônias características de *Salmonella* spp. em ágar Verde Brilhante e ágar Hektoen (respectivamente).



Fonte: MercoLab, 2018.

As colônias selecionadas com características de *Salmonella* spp. devem ser submetidas aos testes bioquímicos preliminares como mostra a tabela padrão. (Tabela 2) Os testes bioquímicos são capazes de indicar qual o gênero de *Salmonella* presente nos meios seletivos. Os meios de cultura para estes testes bioquímicos são: Ágar tríplice de açúcar e ferro (TSI), Ágar lisina-ferro (LIA), Ágar SIM (*Syulphide Indol Motility*), Caldo uréia e Citrato de Simmons (Figura 6)

Tabela 2: Identificação de gênero de *Salmonella* de acordo com comportamento bioquímico.

Componente bioquímico	<i>Salmonella pullorum</i>	<i>Salmonella gallinarum</i>	<i>Salmonella</i> sp. Sub-espécie I – <i>S. Tiphymurium</i> e <i>S. Enteritidis</i>	<i>Salmonella</i> sp. Sub-espécie III a e III b – Antigo grupo Arizona
TSI 24h Base	Amarelo (ácido) gás +/-	Amarelo (ácido) gás -	Amarelo (ácido) gás +	Amarelo (ácido) gás +
TSI 24h Bisel	Vermelho (alcalino)	Vermelho (alcalino)	Vermelho (alcalino)	Vermelho (alcalino) ou Amarelo (ácido)
TSI 24h H2S	+/-	+	+	+
LIA 24h Base	Púrpura (alcalino)	Púrpura (alcalino)	Púrpura (alcalino)	Púrpura (alcalino)
LIA 24h H2S	+/-	+	+	+
Urease	-	-	-	-
Motilidade	-	-	+	+

Fonte: Port. 126 – MAPA, 1995.

Figura 6: Tubos de ensaio contendo meios de cultura utilizados para teste de comportamento bioquímico de *Salmonella* spp.



Fonte: Mercolab, 2018.

As cepas que apresentarem perfil bioquímico compatível podem ser sorotipificadas caso solicitado pelo requisitante. Conhecendo os sorotipos e as possíveis fontes de contaminação, pode-se tomar ações específicas para melhorar o controle da *Salmonella* spp., já que suas características epidemiológicas dificultam sua eliminação completa.

4.2 SETOR DE SOROLOGIA

No setor de sorologia foi possível acompanhar a análise de soroaglutinação rápida em placa (SAR), teste ELISA (do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) e a Inibição da hemaglutinação (HI), como mostra o Gráfico 4.

A soroaglutinação rápida em placa é um teste rápido para detectar as reações antígeno-anticorpo, onde são adicionados 30µl da amostra e 30µl do antígeno específico em uma placa de vidro (Figura 7). Dois minutos após a homogeneização, observa-se, sob superfície iluminada, se houve ou não

ocorrência de aglutinação. A ocorrência da reação indica positividade. A confirmação é feita por meio do teste de imunoadsorção enzimática (ELISA).

Gráfico 4: Distribuição de atividades realizadas e/ou acompanhadas no setor de Sorologia, no período de 08/01 a 11/05/2018.

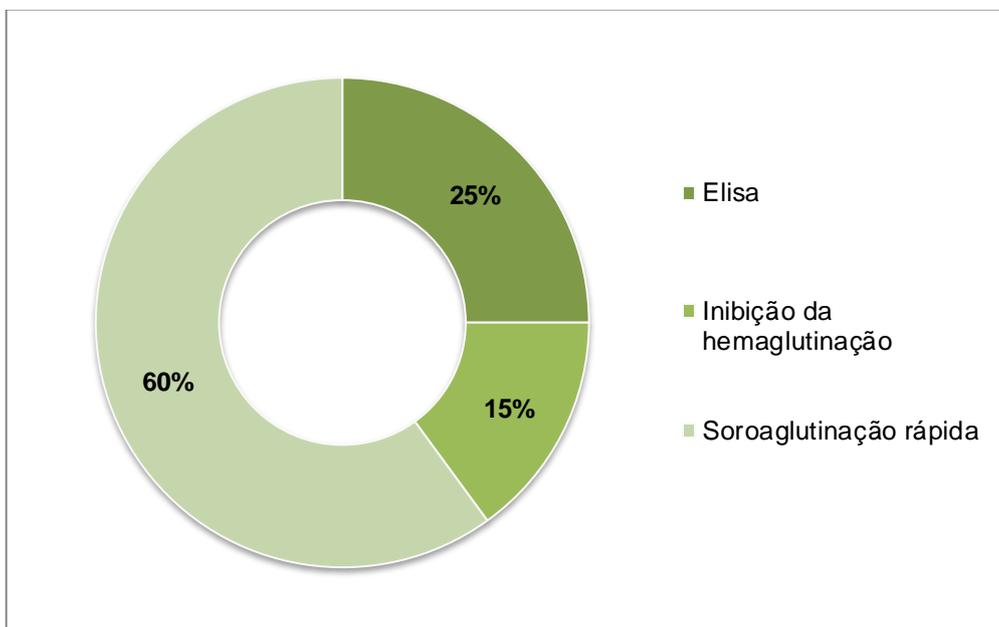
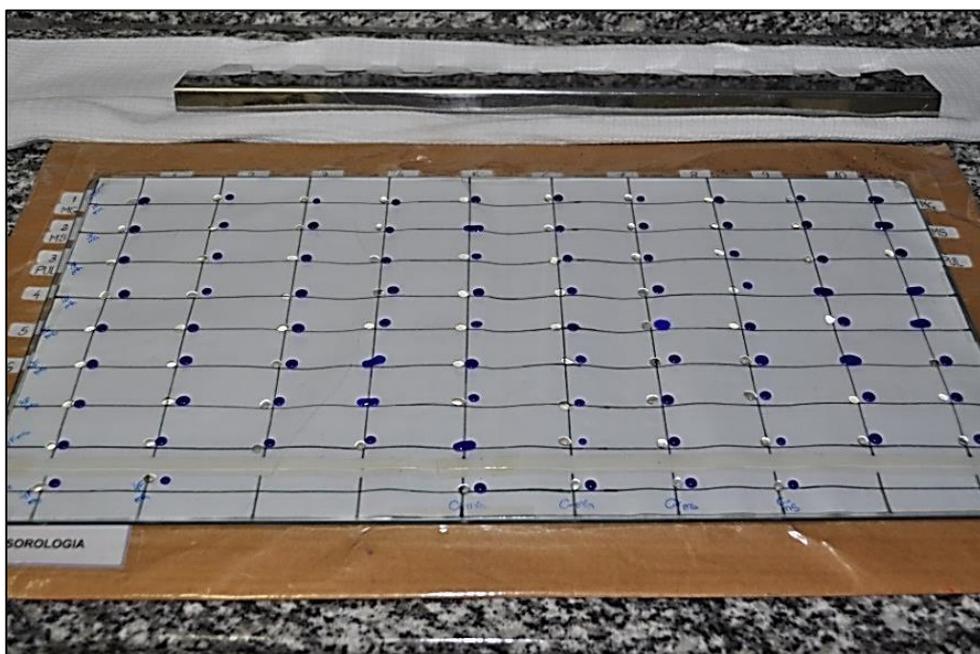


Figura 7: Superfície de vidro para realização do teste de soroaglutinação rápida.



Fonte: Mercolab, 2018.

O teste ELISA é um ensaio imunoenzimático que detecta reações antígeno-anticorpo. Este teste possui alta sensibilidade e alta especificidade, sendo um dos diagnósticos sorológicos mais buscados pelos clientes do laboratório MercoLab. O laboratório utiliza dois kits para realização do teste, o *kit BioChek®* e *IDEXX©* Laboratórios (Figura 8).

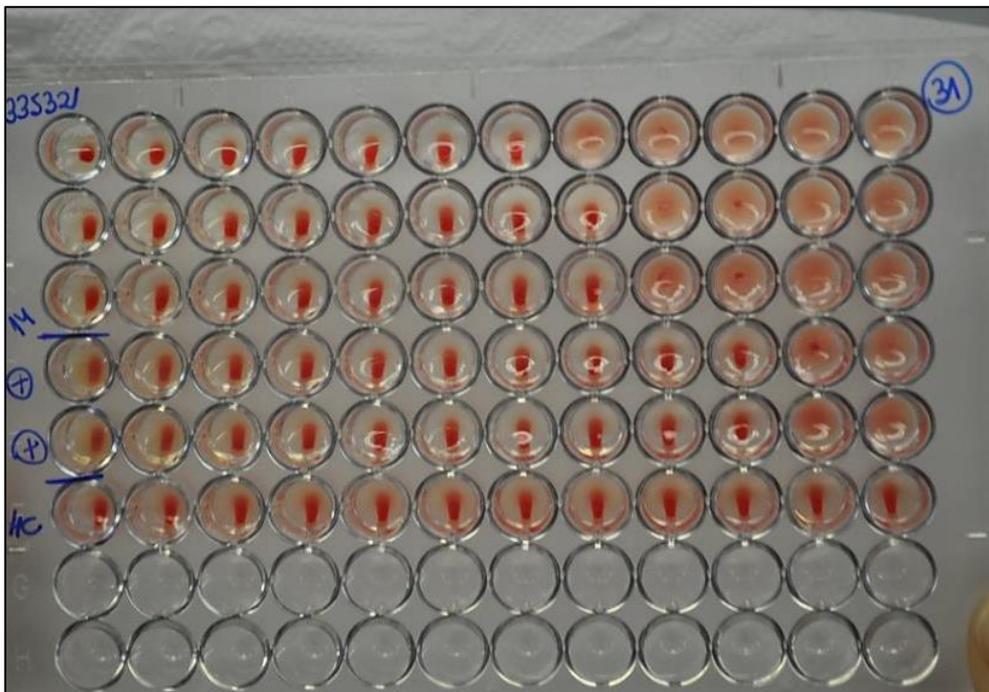
Figura 8: *Kit IDEXX©* para teste ELISA utilizado pela sorologia.



Fonte: Mercolab, 2018.

O teste de inibição da hemoaglutinação (HI) verifica o título de anticorpo frente a um antígeno específico. É considerado um teste prático e eficiente por ser mais específico (JUNIOR, 2000). São utilizadas, para realização do teste, microplacas (fundo em “v”) de 96 orifícios (Figura 9), onde são adicionados 50µl da amostra e 50µl de solução contendo 1% em todos os orifícios. Em cada prova são utilizados soros controles positivos e negativos. Deve, obrigatoriamente, ser incluída uma titulação controle das unidades hemaglutinantes (UHA). A placa é deixada em repouso por uma hora à temperatura ambiente. O título é expresso como a recíproca da maior diluição que inibiu completamente a hemaglutinação.

Figura 9: Teste de Inibição da hemaglutinação em microcroplacas (fundo em “v”) de 96 orifícios.



Fonte: Mercolab, 2018.

Os diagnósticos sorológicos são selecionados conforme as preferências dos requisitantes, em termos de custo e benefício. Entretanto, o laboratório indica quais os testes recomendados para determinadas suspeitas, como mostra a Tabela 3.

Tabela 3: Testes para diagnósticos sorológicos disponíveis no laboratório MercoLab.

Suspeita	Diagnóstico
Doença de Newcastle	ELISA, HI
Síndrome da Queda de Postura	HI
<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> , <i>Mycoplasma meleagridis</i>	ELISA
<i>Mycoplasma gallisepticum</i> e <i>Mycoplasma synoviae</i>	ELISA, SAR, HI
<i>Salmonella</i> Gallinarum e <i>S. Pullorum</i>	SAL
Reovírus	ELISA
Encefalomielite	ELISA
Anemia Infecciosa Aviária	ELISA
Doença de Gumboro	ELISA
Bronquite Infecciosa Aviária	ELISA
Artrite Viral	ELISA
Pneumovírus	ELISA

Fonte: MercoLab, 2018.

4.3 SETOR DE MICOTOXINAS

As micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por uma variedade de fungos, especialmente por espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*, como mostra a Tabela 4.

Tabela 4: Exemplos de micotoxinas, seus fungos produtores e alimentos onde as mesmas podem ser encontradas.

Micotoxina	Fungos	Alimento
Aflatoxinas	<i>Aspergillus</i> spp.	Amendoins, milho, cereais, café
Ocratoxina A	<i>Aspergillus</i> spp. e <i>Penicillium</i> spp.	Cereais, café, uvas, vinhos, milho, soja, arroz
Fumonisina	<i>Fusarium</i> spp.	Milho, trigo
Desoxivalenol	<i>Fusarium</i> spp.	Milho, cereais
Zearalenona	<i>Fusarium</i> spp.	Milho, cereais
Tricotecenos T-2 e HT-2	<i>Fusarium</i> spp.	Milho, trigo

Fonte: Adaptado de MOGENSEN, 2012.

A produção de micotoxinas depende do crescimento fúngico, portanto pode ocorrer em qualquer época do crescimento, colheita ou estocagem do alimento. O crescimento do fungo e a presença de toxinas não são sinônimos, porque nem todos os fungos produzem toxinas. Por outro lado, as micotoxinas podem permanecer no alimento mesmo após a destruição dos fungos que as produziram e podem afetar consideravelmente o rendimento da produção animal e a saúde e bem-estar dos animais.

A necessidade de monitorar grandes volumes de matrizes alimentares no que se refere à presença de micotoxinas e seus limites estabelecidos por lei, torna necessária a utilização de métodos analíticos rápidos, eficientes e baratos. O ensaio imunoenzimático em meio sólido (ELISA) tem mostrado ser uma ferramenta de grande importância para a análise das micotoxinas nos alimentos destinados ao consumo humano e animal. O laboratório de análises veterinárias MercoLab dispõe de *kits* de teste ELISA para detecção de micotoxinas, como as Aflatoxinas, Ocratoxinas A, Zearalenona, Desoxivalenol, Fumonisinias e Toxina T-2.

São utilizados 20g da amostra pesadas em balanças semi analíticas. Para amostras com suspeita de presença de Aflatoxinas (AFLA), Ocratoxinas A (OTA), Zearalenona (ZON) Fumonisin (FUMO) e Toxina T-2 é preciso adicionar 100 ml de metanol a 70%. Para amostras com suspeita de presença da micotoxina Desoxinivalenol (DON) é necessário adicionar 100 ml de H₂O destilada. As amostras são homogeneizadas de forma que os grãos sejam reduzidos a partículas menores. Após esta etapa algumas amostras são diluídas como mostra a Tabela 5.

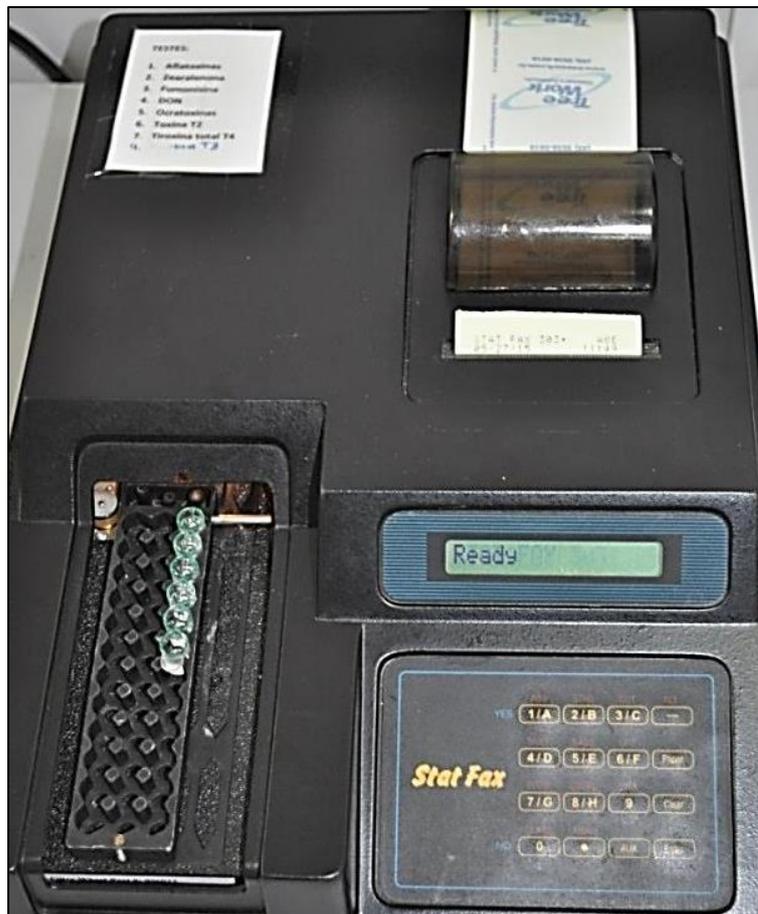
Tabela 5: Conduta adotada para diluição das amostras com suspeitas de presença de micotoxinas.

Micotoxinas suspeitas	Diluições
Aflatoxina B1	Não diluir, utilizar o bruto do pote.
Ocratoxina	Não diluir, utilizar o bruto do pote.
Zearalenona	Diluir 100 µl da amostra em 400 µl de metanol 70%
Fumonisin B1+B2	Diluir 50 µl da amostra em 950 µl de H ₂ O
Deoxinivalenol	Diluir 100 µl da amostra em 300 µl de H ₂ O
Tricotecenos T-2 e HT-2	Não diluir, utilizar o bruto do pote.

Fonte: MercoLab, 2018.

As microplacas estão impregnadas com anticorpo específico, em seguida adiciona-se 200µl de conjugado e 100µl da amostra. A microplaca é, então, lavada com H₂O destilada; 100µl da solução de substrato são adicionados e, por fim, 100µl da solução *STOP* que fará parar a reação. A microplaca é então inserida na leitora de ELISA modelo *Stat Fax* (Figura 10).

Figura 10: Leitora de ELISA do setor de Micotoxinas. Modelo *Stat fax*.



Fonte: MercoLab, 2018.

4.4 SETOR DE PCR

Os métodos moleculares estão sendo cada vez mais utilizados para auxiliar no monitoramento dos patógenos dentro da cadeia de produção de aves e suínos. Entre eles, se destaca a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), por ser uma metodologia rápida e sensível (MALORNY *et al.*, 2009).

O Laboratório de Análises Veterinárias Mercolab oferece as técnicas de PCR convencional e PCR *Real Time* (Figura 13), que permite o acompanhamento da reação em tempo real, o que o diferencia do PCR convencional onde os resultados são obtidos somente no final da análise. A disponibilidade dessa tecnologia possibilita melhoras nos diagnósticos de doenças genéticas, detecções de resistências bacterianas a antibióticos além

de detectar e quantificar micro-organismos em produtos derivados das cadeias de produção animal (DUFFY *et al.*, 2012).

A PCR *Real Time* compreende as etapas da PCR convencional; desnaturação, anelamento e extensão, porém acrescida de fluóforo, uma molécula que libera fluorescência quando excitada por luz. Acoplado ao termociclador (Figura 11), há Luz UV que detecta a fluorescência liberada pela molécula.

Figura 11: Termociclador para PCR em tempo real Rotor-Gene Q, MARCA QIAGEN.



Fonte: MercoLab, 2018.

O Laboratório de análises MercoLab oferta a possibilidade de diagnóstico molecular para diversas doenças de aves e suínos, como mostra a tabela a seguir (Tabela 6).

Tabela 6: Possíveis diagnósticos moleculares para doenças de suínos e aves por meio de análise de PCR convencional e ou Real time, ofertadas pelo Laboratório MercoLab.

Suínos	Aves
<i>Actinoballius pleuropneumoniae</i>	<i>Salmonella</i> spp. (Método DNAb)
Circovírus suíno	Bronquite infecciosa
Rotavírus	Gumboro
<i>Haemophilus parasuis</i>	Reovirus
Multiplex PCR para <i>Brachyspira hyodysenteriae</i> , <i>B. pilosicoli</i> , <i>Lawsonia intracelularis</i>	Multiplex PCR para <i>Mycoplasma gallisepticum</i> , <i>Mycoplasma synoviae</i>
<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	<i>Pasteurella multocida</i>
Parvovirus suíno	Tipificação do vírus da Bronquite Infecciosa Das Galinhas
<i>Pasteurella multocida</i>	<i>Mycoplasma synoviae</i>
<i>Salmonella</i> spp.	<i>Salmonella</i> spp. (método convencional)
Detecção e tipificação de <i>Clostridium perfringens</i>	Tipificação Pneumovírus Aviário A e B
Multiplex PCR para Circovírus e Parvovírus	
PCR para Influenza A	
Tipificação de influenza (H1N1-H3N2)	
<i>Mycoplasma hyorhinis</i>	
<i>Brachyspira hyodysenteriae</i>	
<i>Lawsonia intracelularis</i>	
Tipificação de <i>Escherichia coli</i>	

Fonte: MercoLab, 2018.

4.5 SETOR DE HISTOPATOLOGIA

O método de diagnóstico histopatológico caracteriza lesões microscópicas e as correlaciona com as ações de determinados patógenos. O enfoque do laboratório de análises MercoLab é detectar estes possíveis patógenos e apontar estratégias para a melhora na sanidade e bem estar dos animais.

As amostras chegam imersas em solução de formalina tamponada neutra (formol) a 10%, da qual são retiradas para serem submetidas ao processo de clivagem, que consiste na redução dos tecidos coletados a fragmentos com 3 a 5mm de espessura. Caso haja presença de lesão, a amostra deve conter tecido normal e parte do tecido alterado. O restante das amostras é armazenado como contra prova por 30 dias, em solução de formol a 10%.

Em seguida os fragmentos são mergulhados novamente no formol, com o objetivo de melhorar a conservação. Quando as amostras envolvem tecido ósseo, estas são colocadas em solução de descalcificação composta por 50% H₂O, 35% ácido fórmico e 15% formaldeído a 37%. Desta maneira a amostra torna-se menos rígida, o que proporciona um melhor corte.

Na etapa seguinte, as amostras são inseridas no processador automático de tecidos (histotécnico) (Figura 12), onde receberão tratamento gradiente com álcool e por fim a parafina (2h). O procedimento é dividido em desidratação, clarificação e diafanização; etapas realizadas respectivamente pelas soluções de álcool, xilol e parafina.

Figura 12: Processador automático de tecidos (histotécnico).



Fonte: MercoLab, 2018.

O processo de desidratação consiste em remover a água com soluções de álcool, para que a parafina consiga penetrar no tecido e nas estruturas. A clarificação visa remover do tecido, por meio de um agente clarificador (o Xilol), os álcoois utilizados na etapa da desidratação. Por último, a diafanização consiste no preenchimento das cavidades teciduais pela parafina em seu estado líquido.

Em seguida as amostras são depositadas no fundo dos blocos (Figura 13), todas devidamente identificadas. Depois da solidificação da parafina em temperatura ambiente, a amostra é congelada à temperatura $\leq -10^{\circ}\text{C}$ até o momento da realização dos cortes.

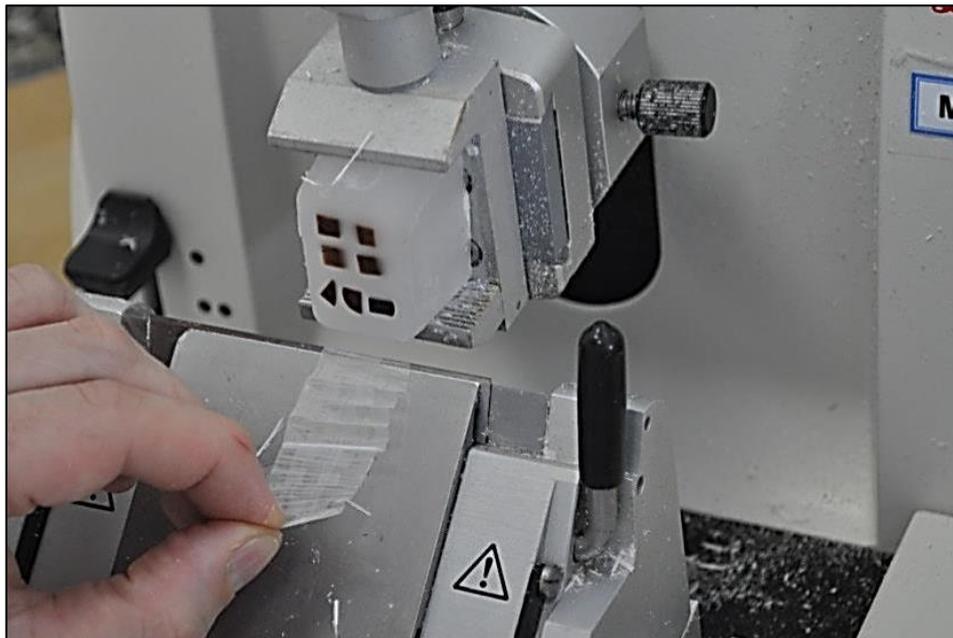
Figura 13: Posicionamento dos fragmentos de órgãos no fundo dos blocos de parafina.



Fonte: MercoLab, 2018.

Em seguida, a amostra é processada através do micrótomo rotativo, obtendo-se porções com $\cong 5\mu\text{m}$ de espessura (Figura 14). Com auxílio do banho-maria histológico, em $\cong 50^\circ\text{C}$, a fita de parafina devido ao calor se estica e fixa na lâmina. Em seguida, as lâminas são colocadas na estufa por no mínimo 30 min em temperatura de $\cong 60\text{-}70^\circ\text{C}$, para retirar os excessos de parafina e ocorrer fixação dos cortes histológicos na lâmina.

Figura 14: Realizando os cortes do bloco no Micrótopo.



Fonte: MercoLab, 2018.

Para retirar a parafina são realizados três banhos de xilol de três minutos cada. O processo da hidratação deve ser realizado antes da coloração, para remover o xilol do tecido e substituí-lo por água, melhorando assim o desempenho dos corantes solúveis em água. Este processo inicia-se com dois banhos de álcool absoluto e decresce para banhos de álcool 95% e 70% até chegar a água destilada.

Para a coloração das lâminas utiliza-se a técnica de Hematoxilina e Eosina de Harris. Nesta coloração, os núcleos são corados pela hematoxilina, sendo evidenciados em roxo, ao passo que o citoplasma e os espaços intercelulares são corados pela eosina, sendo visualizados na cor rosa (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1999).

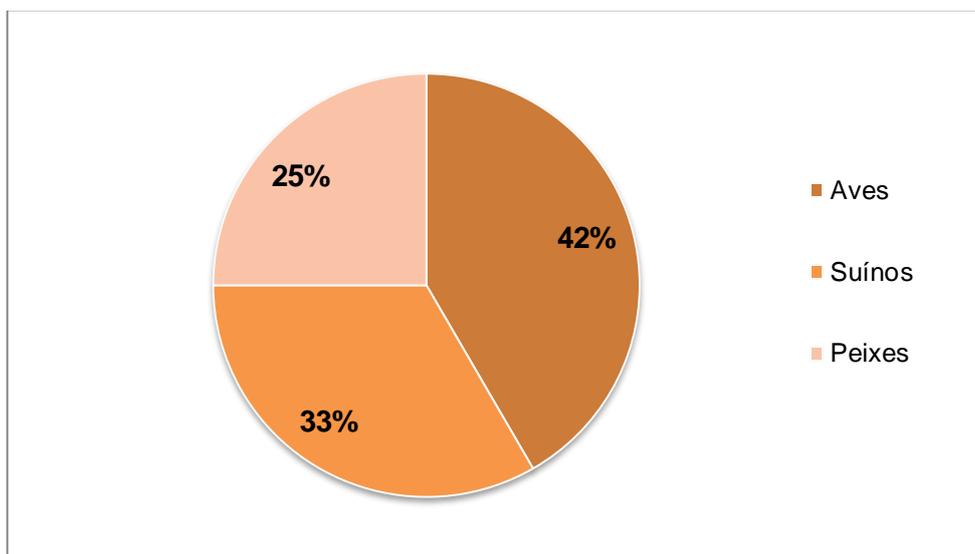
Primeiramente, é utilizada a Hematoxilina que, por possuir características básicas, se ligará às substâncias químicas ácidas presentes no núcleo das células e, em seguida a Eosina —corante ácido que se ligará às partes básicas presentes nos tecidos celulares.

A lâmina é finalizada com resina para fixação da lamínula, de forma que a mesma não danifique os cortes histológicos.

4.5. SETOR DE NECROPSIAS

Foram acompanhadas necropsias de suínos, peixes e, em grande maioria aves, como indicado no Gráfico 5.

Gráfico 5: Necropsias acompanhadas e/ou realizadas no laboratório MercoLab, no período de 08/01 a 11/05/2018.



A seguir, serão relatadas duas necropsias realizadas durante o estágio curricular supervisionado no laboratório de análises veterinárias MercoLab.

4.5.1 Necropsia- Boubá Aviária

As aves submetidas à necropsia apresentaram histórico de lesões em crista, barbela e pescoço. O lote como um todo apresentava baixa conversão alimentar, crescimento lento e alta mortalidade.

As alterações macroscópicas eram baço atrofiado em duas das cinco aves recebidas, Bursa de Fabricius atrofiada em todas, timo atrofiado em quatro aves e necrose da cabeça do fêmur em uma delas.

Foram coletados para histopatológico os baços, timos, fígados, moelas, pâncreas e as lesões de pele das aves. O processamento das amostras seguiu o protocolo descrito anteriormente, utilizando a coloração hematoxilina e eosina.

O exame histopatológico das amostras de pele revelou áreas crostosas caracterizadas pela presença de hiperqueratose, restos celulares, hiperplasia

epitelial e a presença de inúmeros corpúsculos de inclusão intracitoplasmáticos eosinofílicos. No pulmão houve sinais de broncopneumonia intersticial moderada multifocal e congestão severa, na traqueia verificou-se descamação epitelial, infiltrado inflamatório mononuclear, multifocal e congestão. No fígado houve sinais de perihepatite, granulomatosa transmural multifocal, com presença de grumos bacterianos intralesionais.

No intestino havia infiltrado inflamatório supurativo difuso e congestão difusa. No pré-ventrículo observou-se proventriculite moderada multifocal. Foram detectadas nas amostras de Bursa de Fabricius depleção e necrose linfóide de 51-75% (escore 3), infiltrado inflamatório mononuclear multifocal, edema, hiperplasia epitelial e hiperemia. No tecido ósseo visualizou-se na capsula articular, infiltrado heterofílico, moderado multifocal, edema e congestão. As amostras de timo, rim e baço apresentaram congestão difusa.

O quadro microscópico é compatível com aquele encontrado pela ação do vírus da boubá aviária e bronquite infecciosa das galinhas.

Para os testes microbiológicos foram coletadas amostras através de swabs de fígado e medula, transferidas para placas de Petri contendo ágar sangue e ágar MacConkey e, posteriormente incubadas na estufa à 36°C. Na placa correspondente ao fígado ocorreu crescimento de colônias características de *Staphylococcus* spp.; na placa correspondente a medula, crescimento de colônias características de *Escherichia coli*.

4.5.1.1 Revisão de literatura

A Boubá é uma doença viral comum tanto em galinhas e perus, quanto em aves silvestres (BERCHIERI e MACARI, 2000). A doença causa um impacto econômico considerável, pois acarreta perdas na produtividade e possível mortalidade, quando associada a outras infecções.

Na forma cutânea, a Boubá Aviária tem como característica um início discreto de proliferação nodular nas porções sem penas e nos folículos das penas. Por sua vez, em sua forma diftérica, a doença apresenta lesões fibrino-

necróticas nas regiões da mucosa do trato respiratório superior, no esôfago e na cavidade oral das aves (SAIF *et al.*,2008).

Os agentes virais responsáveis pela Boubá são os *poxvírus*, membros do gênero *avipoxvírus* da família *poxviridae*. (BERCHIERI e MACARI, 2000).

Todos os vírus da família *poxviridae* possuem morfologia semelhante e alguns possuem ainda a característica de serem resistentes no ambiente devido sua estrutura e composição (SAIF *et al.*,2008).

Em áreas onde há grande número de aves em confinamento, a doença pode persistir por maior tempo, mesmo com ações de profilaxia (SAIF *et al.*, 2008).

A transmissão da doença se dá por contato direto das partículas virais com a pele já lesionada ou por fômites, mãos e roupas de funcionários que manipulam as aves. A transmissão mecânica por canibalismo também é possível. Alguns mosquitos e artrópodes hematófagos podem atuar como vetores mecânicos para a doença, podendo carrear o patógeno por semanas (SAIF *et al.*,2008). O vírus da Boubá Aviária é resistente no ambiente e pode posteriormente infectar aves imuno-susceptíveis.

As manifestações dos sinais clínicos dependem da susceptibilidade do hospedeiro, distribuição das lesões, virulência do vírus e o patotipo viral (SAIF *et al.*, 2008).

A ave doente pode manifestar apenas uma das formas, diftérica e cutânea, ou as duas formas simultaneamente. A forma cutânea é a apresentação mais comum da doença e os sinais clínicos são diretamente relacionados à perda da produtividade, ocorrendo diminuição do ganho de peso e índice de postura. Na forma diftérica, há dispneia e anorexia e os tratos respiratórios e digestórios superiores apresentam lesões fibrino-necróticas, que aumentam de volume rapidamente (BERCHIERI e MACARI, 2000).

As lesões cutâneas da boubá aviária variam entre pápulas, vesículas, pústulas e/ou crostras (Figura 15). As pápulas surgem inicialmente e são caracterizados pela presença de nódulos de cor clara na pele das aves, já as

vesículas e pústulas, por sua vez, são amareladas. As lesões geralmente surgem em porções sem penas (Figura 16).

Figura 15: Lesões com aspecto de crostas na região dos olhos, bico e crista de ave, características de bouba aviária na forma cutânea.



Fonte: (BRASH *et al.*, 2012)

Figura 16: Lesões cutâneas com aspecto de crostas, características de bouba aviária em uma ave infectada experimentalmente.



Fonte: (BRASH *et al.*, 2012)

As lesões diftéricas podem ser encontradas predominantemente na cavidade oral das aves, porém, podem ser visualizadas também na cavidade nasal, conjuntiva, laringe, faringe, traqueia (Figura 17) e/ou esôfago.

Figura 17: Lesões características de boubá aviária na forma diftérica, localizadas em bico, cavidade oral, e traquéia da ave.

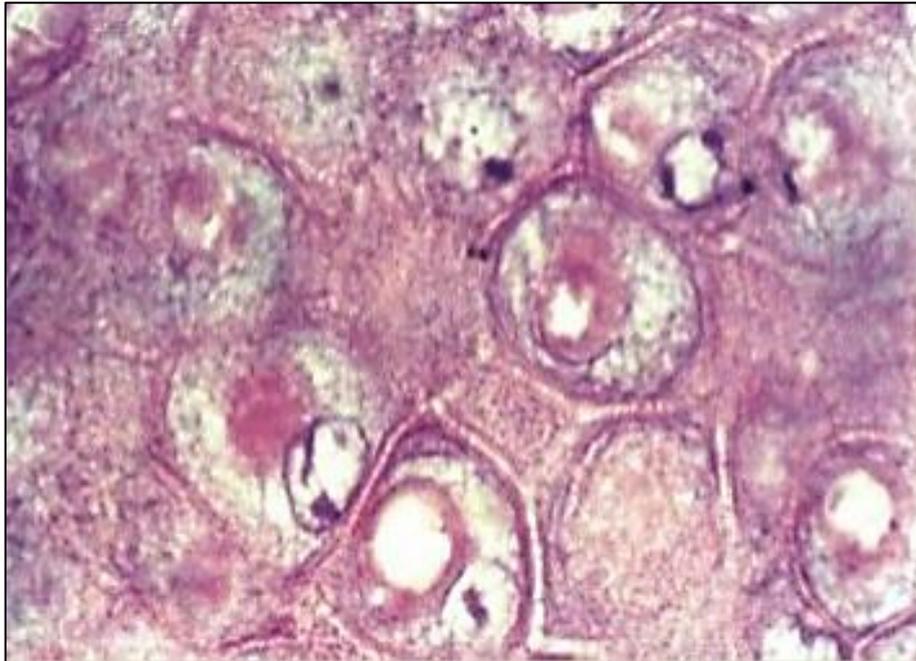


Fonte: (BRASH *et al.*, 2012)

É importante levar em consideração a qualidade da amostra que será enviada ao laboratório, pois assim garante um diagnóstico mais fidedigno. No caso de suspeita de boubá é recomendável enviar aves vivas, carcaças de aves em gelo, ou órgãos em formol 10% ou glicerina 50% (BERCHIERI Jr *et al.*, 2009).

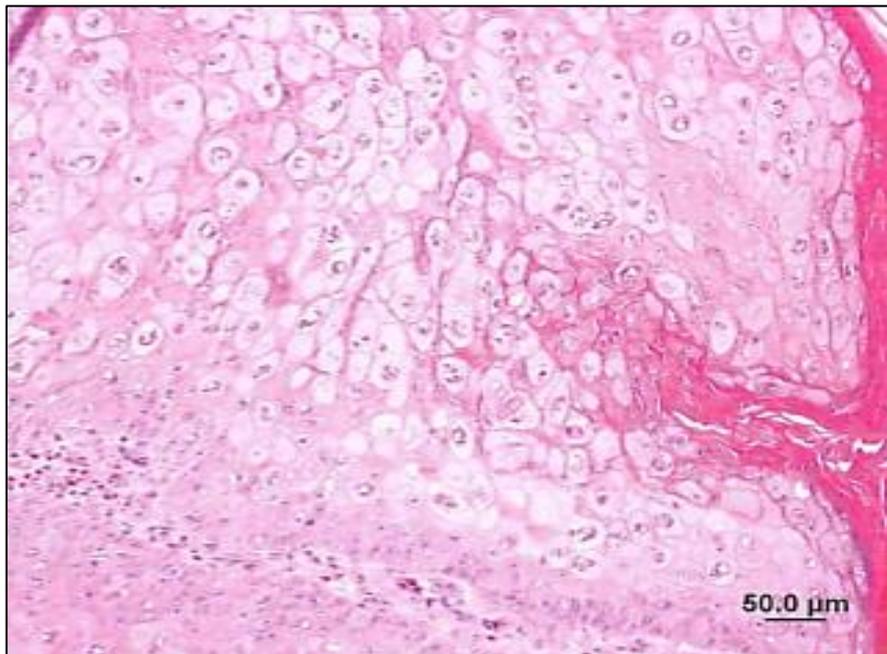
Para realização do diagnóstico, deve-se levar em conta o histórico das lesões de característica suspeita e para confirmar é feito o exame histopatológico e isolamento viral. Microscopicamente, tanto na forma cutânea como na diftérica, verifica-se hiperplasia e degeneração baloniforme das células epiteliais e a presença de corpúsculos de inclusão citoplasmáticos, também denominados corpos de Bollinger ou corpúsculos tipo A. (BERCHIERI & MACARI, 2000) (Figuras 18 e 19). No caso de infecções secundárias por bactérias é possível detectar um quadro de traqueíte pseudomembranosa, fibrino-necrótica (BERCHIERI Jr *et al.*, 2009).

Figura 18: Hiperplasia, degeneração baloniforme das células da epiderme e corpúsculos de inclusão intracitoplasmáticos (Coloração de Hematoxilina e Eosina, aumento de 1000X).



Fonte: (BERCHIERI Jr *et al.*, 2009).

Figura 19: Hipertrofia e hiperplasia das células com inclusões intracitoplasmáticas da epiderme de Peru com suspeita de Boubá Aviária (Coloração de Hematoxilina e Eosina, aumento de 400X).



Fonte: (ABDUL-AZIZ, 2016).

Para isolamento e identificação do vírus pode ser feita inoculação nas aves ou em embriões (SAIF *et al.*, 2008). Pode-se visualizar a presença do vírus nas amostras de lesões se a leitura for realizada no microscópio eletrônico (BERCHIERI e MACARI, 2000).

Os diagnósticos diferenciais seriam laringotraqueite, deficiência de biotina e intoxicação por micotoxina T2 (SAIF *et al.*, 2008) ou ainda, doença de Gumboro, doença de Marek, candidíase e aspergilose (MACARI e GONZALES, 2003).

Não há tratamento específico para aves acometidas pela Boubá aviária. Porém pode-se realizar a remoção das crostas e cauterização das feridas com tintura de iodo ou nitrato de prata. Para as placas diftéricas pode-se utilizar solução de permanganato de potássio (MALAVAZZI, 1995).

A imunização contra o vírus da boubá é dado por vacinação em aves a partir da 4ª semana (SAIF *et al.*, 2008).

Para controle da doença deve-se isolar as aves infectadas, controlar os mosquitos e insetos do aviário e realizar desinfecção das instalações onde estavam as aves infectadas (SAIF *et al.*, 2008).

4.5.2 Necropsia- Doença De Glässer

Foram submetidos à necropsia dois leitões, ambos de 52 dias de idade, com histórico de animais do mesmo lote definhando na creche, sem demais sinais clínicos aparentes e sem sinais de diarreia.

Para realização das análises microbiológicas, foram coletadas amostras de pulmão e intestino. Detectou-se presença de *Streptococcus suis* no pulmão, e *Escherichia coli* beta hemolítica no intestino.

Para o exame histopatológico foram coletados, pulmão, cérebro, fígado, baço, rim e coração. No pulmão havia pleurite supurativa, broncopneumonia supurativa moderada multifocal, espessamento dos septos alveolares e áreas hemorrágicas. No intestino havia serosite supurativa moderada multifocal e

congestão severa. No sistema nervoso central, observou espongiose moderada multifocal e congestão.

O quadro microscópico das amostras de baço, fígado, rim e linfonodos apresentaram congestão severa. As lesões são compatíveis com *Haemophilus parasuis*.

4.5.2.1 Revisão da literatura

O *Haemophilus parasuis* é o agente responsável pela doença de Glässer e está amplamente distribuído ao redor do mundo. Esta bactéria coloniza o trato respiratório dos leitões, logo após o nascimento. A infecção sistêmica precoce dos animais é prevenida pela presença dos anticorpos maternos, que podem permanecer até 6 a 8 semanas de idade. O decréscimo do título desses anticorpos corresponde, geralmente, ao aumento da mortalidade (entre 4 e 6 semanas pós-desmame (SOBESTIANSKY *et al.*, 2001).

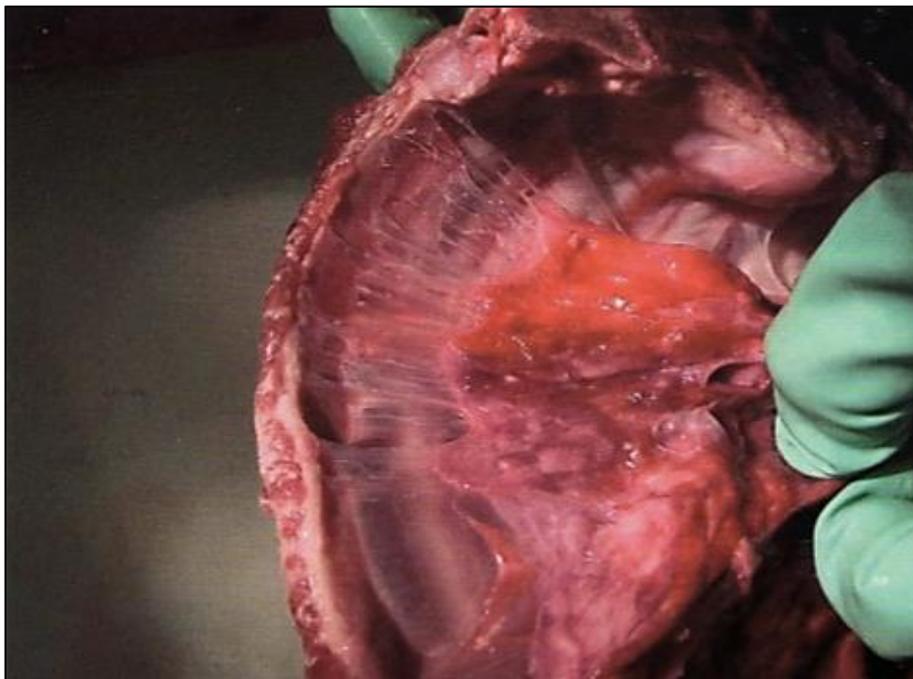
A bactéria pertence à família *Pasteurellaceae*, é um bastonete imóvel, pequeno e pleomórfico (MENIN *et al.*, 2005). Pode-se isolar o *Haemophilus parasuis* da cavidade nasal, tonsilas, traquéia e pulmões de animais. Também pode ser isolado de pulmões com lesões sem envolvimento sistêmico.

As amostras de *H. parasuis* têm sido classificadas por sorotipagem (OLVERA *et al.*, 2006). Atualmente, são conhecidos 15 sorotipos, sendo que as cepas patogênicas pertencem aos sorotipos: 1, 2, 4, 5, 12 ou 14 (KIELSTEIN e RAPP-GABRIELSON, 1992). Alguns estudos foram realizados buscando correlacionar os sorotipos com virulência, mas aparentemente não há correlação significativa entre ambos. Por exemplo, o sorotipo 7, conhecido como não virulento, foi isolado em amostras de lesões sistêmicas características de doença de Glässer (MORRIS *et al.*, 2006).

Entre os sinais clínicos estão apatia, febre (40-42°C), inapetência e anorexia. Os suínos podem apresentar tosse, respiração abdominal, inflamação e dor nas articulações podendo ocorrer claudicação e sinais nervosos como tremores, incoordenação, movimentos de pedalagem e decúbito lateral (OLIVEIRA e PIJOAN, 2002). Esta doença é caracterizada por

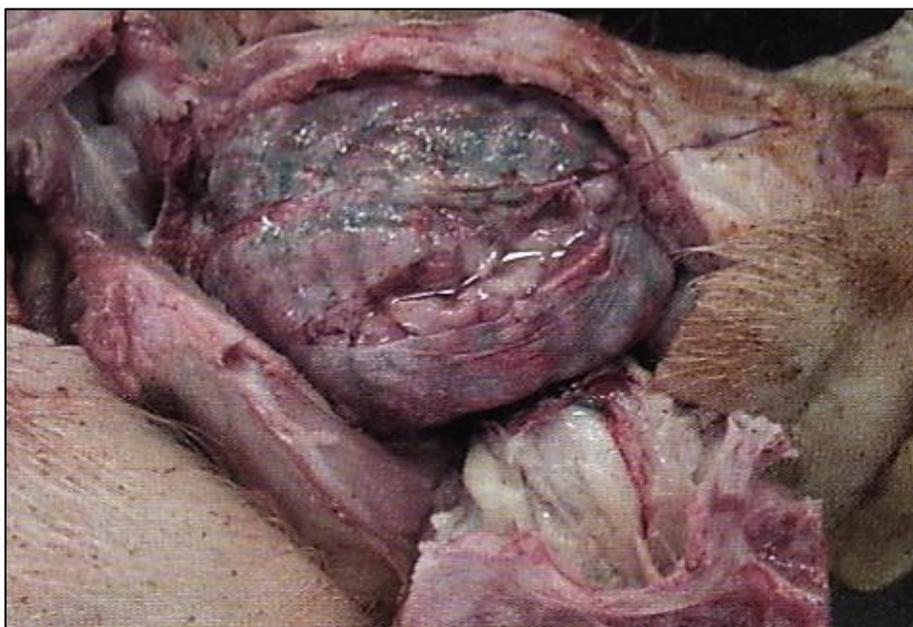
serosites, envolvendo a pleura (Figura 20), pericárdio, peritônio e também está associada à meningite (Figura 21), à artrite e à pneumonia serofibrinosa.

Figura 20: Alteração características de pleurite em leitão com suspeita de Doença de Glässer.



Fonte: (BARCELLOS e SOBESTIANSKY, 2003).

Figura 21: Lesões no sistema nervoso central, características de meningite em leitão com suspeita de Doença de Glässer.



Fonte: (BARCELLOS e SOBESTIANSKY, 2003).

Para realização de análises laboratoriais, recomenda-se enviar a carcaça congelada em até 24h do óbito, devido a sensibilidade alta do microorganismo a estímulos externos. É importante enviar o animal que apresente o quadro clínico e que não tenha sido tratado anteriormente.

Os sinais clínicos e as lesões devem ser diferenciados dos causados por outras bactérias como: *Streptococcus suis*, *Erysipelothrix rhusiopathiae* e *Mycoplasma* spp. (SANTOS e SOBESTIANSKY, 2007).

Para diagnóstico dessa doença deve-se levar em conta o histórico, sinais clínicos e lesões observadas à necropsia. A confirmação pode ser feita com isolamento do agente, mas nem sempre resulta em positivo, pois o *Haemophilus parasuis* é uma bactéria de difícil isolamento. Para realizar a cultura pode ser feito *swab* de exsudato do pericárdio, pleura, peritônio, articulação e líquido cérebro-espinhal. Os meios de cultura utilizados podem ser ágar sangue e ágar chocolate. Deve-se incubar as placas por 48h à 37° (MENIN *et al.*, 2005). Se o método de isolamento tiver sucesso é necessário realizar testes bioquímicos para diferenciar *H. parasuis* de outras bactérias.

O uso de antibióticos adicionados à ração é uma forma de controle da doença de Glässer, considerando que alguns isolados mostram sensibilidade a florfenicol e amoxicilina.

Porém, em surtos severos, em que antibiótico-terapia não tem sido efetiva em reduzir os sinais clínicos e mortalidade, é indicado o uso de vacina. A principal forma consiste na vacinação do leitão, mas quando a mortalidade de leitões é muito alta, recomenda-se vacinar as matrizes. Frequentemente são indicadas duas doses, uma aos sete dias de idade e outra no desmame. Quando a vacinação é realizada na matriz, os leitões devem também ser vacinados mais tarde, para proporcionar uma imunidade ativa mais prolongada.

Deve-se também incluir práticas adequadas de manejo visando a reduzir ou eliminar outros patógenos respiratórios, uniformizar a idade do desmame dos animais, evitar mistura de suínos de diferentes idades e diminuir os fatores de estresse (MENIN *et al.*, 2005).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estágio curricular proporciona uma introdução significativa ao mercado de trabalho, sendo um local de troca de contatos e experiências. Com essa oportunidade torna-se possível colocar o conhecimento teórico em prática e principalmente, aprimorá-lo. A realização da disciplina de estágio curricular no Laboratório de Análises Veterinárias MercoLab proporcionou crescimento tanto profissional quanto pessoal e significativa agregação de conhecimentos teórico-práticos de análises laboratoriais, ressaltando a importância de rigorosas práticas para obtenção de diagnósticos fidedignos. Foi possível acompanhar métodos eficientes de detecção e quantificação de agentes biológicos e químicos que representam riscos para a sanidade de aves e suínos.

Ao lado de profissionais da empresa houveram inúmeras situações de aprendizado, principalmente o respeito pelos animais desde a mínima manipulação e o respeito pelos colegas de trabalho.

REFERÊNCIAS

- ABDUL-AZIZ, T., FLETCHER, J. O., BARNES, J.H., **Avian Histopathology**. 4^a ed. American Association of Avian Pathologists, Inc. Florida, 2016. p. 629.
- BERCHIERI JUNIOR, Â., MACARI, M. **Doenças das Aves**. Campinas, Fapesp, 2000. p.333-338.
- BERCHIERI JUNIOR, Â., SILVA, N. E., FÁBIO, D. J., SESTI, L., ZUANAZE, F. D. M. **Doenças das Aves**. 2^a ed. Campinas, FACTA, 2009. p.144.
- BARCELLOS, D., SOBESTIANSKY, J. **Atlas de doenças dos suínos**. Goiânia, 2003. p. 55-57.
- BRASH, M. L., CHARLTON, B. R., FITZ-COY, S. H., FULTON, R. M., JULIAN, R. J., JACKWOOD, M.W., OJKIC D., NEWMAN, L. J., SANDER, J. E., SHIVAPRASAD, H. L., WALLNER-PENDLETON E., WOOLCOCK P. R. **Avian Disease Manual**. 7^aed. American Association of Avian Pathologists, Inc.Florida, 2012. p. 46-49.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria Nº 126, de 03 de novembro de 1995. **Normas de credenciamento e monitoramento de laboratórios de diagnóstico das salmoneloses aviárias** (*S. Enteritidis*, *S. Gallinarum*, *S. Pullorum* e *S. Typhimurium*). Diário Oficial da União, Brasília, DF, 06 nov. 1995, Seção 1, p. 17694. Disponível em: < <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/servlet/VisualizarAnexo?id=12698> >. Acesso em: 13 jun 2018.
- DUFFY, L. L., DYKES, G. A., FEGAN, N. **A review of the ecology, colonization and genetic characterization of Salmonella enterica serovar Sofia, a prolific but avirulent poultry serovar in Australia**. Food Research International, Barking, v.45, 2012. p.770–779.
- FERREIRA, A. J. P., REVOLLEDO, L., MARTINS, L. M., FERREIRA, C. S. A., PARRA, S. H. S., NUNEZ L. F. N., AZEVEDO, N. P., ALLEGETTI, L. **Alternativas para o controle de Salmonella em aves**. Revista Brasileira de Ciência Avícola, 2014.
- FORSHELL, L. P., WIERUP, M. **Salmonella contamination: a significant challenge to the global marketing of animal foods products**. Revue Scientifique Technique Office International des Epizooties, Paris, v.25, n.2, 2006. p. 541-554.
- GRIMONT, P. A. D., WEILL F., X. **Antigenic formulas of the Salmonella serovars**. WHO collaborating Center for Reference and Research on Salmonella. 9^a ed. Pasteur Institute, Paris, 2007. p. 166.
- JUNIOR, A. B.; MACARI, M. **Doenças das Aves**. Editora FACTA, Campinas, 2000. p.327 – 332.
- JUNQUEIRA, L. C., CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 9^a. ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 1999.

- MACARI, M., GONZALES, E. **Manejo da Incubação**. Campinas, FACTA, 2003. p. 292.
- MALAVAZZI, G. **Avicultura Manual Prático**. São Paulo, Nobel, 1995. p.118-121.
- MALORNY, B., HUEHN, S., DIECKMANN, R. KRÄMER, N., HELMUTH, R. **Polymerase Chain Reaction for the Rapid Detection and Serovar Identification os Salmonella in Food and Feeding Stuff**. Food Analytical Methods, New York, v. 2, , 2009. p. 81-95.
- MENIN, A., GAVA, D., VAZ, E. K. **Aspectos gerais sobre a infecção por haemophilus parasuis em suínos: revisão**. Revista de Ciências Agroveterinárias, Lages, 2005. p.148-156.
- MOGENSEN, J. M. **Significance and occurrence of fumonisins from Aspergillus niger**. Center for Microbial Biotechnology, Department of Systems Biology, Technical University of Denmark, 2012. p. 4. Disponível em: <http://orbit.dtu.dk/services/downloadRegister/52203032/F_rdig_afhandling1.pdf>. Acesso em 14 jun 2018.
- OLIVEIRA, S., PIJOAN, C. **Diagnóstico, epidemiologia e controle da infecção por Haemophilus parasuis. Congresso Latino Americano de Suinocultura**. Foz do Iguaçu, 2002.
- OLVERA, A. CASAMIGLIA, M., ARAGON, V. **Genotypic diversity of Haemophilus parasuis field strains**. Applied Environmental Microbiology, 2006, p. 3984-3992.
- RAPP-GABRIELSON V., KOCUS G. J., CLARK J. T. et al. **Haemophilus parasuis: inmunity in swine after vaccination**. Vet Med. 1992. p.83-90.
- SAIF, Y. M., FADLY, A. M., GLISSON, J.R., MCDUGALD, L.R., NOLAN, L.K., SWAYNE, D.E. **Diseases of Poultry**. 12th ed. Austrália, Blackwell Publishing, 2008. p. 291-303.
- SANTOS, J.L., SOBESTIANSKY, J. Doença de Glässer. In: SOBESTIANSKY, J. et al. **Doenças dos suínos**. Goiânia, Cãnone Editorial, 2007. p.89-93.
- SOBESTIANSKY, J. J.; BARCELLOS, D. E. S. N. de., MORES, N., OLIVEIRA, S. J. de., CARVALHO, L. F. **Clínica e Patologia Suína**. 2ª ed. Goiania, 2001. p.119-122.
- TORTORA, G.J., FUNKE, B.R., CASE, C.R., **Microbiologia**, 6ºed., editora Universitária, São Paulo. 2003. p. 368.
- TRABULSI, L.R., ALTERTHUN, F., GOMPERTZ, O.F., CANDEIAS, J.A.N., **Microbiologia**, 3ºed., editora Atheneu., São Paulo. p.131.