

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

SETOR PALOTINA

CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

MATHEUS MOLIN

RELATÓRIO DAS ATIVIDADES DO ESTÁGIO SUPERVISIONADO OBRIGATÓRIO

Áreas: Sanidade Animal, Laboratório e Microbiologia

PALOTINA – PR

2021

MATHEUS MOLIN

RELATÓRIO DAS ATIVIDADES DO ESTÁGIO SUPERVISIONADO OBRIGATÓRIO
Áreas: Sanidade Animal, Laboratório e Microbiologia

Relatório de estágio apresentado como conclusão
do Estágio Supervisionado Obrigatório do Curso de
Medicina Veterinária, no setor Palotina, na
Universidade Federal do Paraná.
Orientador: Prof. Geraldo Camilo Alberton

PALOTINA

2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANA
SETOR PALOTINA
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO
ATIVIDADES DO ESTÁGIO SUPERVISIONADO OBRIGATÓRIO

MATHEUS MOLIN

Orientador: Prof. Dr. Geraldo Camilo Alberton

Supervisora: Rafaela Berto

RESUMO

O presente relatório tem a finalidade de descrever o estágio curricular obrigatório realizado no décimo período do curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Paraná. O estágio ocorreu no Mercolab Laboratórios - Unidade Cascavel - PR no período de 07/06/2021 a 01/10/2021. O desenvolvimento do estágio foi supervisionado pela Médica Veterinária Rafaela Berto, sob orientação do Professor Geraldo Camilo Alberton, realizado de segunda a sexta-feira no horário das 08:00 horas às 15:00 horas com uma hora de almoço, totalizando 504 horas (6 horas por dia, totalizando 30 horas semanais). O relatório aborda a estrutura do laboratório, a rotina das análises realizadas e as atividades desenvolvidas pelo aluno na área de sanidade animal.

Palavras-chave: Medicina Veterinária, laboratório, sanidade animal.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- VISTA FRONTAL DO MERCOLAB	12
FIGURA 2 - PLACA DE VIDRO COM SORO E ANTÍGENO PARA REALIZAÇÃO DA SOROAGLUTINAÇÃO RÁPIDA.....	14
FIGURA 3 - PLACA DE TITULAÇÃO COM SORO SANGUÍNEO E SUSPENSÃO DE HEMÁCIAS PARA ENSAIO DE HI.....	15
FIGURA 4 - <i>KIT</i> COMERCIAL PARA REALIZAÇÃO DE ELISA	16
FIGURA 5 - TERMOCICLADOR PARA PCR EM TEMPO REAL.....	20
FIGURA 6- ETAPAS PARA PREPARAÇÃO DA LÂMINA HISTOLÓGICA	21
FIGURA 7 - MEDIÇÃO DA ALTURA DE UM VILO CONSIDERADO VIÁVEL PARA MEDIÇÃO (A), MEDIÇÃO DO DIÂMETRO DE UMA CRIPTA (C).....	22
FIGURA 8 - FASES DO PROCESSO DE ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE <i>SALMONELLA SPP.</i>	24
FIGURA 9 - PLACAS DE HK E VB ESTRIADAS	25

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - PRINCIPAIS DOENÇAS ANALISADAS POR PCR.....	18
QUADRO 2 - MEIOS UTILIZADOS PARA A REALIZAÇÃO DA PROVA BIOQUÍMICA PRELIMINAR SEGUINDO A PORTARIA 126 E A ISO 6579.....	25

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA PRESUNTIVA DE <i>SALMONELLA</i> (TSI e LIA)	26
TABELA 2 - IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA PRESUNTIVA DE <i>SALMONELLA</i> (SIM e UREASE)	26
TABELA 3 - DIFERENCIAÇÃO BIOQUÍMICA DE <i>SALMONELLA</i>	27
TABELA 4 - PRINCIPAIS EXAMES ACOMPANHADOS EM CADA SETOR DURANTE O PERÍODO DE ESTÁGIO.....	32

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

MAPA	- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
PNSA	- Programa Nacional de Sanidade Avícola
PNSE	- Programa Nacional de Sanidade dos Equídeos
PCR	- Reação em cadeia da polimerase
BHI	- <i>Brain Heart Infusion</i> (Cérebro Coração)
MKTTn	- Muller-Kauffmann Tetracionato Novobiocina
SAR	- Soroaglutinação Rápida
HI	- Inibição de Hemaglutinação
DN	- Doença de Newcastle
ELISA	- Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
IDGA	- Imunodifusão em Gel de Ágar
AIE	- Anemia Infecciosa Equina
DNA	- Ácido desoxirribonucleico
ISO	- Organização Internacional de Normalização
TSI	- Tríplice Açúcar Ferro
LIA	- <i>Lysine Iron</i> (Ferro Lisina)
SIM	- Indol Sulfeto Motilidade
AN	- Ágar Nutriente
VM	- Vermelho Metil
VP	- Voges-Proskauer

LISTA DE SÍMBOLOS

μ - Microlitros

® - Marca registrada

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 DESCRIÇÃO DO LOCAL DE ESTÁGIO	11
2.1 ESTRUTURA	11
3 DESENVOLVIMENTO DAS ATIVIDADES	12
3.1 MEIOS DE CULTURA	12
3.2 SOROLOGIA.....	13
3.2.1 Soroaglutinação rápida.....	13
3.2.2 Inibição de hemaglutinação.....	14
3.2.3 Ensaio de imunoabsorção enzimática.....	15
3.2.4 Imunodifusão em gel de ágar	17
3.3 BIOLOGIA MOLECULAR	17
3.4 HISTOLOGIA	20
3.4.1 Micotoxinas	21
3.4.2 Morfologia intestinal.....	21
3.5 MICROBIOLOGIA	22
3.5.1 Análises de <i>Salmonella</i>	22
3.5.2 Contagem de Enterobacteriaceae.....	28
3.5.3 Bacteriológico.....	29
3.5.4 Antibiograma	31
4 CASUÍSTICA ACOMPANHADA.....	32
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	33
REFERÊNCIAS.....	34

1 INTRODUÇÃO

O estágio curricular é de extrema importância para a formação Médica Veterinária, pois faz com que o aluno entre em contato com a prática realizada pelo veterinário no exercício de sua função na sua respectiva área de atuação. Com o estágio, o aluno tem a oportunidade de unir o conhecimento teórico visto ao longo da formação acadêmica, com a prática realizada no mercado de trabalho, através de empresas e instituições, complementando assim a graduação.

O estágio curricular foi realizado integralmente no Mercolab laboratórios que é credenciado pelo MAPA para análises de *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae* e *Salmonella* spp. das aves; mormo e anemia infecciosa dos equinos, além de realizar análises de rotina para doenças de suínos e bovinos, prestando assim o serviço de diagnóstico, monitoria, investigação e controle de doenças.

O Brasil atualmente é o 3º maior produtor de frangos do mundo e o maior exportador; já na suinocultura o Brasil ocupa a 4ª posição no ranking mundial de produção e exportação de carne suína (USDA, 2021). Possui um grande rebanho de bovinos e equinos e dessa forma a sanidade animal tem extrema importância para a prevenção e tratamento de enfermidades nos rebanhos e manutenção da qualidade de vida dos animais, para que assim a produção seja maximizada gerando melhores resultados.

Durante o estágio foram realizadas análises sorológicas, microbiológicas, moleculares, histológicas e necropsias para diagnóstico de doenças de aves, suínos, equinos e bovinos, realizando diagnóstico em saúde animal com a maior confiabilidade possível, auxiliando a indústria e produtores a mostrar a condição sanitária de seus animais.

2 DESCRIÇÃO DO LOCAL DE ESTÁGIO

O Mercolab é um laboratório fundado em 2002 na cidade de Cascavel – PR, possui também uma filial em Chapecó – SC, presta serviços veterinários, atua na área de sanidade animal, alimentos, bromatologia e água. Desempenha importante auxílio à indústria, em suas necessidades de investigação, controle e monitoria de doenças. O laboratório está credenciado junto ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA – para realização de análises oficiais de controle e monitoria para *Salmonella* e *Mycoplasma* das aves conforme o Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA) e de anemia infecciosa equina e mormo conforme o Programa Nacional de Sanidade dos Equídeos (PNSE).

2.1 ESTRUTURA

O laboratório conta com uma estrutura física única (FIGURA 1), na qual o seu interior é dividido em setores. Além da base física do laboratório propriamente dito, o Mercolab possui uma unidade experimental onde possui um aviário e uma fábrica de ração na qual são realizados diversos experimentos com frangos de corte. Segue descrito abaixo as instalações do laboratório atendendo normas do MAPA:

Recepção: Onde serão recebidos, registrados e identificados os materiais a serem examinados. Deverá ter pessoal próprio que procederá a conferência do material, observando a exatidão dos dados de remessa e o estado de conservação;

Escritório: Estrutura responsável pela emissão dos laudos do resultado devendo ser obrigatoriamente independente da sala da recepção;

Sala de exame: Neste local as amostras serão processadas, incluindo-se a realização dos exames bacteriológicos e sorológicos;

Meios e soluções: Este setor estará encarregado do preparo de meios e soluções;

Lavagem e esterilização: Este setor atenderá o laboratório procedendo a desinfecção, lavagem, montagem, esterilização e estocagem de material oriundo dos setores de exame, meios e soluções. (BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 1995).

Além dessas instalações o laboratório dispõe ainda do setor de biologia molecular, onde são realizados exames de PCR, setor de histologia e micotoxinas, além de toda a parte administrativa.

FIGURA 1- VISTA FRONTAL DO MERCOLAB



Fonte: Equipe Mercolab (2021).

3 DESENVOLVIMENTO DAS ATIVIDADES

A proposta do capítulo é mostrar a rotina de trabalho no laboratório, passando pelo setor de meios de cultura, sorologia, biologia molecular, histologia e microbiologia.

Em cada setor será evidenciado e explicado a rotina de realizações de exames, as principais doenças analisadas por setor, o protocolo para execução dos ensaios e as atividades realizadas pelo estagiário.

3.1 MEIOS DE CULTURA

No setor de meios de cultura é onde são produzidos todos os meios de cultura e soluções que são utilizados no laboratório. São produzidos os caldos de enriquecimento não seletivo (BHI e água peptonada), que serão utilizados nas análises microbiológicas e em análises de PCR; os caldos de enriquecimento seletivo (Tetrationato, Rappaport Vassiliadis e MKTTn); os meios bioquímicos preliminares e os complementares, que serão utilizados nas análises de *Salmonella*; os meios dispostos em placas utilizados nos ensaios de microbiologia (ágar Hecktoen, ágar verde brilhante, ágar sangue, entre outros), que serão usados na microbiologia. Também é produzido o gel de agarose que é depositado sobre uma lâmina de microscopia para a realização da imunodifusão em gel pelo setor da sorologia.

3.2 SOROLOGIA

No setor de sorologia são realizadas análises para doenças de aves e equinos, totalizando quatro tipos de ensaios: soroaglutinação rápida (SAR), inibição de hemaglutinação (HI), ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) e imunodifusão em gel de ágar (IDGA). Na qual se faz pesquisa de anticorpos através de amostras de soro sanguíneo, para determinar a presença ou não de anticorpos neutralizantes para uma determinada infecção.

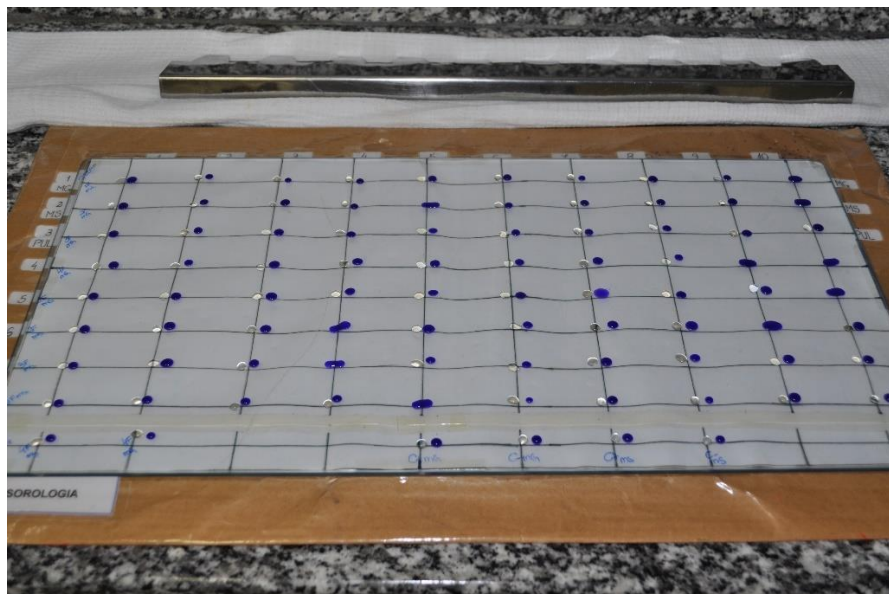
3.2.1 Soroaglutinação rápida

O ensaio é realizado para análises oficiais e diagnóstico de rotina de *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae* e *Salmonella pullorum*. Os plantéis avícolas de reprodução são submetidos a um controle sanitário rígido para micoplasmoses pelo MAPA, através do PNSA, sendo necessária notificação imediata ao Serviço Veterinário Oficial de qualquer caso confirmado de *Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma synoviae*. A soroaglutinação rápida (SAR) é o teste de triagem mais realizado como procedimento sorológico inicial para aferir plantéis de aves livres de micoplasmoses. Se o soro apresentar reação à diluição igual ou superior a 1:10, o resultado é considerado positivo, e são confirmados utilizando-se o teste ELISA ou teste de inibição da hemaglutinação (HI), além de técnicas de biologia molecular. (Cardoso et al. 2006).

Na rotina, quando era solicitado análise de *Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma synoviae*, eram recebidos 150 amostras e, quando era solicitado a análise de *Salmonella pullorum* junto com o micoplasma, eram recebidos 300 amostras de soro por lote. Antes da realização do SAR propriamente dito é necessário transferir o soro presente nos microtubos de coleta com uma pipeta para a placa de titulação, o que demandava certo tempo. Outro fator que dificultava a realização do exame era a qualidade do soro coletado, pois alguns microtubos vinham com o soro hemolisado ou não estavam totalmente dessorados e era necessário centrifugá-los. Adicionalmente, alguns não possuíam a quantidade adequada para a análise, sendo que nestes casos em que o material coletado comprometeria a realização da técnica, se fazia necessário pedir recoleta.

Para realização do teste coloca-se 30 μ de soro e 30 μ do antígeno específico em uma placa de vidro (FIGURA 2). Com auxílio de um pente homogeneíza o soro e o antígeno, espera 2 minutos e faz a leitura. Se for observado grumos, significa que formou-se o complexo antígeno-anticorpo, sendo assim a amostra é considerada positiva e segue para o exame confirmatório de ELISA.

FIGURA 2 - PLACA DE VIDRO COM SORO E ANTÍGENO PARA REALIZAÇÃO DA SOROAGLUTINAÇÃO RÁPIDA



FONTE: O autor (2021).

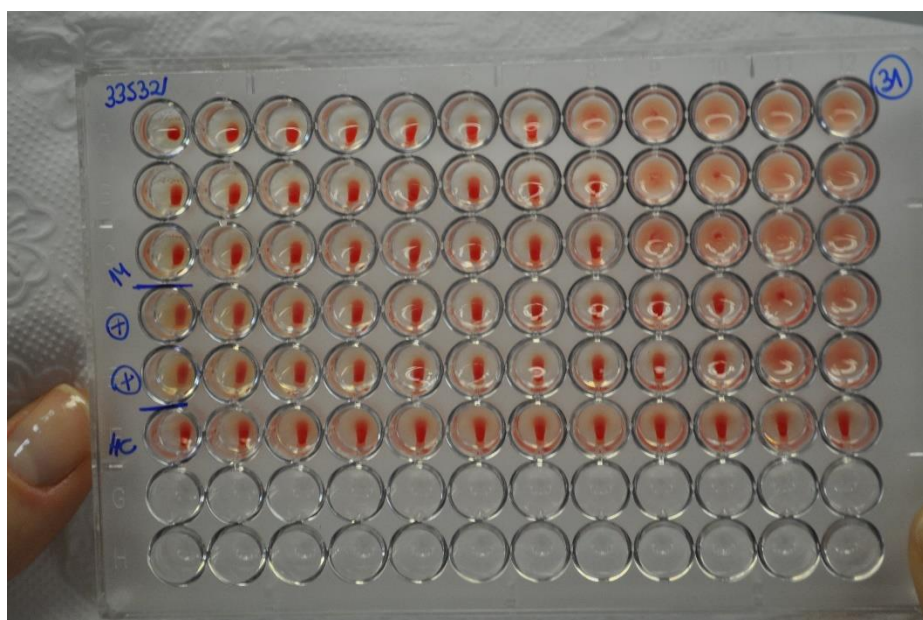
3.2.2 Inibição de hemaglutinação

A HI é usada para diagnóstico da doença de Newcastle (DN), Esta enfermidade é causada por um vírus da família *Paramyxoviridae*, subfamília *Paramyxovirinae*” (Brown et al., 1999), sendo que a reação de inibição de hemaglutinação é uma reação específica e de boa sensibilidade, que se baseia na ligação do anticorpo à hemaglutinina viral de que resulta a inibição da capacidade hemaglutinante do vírus (CANDEIAS, 1996).

A HI é um teste complexo, trabalhoso e demorado, pois para sua realização é necessário a utilização de pintos de 1 dia que eram provenientes de um incubatório da região de Cascavel – PR. A partir do momento em que os animais chegavam ao laboratório, era coletado sangue desses pintainhos e realizado a preparação da suspensão de hemácias.

Para realização da HI, dispensa-se 50μ de soro (amostra) e 50μ do antígeno em uma placa de titulação. Após a homogeneização, espera-se 30 minutos, adiciona-se 50μ da suspensão de hemácias e realiza-se a leitura. Considera-se positivo a amostra em que ocorre a formação do botão de hemácias e as mesmas escorrem livremente (efeito de lágrima) (FIGURA 3).

FIGURA 3 - PLACA DE TITULAÇÃO COM SORO SANGUÍNEO E SUSPENSÃO DE HEMÁCIAS PARA ENSAIO DE HI



FONTE: O autor (2021).

3.2.3 Ensaio de imunoabsorção enzimática

É realizado no laboratório os ELISA indireto, direto e de bloqueio. O mais utilizado no Mercolab é o indireto que é feito para doença de Gumboro, bronquite infecciosa, *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae*, encefalomyelite, doença de Newcastle, reovírus aviário, pneumovírus aviário, adenovírus aviário e mormo. O ELISA direto é feito para a leucose e o de bloqueio para anemia infecciosa das aves.

Para realização do ELISA são utilizados *kits* comerciais da Idexx® e Biochek® que contém o diluente, o conjugado (marcador enzimático), o substrato (que vai produzir cor se o anticorpo for específico ao antígeno utilizado, se ligando ao conjugado; sendo a coloração proporcional à quantidade de anticorpos), a solução de parada e os controles positivos e negativos (FIGURA 4). Primeiramente dilui-se a amostra com o diluente (a quantidade vai depender do fornecedor), espera-se 30 minutos e faz-se uma lavagem. Dispensa-se a amostra diluída na placa de titulação impregnada com antígeno, adiciona-se o conjugado, espera-se 30 minutos e realiza-se outra lavagem. Posteriormente adiciona-se o substrato. Por último, adiciona-se a solução de parada para frear a reação e realiza-se a leitura. A leitura é realizada através de uma máquina de espectrofotometria, que lê através da densidade óptica da cor produzida na reação.

FIGURA 4 - KIT COMERCIAL PARA REALIZAÇÃO DE ELISA



FONTE: O autor (2021).

O ELISA é designado para medir o nível relativo de anticorpos no soro das aves, por isso, é uma grande ferramenta de monitoria de enfermidades na avicultura. A interpretação é realizada por meio de gráficos e médias. A homogeneidade e os títulos devem ser analisados. A interpretação varia de acordo com a idade das aves e o esquema de vacinação utilizado.

Por meio da técnica do ELISA é possível avaliar como um plantel avícola está em relação a titulação de anticorpos maternos, de anticorpos vacinais e se o plantel foi desafiado por alguma doença específica a campo.

3.2.4 Imunodifusão em gel de ágar

É utilizado para diagnóstico de anemia infecciosa equina. Rotineiramente, a prova da imunodifusão em gel de Ágar (IDGA), também chamado teste de Coggins, é amplamente aceito e utilizado para a detecção dos infectados pelo agente da AIE a partir do antígeno viral p26 (FRANCO e PAES, 2011). A AIE é uma doença cosmopolita causada por um Retrovírus. Uma vez infectado o animal permanece com o vírus em seu organismo por toda sua vida, podendo apresentar anemia, febre, hemorragias, redução ou perda de apetite ou mesmo não apresentar sinais clínicos. É uma enfermidade que não apresenta nenhum tipo de tratamento ou vacina, sendo de notificação obrigatória para os órgãos competentes.

Para realização da técnica é utilizado uma lâmina de microscopia revestida com gel de agarose com 7 orifícios no gel, onde coloca-se o antígeno no orifício central e as amostras ao redor (3 orifícios para as amostras e outros 3 para os controles), incuba-se por 24 horas e realiza-se a primeira leitura. Posteriormente, incuba-se por 48 horas e realiza-se a segunda leitura. Se a amostra for positiva, observa-se linhas de precipitação no gel de agarose produzidos pela formação do complexo antígeno – anticorpo; se a amostra for negativa as linhas de precipitação não estarão presentes.

A AIE é uma doença de controle do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento através do Programa Nacional de Sanidade dos Equídeos, sendo o IDGA o teste padrão-ouro. Os animais positivos neste teste devem ser devidamente sacrificados, conforme estabelecido pelo MAPA.

3.3 BIOLOGIA MOLECULAR

No setor de biologia molecular é realizada a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para diagnóstico molecular de diversas doenças de aves e suínos (QUADRO 1). É um teste de alta sensibilidade e especificidade, não sendo necessário ter a presença de microrganismos viáveis na amostra biológica a ser analisada, tornando-se uma ferramenta importante para o diagnóstico precoce e monitoramento de doenças nas produções animais.

QUADRO 1 - PRINCIPAIS DOENÇAS ANALISADAS POR PCR

ANÁLISE	MATERIAL BIOLÓGICO AMOSTRADO
Coronavírus (Bronquite infecciosa)	Traqueia, pulmão, tonsila cecal, rim, músculo, testículo, ovário, oviduto, suabe de cloaca, seios nasais e sacos aéreos.
Circovírus suíno	Linfonodo, pulmão, baço, rim e intestino.
Birnavírus (Gumboro)	Bursa de Fabricius.
<i>Mycoplasma gallisepticum</i>	Traqueia, pulmão, seios nasais e sacos aéreos.
<i>Mycoplasma synoviae</i>	Traqueia, pulmão, articulação, seios nasais e sacos aéreos.
<i>Salmonella spp.</i>	Suabe de arrasto, suabe de superfície, fezes de aves e suínos e farinhas.
Parvovírus suíno	Feto, placenta e suabe vaginal
<i>Haemophilus parasuis</i>	Pulmão, pericárdio, coração, líquido e/ou suabe de articulação ou cérebro.
<i>Pasteurella multocida</i>	Pulmão, cabeça e medula óssea
Reovírus	Traqueia, pulmão, intestino, tonsilacecal, articulação e líquido sinovial.
Influenza A	Pulmão, traqueia e suabe respiratório.
<i>Brachyspira hyodysenteriae</i>	Intestino, fezes e suabe retal.
<i>Brachyspira pilosicoli</i>	Intestino fezes e suabe retal.
<i>Lawsonia intracellularis</i>	Intestino, fezes e suabe retal.
Tipificação molecular de <i>Salmonella gallinarum/pullorum, enteritidis, typhimurium, heidelberg</i>	Cultura em ágar nutriente, suabe de arrasto, suabe de superfície e fezes.

FONTE: O autor (2021).

É importante saber sobre o material biológico de eleição para as análises de PCR, para detecção de possíveis problemas que possam ocorrer na identificação das amostras por parte do setor de recebimento. Por exemplo: se chega no setor amostras de Bursa de Fabricius para análise de *Salmonella spp.*, sabe-se que a *Salmonella* não afeta este órgão linfóide, sendo provavelmente uma amostra para pesquisa de

Birnavírus. Também é importante ter conhecimento sobre o material biológico analisado para saber quais órgãos coletar se chegar o animal vivo ou morto para a realização da coleta, o que não é muito comum, normalmente chega no laboratório o órgão já coletado do campo.

A PCR consiste na síntese enzimática *in vitro* de cópias de fragmentos específicos de ácidos nucleicos, onde a partir de uma única molécula de DNA molde, é possível gerar até cem bilhões de moléculas similares em uma reação (SAIKI et al., 1988). Para a realização da PCR, primeiro realiza-se a coleta da amostra biológica, posteriormente faz a extração do material genético do possível agente infeccioso presente na amostra. Depois faz-se a preparação do mix de reagentes e por último mistura-se o material genético extraído da amostra com o mix de reagentes e coloca-se no termociclador para realização da amplificação.

A extração pode ser feita de forma manual utilizando pipetas e microtubos ou de forma automática utilizando um extrator. Durante o estágio era realizada a extração manual, por ter um custo-benefício maior que a automática; sendo esta última somente utilizada quando tinha um grande número de amostras a serem rodadas por dia (mais de 30 amostras). Para realização da extração é utilizado um *kit* comercial e é dividido em 4 etapas: tampão de lise, lavagem 1, lavagem 2 e eluição. Primeiro inclui no microtubo 20 μ de proteinase K e 200 μ da amostra e adicionar 350 μ do tampão de mistura vxl (lise), posteriormente inserir a placa de extração com os eppendorfs no equipamento, colocar os protetores plásticos das hastes magnéticas na posição correta e iniciar o protocolo de extração, realizando a lavagem 1 e a lavagem 2 sucessivamente e por fim realiza-se a eluição.

Com a extração feita é preparado o coquetel de reagentes, que consiste basicamente em primers e enzimas (polimerase), que são necessárias para ocorrer a amplificação da amostra e, por sintetizar os novos fios complementares dos modelos de DNA de fita única, respectivamente. A amostra extraída é misturada com o coquetel de reagentes e colocada no termociclador, que vai ciclar diferentes temperaturas a fim de induzir a amplificação da amostra, a partir do momento que ocorre a amplificação libera fluorescência que vai ser captada pelo termociclador para geração das curvas de amplificação em tempo real (FIGURA 5).

FIGURA 5 - TERMOCICLADOR PARA PCR EM TEMPO REAL



FONTE: O autor (2021).

3.4 HISTOLOGIA

No setor de histologia são preparadas lâminas para análises histopatológicas, é realizado também análise de morfologia intestinal e análise de micotoxinas.

Para as análises histopatológicas é realizado um preparado histológico padrão, a fim de auxiliar no diagnóstico de patologias. As lâminas prontas são enviadas para uma Médica Veterinária patologista no Rio Grande do Sul, parceira do Mercolab, para realizar a devida interpretação histopatológica.

A amostra chega ao laboratório já fixada em formol, a partir disso realiza-se a clivagem da mesma, na qual seleciona partes que tenham alterações macroscópicas e partes sem alterações no tecido (tecido de transição). Coloca-se a amostra clivada em cassetes para posterior inclusão no aparelho histotécnico - na inclusão é realizada a desidratação, diafanização e impregnação do tecido, pois a amostra passa por diferentes concentrações de formol, álcool, xilol e parafina -. Posteriormente ocorre a montagem dos blocos em parafina, que são submetidos ao corte com o uso de um micrótomo (FIGURA 6). De acordo com Prophan (1992), para corte de tecido de rotina, é convencional definir o seletor de espessura em 6 micrometros. Após obter fitas de parafina de qualidade através da microtomia realiza-se a desparafinação da lâmina na estufa, em xilol e em álcool, em seguida realiza-se a hidratação em água. Por fim,

realiza-se a coloração com hematoxilina – eosina e deixa secar em temperatura ambiente. Após o processo de preparação da lâmina histológica, as mesmas são enviadas para leitura.

FIGURA 6- ETAPAS PARA PREPARAÇÃO DA LÂMINA HISTOLÓGICA



FONTE: O autor (2021).

LEGENDA: A-> Aparelho histotécnico

B-> Montagem dos blocos em parafina

C-> Microtomia

3.4.1 Micotoxinas

No setor é realizado análises de micotoxinas aflatoxina, zearalenona, fumonisina, don, ocratoxina e toxina T2 por ensaio de imunoabsorção.

São recebidos vários tipos de amostras, como: milho, trigo, soja, farelos, farinhas, silagem, feno, suco de uva, entre outros. É utilizado um *kit* comercial, na qual deve-se pesar 20g da amostra e adicionar 100mls de metanol, tritura-se a amostra por 3 minutos e filtra. É adicionado ao filtrado uma solução de detecção e homogeneíza-se, a amostra com a solução homogeneizada é transferida para uma placa de titulação impregnada com anticorpo e adiciona-se o substrato de detecção, incuba-se por 2 min, realiza-se 4 lavagens e adiciona-se a solução de parada. Por fim realiza-se a leitura através de um espectrofotômetro.

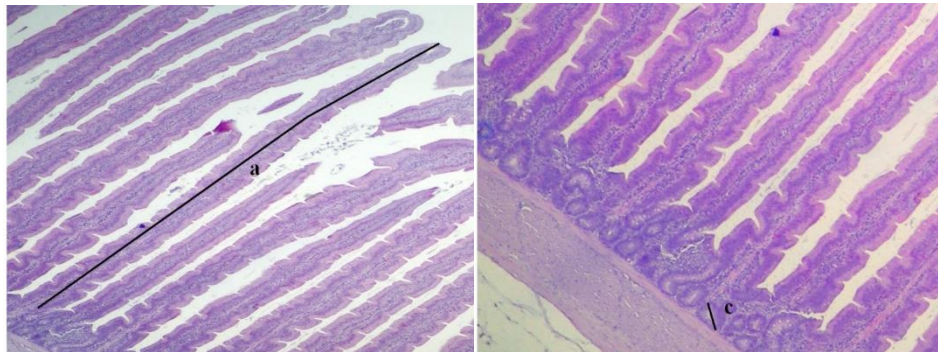
3.4.2 Morfologia intestinal

É realizado confecção de lâmina histológica de tecidos de intestino, corado por hematoxilina – eosina, para observação da morfologia intestinal e mensuração da altura de vilosidades e profundidade de criptas.

A preparação da lâmina histológica de tecidos de intestino segue a preparação de uma lâmina padrão, na qual a amostra passa por fixação, clivagem, inclusão, montagem do bloco em parafina, microtomia, desparafinação, hidratação e coloração.

Através de uma câmera acoplada em um microscópio realiza-se a captura da imagem dos tecidos e com auxílio de um *software* faz a mensuração de vilosidades e criptas, realizando 10 medições de criptas e 10 medições de vilosidades para cada fragmento do intestino e avalia-se a integridade das estruturas (FIGURA 7).

FIGURA 7 - MEDIÇÃO DA ALTURA DE UM VILO CONSIDERADO VIÁVEL PARA MEDIÇÃO (A), MEDIÇÃO DO DIÂMETRO DE UMA CRIPTA (C)



FONTE: Gava (2012).

3.5 MICROBIOLOGIA

No setor de microbiologia são realizadas análises de *Salmonellas* (isolamento e sorotipificação), exame bacteriológico, antibiograma e contagem de microorganismos, como: enterobactérias, *Bacillus spp.*, bolores e leveduras, *Clostridium perfringens*, coliformes totais e termotolerantes, *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, entre outros. Para as análises de *Salmonella spp.* o Mercolab segue duas metodologias distintas, a portaria 126 do MAPA (1995) e a ISO 6579-3 (2014) / ISO 6579-1 (2017).

3.5.1 Análises de *Salmonella*

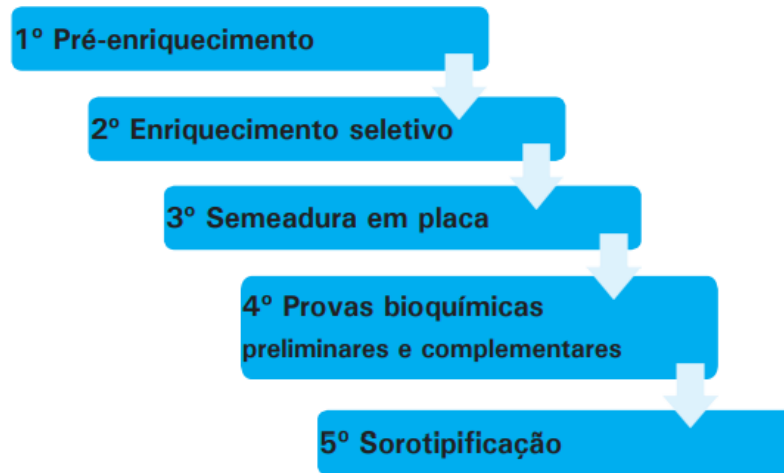
A *Salmonella* de maior importância na saúde animal e humana é a *Salmonella* entérica, subespécie entérica, tendo os sorovares de controle pelo PNSA as *Salmonellas*, gallinarum, pullorum, enteritidis e typhimurium.

Essas bactérias infectam as aves e podem causar três enfermidades distintas: a pulorose, cujo agente é *Salmonella Pullorum*; o tifo aviário, causado pela *Salmonella Gallinarum*; e o paratifo aviário, causado por qualquer outro agente que não seja as citadas (BERCHIERI JR. 2000). Enquanto a *Salmonella enteritidis* e *typhimurium* são causadoras de toxinfecção alimentar em seres humanos, sendo importantes agentes do ponto de vista de saúde pública.

São recebidos diversos tipos de amostras no laboratório, como: animais vivos/mortos, fezes, material de cama, matéria prima, mecônio, órgãos, ovos bicados, ração suabe de cloaca, suabe de arrasto, suabe de superfície/mãos/manipulador, suabe de equipamentos, entre outros.

É importante tomar alguns cuidados com amostras já coletadas. Primeiramente a identificação do material é feito pelo setor de recebimento, seguindo um número de protocolo interno do laboratório. Posteriormente é necessário analisar a qualidade do material coletado, fazendo as alterações que forem necessárias, por exemplo: um nasco completamente cheio com suabe de arrasto, se faz necessário retirar um pouco do suabe (até o nasco atingir 25g da amostra), para que possa ser adicionado o meio de enriquecimento não seletivo, e colocar o suabe retirado em um outro nasco vazio, para guardar como contraprova.

Na rotina quando chegava amostras não coletadas para análise de *Salmonella* spp. alguns funcionários do setor deslocavam-se para a sala de necropsia para realizar a coleta do material, o número de funcionários necessários para realizar a coleta dependia da quantidade de amostras recebidas, assim como o tipo de coleta também dependia do material recebido. Por exemplo: se a amostra fosse 20 ovos bicados, separava-se 10 ovos para a análise e 10 ovos para guardar como contraprova. De forma asséptica, tomando cuidado para evitar contaminação cruzada, retirava-se o pintainho do ovo e com tesoura e pinça estéril coletava-se fígado, coração, gema e ceco e colocava-se o material coletado em potes devidamente identificados para posteriormente dar continuidade no processo de isolamento e identificação da *Salmonella* spp. (FIGURA 8).

FIGURA 8 - FASES DO PROCESSO DE ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE *SALMONELLA SPP.*

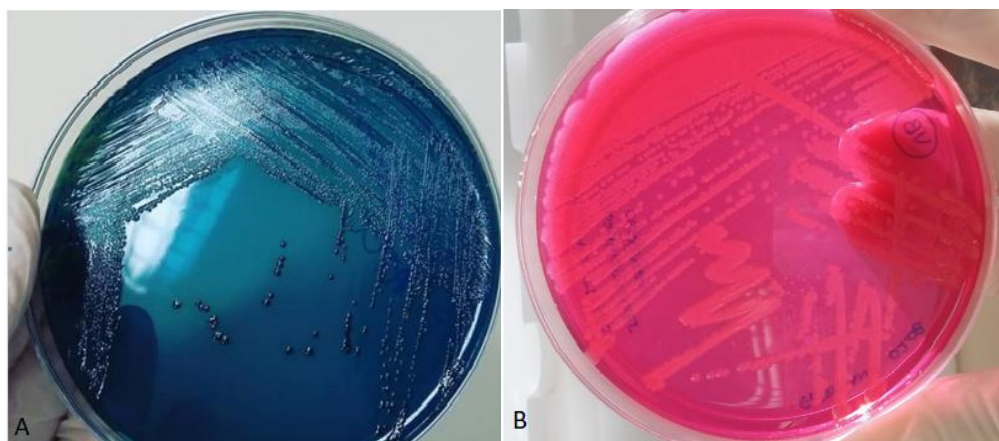
FONTE: DUARTE, S. C. et al. (2016).

Primeiramente é adicionado a amostra caldo de enriquecimento não seletivo (BHI ou água peptonada), incuba-se de 35 a 37°C por 24 horas. O pré-enriquecimento é importante para a recuperação das células bacterianas deprimidas ou danificadas.

Posteriormente à incubação é realizado o enriquecimento seletivo, na qual é inoculado 2g da amostra em 20ml de caldo Tetrationato e 0,2g em 20ml de caldo Rappaport, incuba-se a 42°C por 24 horas. O enriquecimento seletivo é importante para favorecer o crescimento da *Salmonella* em detrimento de outras bactérias.

A partir dos caldos de enriquecimento seletivo estria-se com alças estéreis em placas contendo ágar verde brilhante (VB) e ágar hektoen (HK), incuba-se a temperatura de 35 a 37°C por 24 horas. Realiza-se a leitura das colônias desenvolvidas nas placas, no ágar hektoen as colônias características de *Salmonella* spp. são verde-azuladas com ou sem centro negro, enquanto no ágar verde brilhante são colônias rosadas com halo transparente (FIGURA 9).

FIGURA 9 - PLACAS DE HK E VB ESTRIADAS



FONTE: DUARTE, S. C. et al. (2016).

LEGENDA: A-> Colônias típicas de *Salmonella* spp. em ágar Hecktoen

B-> Colônias típicas de *Salmonella* spp. em ágar Verde Brilhante.

Após a leitura das placas deve-se repicar em até no máximo 8 colônias características de *Salmonella* spp. e semeá-las nos meios presuntivos para realização da prova bioquímica preliminar, na qual difere-se os meios de cultura utilizados entre as metodologias da Portaria 126 MAPA e da ISO 6579 (QUADRO 2):

QUADRO 2 - MEIOS UTILIZADOS PARA A REALIZAÇÃO DA PROVA BIOQUÍMICA PRELIMINAR SEGUINDO A PORTARIA 126 E A ISO 6579

PORTARIA 126	ISO 6579
AN	AN
TSI	TSI
Lia	Lisina
Caldo Úreia	Ágar Úreia
SIM	

FONTE: O autor (2021).

As séries bioquímicas são utilizadas para a avaliação das reações metabólicas das bactérias, a fim de auxiliar na identificação de diferentes espécies bacterianas. Segundo Trabulsi (2008 citado por SCHUBERT, 2008), as bactérias são diferenciadas pelo carbono que metabolizam e pelos tipos e quantidades de ácidos produzidos a partir da fermentação desses substratos. A fermentação de carboidratos é uma das características bioquímicas mais importantes pelas quais espécies da família *Enterobacteriaceae* podem ser reconhecidas.

A leitura para caracterização de *Salmonella* no TSI e LIA, segue as seguintes características (TABELA 1). A coloração característica de *Salmonella* spp. no TSI, caracteriza-se por coloração amarela na base (fermentação da glicose) e vermelha no

bisel (não fermentação da glicose e sacarose). No LIA observa-se coloração púrpura na base e na rampa com produção de H₂S (base escura).

TABELA 1 - IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA PRESUNTIVA DE *SALMONELLA* (TSI e LIA)

Comportamento bioquímico		<i>Salmonella pullorum</i>	<i>Salmonella gallinarum</i>	<i>Salmonella sp.</i> subespécie I	<i>Salmonella sp.</i> subespécie III a e IIIB
TSI	Base	A gás d	A gás -	A gás +	A gás +
24horas	Bisel	K	K	K	K ou A
	H ₂ S	D	+	+	+
LIA	Base	K	K	K	K
24horas	H ₂ S	D	+	+	+

FONTE: DUARTE, S. C. et al. (2016).

LEGENDA: *Salmonella sp* sub espécie I – *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis* (entre outras)

Salmonella sp sub espécie III a e III b - Antigo grupo Arizona

A – amarelo (ácido)

K – vermelho no TSI ou púrpura no LIA (alcalino)

d – variável

Enquanto, a leitura para a caracterização de *Salmonella* no SIM e Ureia, seguem as seguintes características (TABELA 2). O SIM é utilizado para verificação da motilidade da bactéria (*Salmonellas* móveis turvam o meio inteiro, enquanto *Salmonellas* imóveis turvam ao longo da linha de inóculo) e a capacidade de degradação do aminoácido triptofano (a *Salmonella* é indol negativa).

TABELA 2 - IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA PRESUNTIVA DE *SALMONELLA* (SIM e UREASE)

Comportamento bioquímico	<i>Salmonella pullorum</i>	<i>Salmonella gallinarum</i>	<i>Salmonella sp.</i> subespécie I	<i>Salmonella sp.</i> subespécies III a e IIIB
SIM	-	-	+	+
Urease	-	-	+	+

FONTE: DUARTE, S. C. et al. (2016).

LEGENDA: *Salmonella sp* sub espécie I: *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis* (entre outras)

Salmonella sp sub espécie III a e III b: antigo grupo Arizona

A: amarelo (ácido)

d: variável

Segundo a Portaria 126 MAPA (1995), as cepas que forem negativas para urease e apresentarem comportamento característico de *Salmonella* no TSI e LIA móveis ou imóveis no SIM devem seguir para uma caracterização bioquímica complementar. A prova bioquímica complementar tem grande importância para diferenciação das *Salmonellas* imóveis, pois não são totalmente sorotipificadas.

A leitura do teste bioquímico complementar para a caracterização de *Salmonella* segue as seguintes características (TABELA 3):

TABELA 3 - DIFERENCIAÇÃO BIOQUÍMICA DE *SALMONELLA*

Comportamento bioquímico	<i>Salmonella</i> sp. Sub-espécie I	<i>Salmonella</i> pullorum	<i>Salmonella</i> gallinarum	<i>Salmonella</i> sp. Sub-espécies III a e IIIB
Indol	-	-	-	-
VM	+	+	+	+
VP	-	-	-	-
Cit. Simmons	+	-	-	+
H ₂ S no TSI	+	d	+	+
Urease	-	-	-	-
Fenilalanina desaminase	-	-	-	-
Lisina descarboxilase	+	+	+	+
Arginina desidrolase	d	d	-	d
Ornitina descarboxilase	+	+	-	+
Motilidade	+	-	-	+
Malonato	-	-	-	+
D-glicose produção de ácido	+	+	+	+
D-glicose produção de gás	+	d	-	+
Lactose	-	-	-	d
Sacarose	-	-	-	-
D - manitol	+	+	+	+
Dulcitol	+	-	+(*)	-
Maltose	+	-(**)	+	+

FONTE: DUARTE, S. C. et al. (2016).

LEGENDA: *Salmonella* sp sub espécie I: *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis* (entre outras)

Salmonella sp sub espécie III a e III b: antigo grupo Arizona

d – Diferentes tipos

(*) – Ocasionalmente negativa

(**) – ou tardiamente positiva

As cepas que apresentarem perfil compatível com *Salmonella* no bioquímico complementar são sorotipificadas, através de caracterização antigênica pela técnica de aglutinação rápida. Na qual são utilizados antissoros somáticos e antissoros flagelares para identificação da cepa de *Salmonella*.

As colônias suspeitas são repicadas em ágar nutriente, na qual é adicionada 0,5-1,0 ml de solução salina 0,85%. Primeiramente a caracterização se dá frente ao antissoro somático “O” e ao antissoro flagelar “H”. É depositado separadamente sobre uma lâmina de microscopia, uma gota de solução salina 2%, uma de antissoro “O” e uma de antissoro “H”, dispensa-se uma gota da suspensão bacteriana sobre cada uma delas, homogênea-se e realiza-se a leitura instantaneamente. É considerado

positivo a reação que apresentar aglutinação na mistura cultura e soro anti *Salmonella*, enquanto a ausência de aglutinação é considerada negativo.

Além dos antissoros, é utilizado a mistura da cultura com solução salina para identificação de cepas rugosas (autoaglutinantes), na qual se houver aglutinação na mistura cultura e solução salina indica que a cepa é rugosa (autoaglutinante), inviabilizando assim a caracterização antigênica.

As cepas móveis não rugosas que foram positivas frente ao antissoro “O”, seguem sua caracterização antigênica frente aos antissoros “B” e “D” de *Salmonella*. Ocorrendo aglutinação ao soro anti-sômático “B”, a caracterização antigênica será prosseguida frente aos soros anti-flagelares H1 e H2 de *Salmonella*, a fim de identificar a *Salmonella typhimurium* (1, 4, [5], 12:i:1, 2). As cepas que não forem positivas frente ao antissoro “B”, devem ser submetidas a caracterização frente ao antissoro “D”, ocorrendo aglutinação frente ao antissoro “D”, segue o teste frente aos soros anti-flagelares Hg; Hm e Hp, a fim de identificar a *Salmonella enteritidis* (1,9,12:g,m:-). A aglutinação 4:i:2 confirma o sorovar *Salmonella typhimurium*, enquanto a aglutinação 9:g,m confirma o sorovar *Salmonella enteritidis*.

As cepas imóveis não rugosas que forem positivas perante o antissoro somático “O”, seguem a caracterização perante o antissoro somático “D”, as cepas que forem positivas são diferenciadas bioquimicamente.

Para emissão do resultado completo da pesquisa de *Salmonella* (isolamento e sorotipificação) leva de 5 a 6 dias, sendo um teste demorado para a emissão do laudo final, requerendo notificação imediata de qualquer caso confirmado de *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella gallinarum* e *Salmonella pullorum*.

3.5.2 Contagem de Enterobacteriaceae

A contagem de *Enterobacteriaceae* é a principal contagem microbiológica realizada no setor, na qual segue o método especificado pela ISO 21528-2 (2017) e a ISO 7218 (2007). O objetivo é quantificar a presença de enterobactérias nas amostras testadas. A quantificação de enterobactérias pode ser feita pelo método de contagem padrão em placas utilizando o Ágar Vermelho Violeta Bile Glicose (VRBG), como meio de cultivo. O VRBG é um meio seletivo diferencial contendo cristal de violeta e sais biliares que inibem bactérias Gram positivas (DA SILVA, 2017).

Primeiramente a amostra sofre uma diluição inicial (ex: 25g da amostra, adicionar 9x25 ml de diluente), seguida por diluições decimais sucessivas (ex: transferir 1ml da diluição anterior para 9ml de diluente), inicia-se a diluição inicial 10^{-1} e sucessivamente efetua-se as demais diluições desejadas em solução salina peptonada 0,1% em tubo, as diluições seriadas são essenciais para que seja possível a contagem das colônias em placa.

Após as diluições procede à técnica de semeadura em profundidade, inoculando 1ml das amostras diluídas em placas de Petri, indicadas com suas respectivas diluições, após inóculo, verte-se aproximadamente 10ml do ágar VRBG sobre a placa com a amostra, posteriormente homogeneíza-se o inóculo com o meio com movimentos circulares e deixa em repouso até total solidificação, após a solidificação do meio, adiciona-se uma sobreposição de 15ml do mesmo ágar VRBG e deixa solidificar. Por fim as placas são incubadas a 37°C por 24h, para posterior leitura.

As colônias características de enterobactérias são de cor rosa a vermelho ou roxa com ou sem halo de precipitação. Seleciona-se placas que contenham até 150 colônias características, escolhendo aleatoriamente 5 colônias típicas para repique, repica-se as colônias em placa de ágar nutriente e para um tubo com meio de glucose OF medium, na qual incuba-se a 37°C por 24h, para posterior teste de fermentação (confirmatório), em que se após a incubação a coloração ficar amarela por todo o tubo considera-se a reação positiva. Para o teste confirmatório além do teste de fermentação (positivo), utiliza-se também o teste de oxidase (negativo), na qual colônias glucose positivas e oxidase negativas são confirmadas como enterobactérias.

3.5.3 Bacteriológico

É realizado exame bacteriológico para identificação de agentes patogênicos em aves, suínos e bovinos. O exame bacteriológico é utilizado para identificação de bactérias e suas propriedades, com o objetivo de estabelecer diagnóstico microbiológico, auxiliando na monitoria de enfermidades presentes no campo. As amostras a serem analisadas dependem da espécie animal e do microrganismo a ser pesquisado. Aqui serão descritos os principais agentes isolados para exame bacteriológico durante o período de estágio.

Identificação de *Escherichia coli*:

No ágar sangue as colônias características são de cor cinza, ao passo que em ágar MacConkey são rosas. Após a incubação, seleciona-se algumas colônias para provas bioquímicas, na qual o citrato deve ser negativo, TSI deve ficar ácido (amarelo), com produção de gás e sem H₂S, SIM com indol positivo, sem H₂S e VM positivo, para confirmação de *Escherichia coli*.

Identificação de *Streptococcus* spp.:

Em ágar sangue as colônias características de *Streptococcus* spp. são pequenas, geralmente transparentes ou esbranquiçadas, podendo ter hemólise ou não. Para identificação de cepas de *Streptococcus agalactiae*, um dos principais causadores de mastite bovina, realiza-se o teste de Camp, na qual semeia-se uma linha reta vertical no centro da placa de ágar sangue, com alça carregada de *Staphylococcus aureus*, na horizontal semeia-se uma linha com *Streptococcus* spp. a ser testado, bem próximo a linha do *Staphylococcus aureus* porém sem encostar, se formar hemólise em formato de chapéu na intersecção do crescimento das duas bactérias o teste é considerado positivo.

Teste de amilase para *Streptococcus suis*:

O *Streptococcus suis* é um importante microrganismo na suinocultura, que desencadeia meningites, septicemias, poliserosites, artrites, endocardites, pneumonia, e morte súbita (RIVA, 2008).

Para realização do teste de amilase em uma placa de ágar Columbia com amido 1% semeia-se três colônias de *Streptococcus* spp. e incuba-se por 24h, para revelação é preciso acrescentar uma solução de lugol até cobrir a placa, se o local de semeadura ficar claro (como se fosse uma hemólise), significa reação positiva.

Identificação de *Glaesserella parasuis*, *Avibacterium paragallinarum*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*:

O *Glaesserella parasuis* é o agente causador da doença de Glasser que acomete suínos jovens (principalmente na fase de creche) causando poliartrite, poliserosite e meningite, o *Avibacterium paragallinarum* é o agente causador da coriza infecciosa que afeta principalmente o trato respiratório superior das aves, enquanto o *Actinobacillus pleuropneumoniae* causa a pleuropneumonia suína levando a pneumonia e consequente morte.

As colônias desses agentes infecciosos crescem ao redor de estrias de *Staphylococcus aureus*, em ágar sangue as colônias são pequenas, menores que

1mm, circulares e quanto mais próximas estiverem do *Staphylococcus aureus* podem ter um leve aumento de tamanho.

Identificação de *Pasteurella multocida*:

A *Pasteurella multocida* é um agente oportunista secundário que causa pneumonia principalmente no período de terminação dos suínos, as colônias em ágar sangue, normalmente são circulares, podem apresentar um aspecto mucóide, são acinzentadas e não são hemolíticas.

Isolamento de *Bordetella spp.*:

Isoladas de sistema respiratório de suínos, em ágar sangue apresentam-se como colônias pequenas, translúcidas e brilhantes, ao passo que em ágar MacConkey, apresentam-se como colônias pequenas, com aspecto rosado e com centro escuro.

3.5.4 Antibiograma

Para realização de antibiograma, o laboratório segue a metodologia BrCast para método disco-difusão para Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos, em que utiliza-se discos de papel impregnados com antimicrobianos, difundidos em ágar, para a avaliação de sensibilidade microbiana. Primeiramente, ocorre a inoculação da suspensão bacteriana a ser pesquisada em placas de Petri com ágar, em seguida aplica-se os discos de antimicrobianos na placa de forma equidistante, os discos são selecionados de acordo com o grupo químico, caso clínico e disponibilidade comercial, incuba-se de 16 a 24 horas a 37°C e por fim realiza-se a leitura.

O resultado é observado através do espectro de ação do antimicrobiano, determinado pelo fabricante, esta medição é realizada com uma régua, medindo o diâmetro (milímetros) dos halos, a partir disso é possível classificar a amostra bacteriana em suscetível (S), intermediária (I) ou resistente (R) ao antimicrobiano.

O exame de antibiograma é importante para guiar o Médico Veterinário a escolher a melhor opção terapêutica para o tratamento de determinada enfermidade, além de ser possível também identificar microrganismos multirresistentes.

4 CASUÍSTICA ACOMPANHADA

Durante o período de estágio foi acompanhado diversos exames, em todos os setores do laboratório (TABELA 4), porém no Mercolab o principal exame realizado é a análise de *Salmonella* (isolamento e sorotipificação), consequentemente as amostras para *Salmonella* correspondem a maior quantidade de material que chega no laboratório. A quantidade de amostras que chegam no laboratório para as diferentes análises prestadas pelo Mercolab é muito variada. Em algumas situações existia um fluxo de amostras muito grande para serem processadas, sendo necessário realocar funcionários de setor para ajudar onde existia maior demanda e também tinha casos em que o número de amostras a serem processadas era baixo possibilitando os funcionários a acabarem as análises antes do período convencional.

TABELA 4 - PRINCIPAIS EXAMES ACOMPANHADOS EM CADA SETOR DURANTE O PERÍODO DE ESTÁGIO

Exame	Setor	Tempo de acompanhamento
Isolamento de <i>Salmonella</i> spp.	Microbiologia	45 dias
Soroaglutinação rápida	Sorologia	15 dias
PCR	Biologia molecular	10 dias
Histopatológico	Histologia	5 dias

Fonte: O autor (2021).

Portanto o número de amostras que chegam no laboratório é muito variável e como durante o estágio não é possível acompanhar o processo inteiro que a amostra percorre, pois o estagiário não passa pelo setor de recebimento e nem pelo setor de emissão de laudos, não se tem um número exato de amostras processadas em cada um dos exames realizados durante todo o período de estágio.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estágio curricular é a última disciplina do curso de Medicina Veterinária, e é importante para que o graduando entre em contato com a prática realizada pelos profissionais em sua área de atuação. Através do estágio é possível juntar os conhecimentos adquiridos durante toda a graduação com o exercício prático da profissão por meio de empresas e instituições.

A realização do estágio permitiu conhecer e atuar na área de sanidade animal, entender o funcionamento de um laboratório credenciado pelo MAPA, além de auxiliar na realização dos ensaios, em uma instituição com bastante renome no mercado e com uma grande variedade de análises realizadas para diagnóstico de doenças em diferentes espécies, prestando serviços veterinários com o propósito de servir a indústria, em suas necessidades de monitoria de enfermidades que possam acometer os animais de produção.

REFERÊNCIAS

BERCHIERI JR, A. Salmoneloses Aviárias, In: BERCHIERI JÚNIOR, A.; MACARI, M. **Doenças das aves**, Campinas: FACTA, 2000. Cap. 4.1, p. 185-195.

BRASIL. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 126, de 03 de Novembro de 1995. Normas para o credenciamento e monitoramento de laboratórios de diagnóstico das salmonelas aviárias (*S. Enteritidis*, *S. Gallinarum*, *S. Pullorum* e *S. Typhimurium*). Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, n. 212, 6 nov. 1995. Seção 1, p. 17694-17698.

BROWN, C.; KING, D.J.; SEAL, B.S. **Pathogenesis of Newcastle Disease in Chickens Experimentally Infected with Viruses of Different Virulence**. *Veterinary Pathology*. v. 36, p. 125-132, 1999.

Br Cast – método de disco-difusão para teste de sensibilidade aos antimicrobianos versão 6.0 (janeiro de 2017)>. acesso em 20 out.2021

CANDEIAS, JAN. Laboratório de virologia: manual técnico. **São Paulo, SP, Editora da Universidade de São Paulo**, 1996. 56p.

CARDOSO, A. L. S. P. et al. Monitoria sorológica da micoplasmose em plantéis de aves reprodutoras no Brasil através do teste de soroaglutinação rápida. **Biológico, São Paulo**, v. 73, n. 1, p. 23-26, 2006.

DUARTE, S. C. et al. Guia ilustrado para isolamento de *Salmonella* spp de origem avícola. **Embrapa Suínos e Aves-Documents (INFOTECA-E)**, 2016.

ESTADOS UNIDOS. Department of Agriculture. USDA.gov - United States Department of Agriculture. Disponível em:>. Acesso em: 27 out. 2021.

Franco, Marília Masello Junqueira; Paes, Antonio Carlos. Anemia infecciosa equina. **Veterinária e Zootecnia**, v. 18, n. 2, p. 197-207, 2011. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/140881>>. Acesso 7 out. 2021.

Gava MS. **Metodologia de morfometria intestinal em frangos de corte** [dissertação]. Porto Alegre (RS): Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2012.

ISO 7218:2007. Microbiology of food and animal feeding stuffs – General requirements and guidance for microbiological examinations

ISO 21528-2:2017. Microbiology of the food chain – Horizontal method for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae – Part 2: Colony-count technique

ISO 6579-1:2017. Microbiology of the food chain – Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella* – Part 1: Detection of *Salmonella* spp.

ISO/TR 6579-3:2014. Microbiology of the food chain – Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella*: Part 3: Guidelines for serotyping of *Salmonella* spp.

Normas para credenciamento e monitoramento de laboratórios de diagnósticos de Salmonelas aviárias. Portaria nº 126.Seção 1. P. 17694 -17698.

OLIVEIRA, SÉRGIO J. Microbiologia veterinária: guia bacteriológico prático. **Canoas: ULBRA**, v. 2, 2000.

Propeth E.B., Mills E., Arrington S. **Laboratory methods in histotechnology**, Armed Forces Institute of Pathology. Washington, DC. 247 – 55, 1992.

RIVA, Eder et al. Infecção por *Streptococcus suis*: uma revisão. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 11, n. 2, 2008>. Acesso em 21 de out. 2021

SAIKI, R.K.; GELFAND, D.H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S.J., HIGUCHI, R.; HORN, G.T.; MULLIS, K.B., ERLICH, H.A.Primer - direct enzymatic amplification of de DNA with thermostable DNA polymerase. **Science**, v. 239, n. 4839, p. 487-491, 1988.

SCHUBERT, MARISTELA ANTUNES RAMOS. Isolamento de *Salmonella* spp. de amostras fecais de aves silvestres mantidas em cativeiro. **Trabalho de conclusão de curso em Medicina Veterinária. São Paulo**, 2008.

SILVA, de Neusely; et al. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água**, 5ª ed. São Paulo: Blucher, 2017. P. 108.

TRABULSI, L. R. et al. **Microbiologia**. 5. Ed. Atheneu: Rio de Janeiro, 2008. P. 232.