

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**Relatório final do estágio curricular obrigatório em Prática Veterinária,
realizado junto ao Centro Avançado De Pesquisa e Desenvolvimento em
Sanidade Avícola (CEAV), Empresa Cobb-Vantress LTDA e Mercolab
Laboratórios LTDA**

Assunto de Interesse: Enterite Necrótica das Aves

Isis Mari Miyashiro Kolososki

JABOTICABAL - SP

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

Relatório final do estágio curricular obrigatório em Prática Veterinária, realizado junto ao Centro Avançado De Pesquisa e Desenvolvimento em Sanidade Avícola (CEAV), Empresa Cobb-Vantress LTDA e Mercolab Laboratórios LTDA

Assunto de Interesse: Enterite Necrótica das Aves

Isis Mari Miyashiro Kolososki

Orientador: Prof. Dr. Angelo Berchieri Junior

Relatório do Estágio Curricular em Prática Veterinária apresentado à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Câmpus de Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Unesp, para graduação em Medicina Veterinária.

JABOTICABAL - SP

1º SEMESTRE/2024

K81r	Kolososki, Isis Mari Miyashiro Relatório final do estágio curricular obrigatório em Prática Veterinária, realizado junto ao Centro Avançado De Pesquisa e Desenvolvimento em Sanidade Avícola (CEAV), Empresa Cobb-Vantress LTDA e Mercolab Laboratórios LTDA : Assunto de Interesse: Enterite Necrótica das Aves / Isis Mari Miyashiro Kolososki. -- Jaboticabal, 2024 67 p. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal Orientador: Angelo Berchieri Junior 1. Medicina Veterinária. 2. Aves. 3. Clostridium perfringens. I. Título.
------	---

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CÂMPUS DE JABOTICABAL



CERTIFICADO

Certifico que o Relatório de Estágio Curricular em Prática Veterinária foi apresentado à Banca Examinadora e aprovado, conforme especificações abaixo

TÍTULO: Relatório final do estágio curricular obrigatório em Prática Veterinária, realizado junto ao Centro Avançado de Pesquisa e Desenvolvimento em Sanidade Avícola (CEAV), Empresa Cobb-Vantress LTDA e Mercolab Laboratórios LTDA
Assunto de Interesse: Enterite Necrótica das Aves

ACADÊMICA: Isis Mari Miyashiro Kolososki

CURSO: Medicina Veterinária

ORIENTADOR: Angelo Berchieri Junior

SUPERVISORES: Lais Rizotto, Leonildo Turra Neto e Rafaela Berto

LOCAIS: Centro Avançado De Pesquisa e Desenvolvimento em Sanidade Avícola (CEAV) - Descalvado (SP), Empresa Cobb-Vantress LTDA - Água Clara (MS) e Mercolab Laboratórios LTDA - Cascavel (PR)

(PERÍODO) Semestre: 2º Ano: 2023

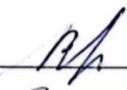
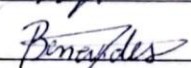
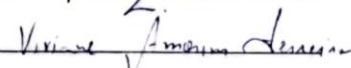
Jaboticabal, 06 de fevereiro de 2024

BANCA EXAMINADORA

Presidente Angelo Berchieri Junior

Membro Valdinete Pereira Benevides

Membro Viviane Amorim Ferreira



Prof. Dra. Paola Castro Moraes

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, à Deus, que em sua infinita sabedoria abriu e fechou as portas necessárias para conclusão dessa etapa do meu desenvolvimento profissional.

Aos meus pais, Evandro, Noemi e Luciano, por todo apoio, carinho e confiança que depositaram em mim no decorrer desses anos de graduação e, acima de tudo, por me oferecerem condições necessárias para realizar meus sonhos.

À minha irmã e melhor amiga, Lara, por me manter firme e alegrar meus dias nos momentos difíceis, além de me acompanhar nos momentos de alegria durante toda minha vida.

Ao meu parceiro, André, pelo apoio e por despertar o melhor de mim em todos os momentos.

Ao professor Angelo Berchieri Junior, meu orientador, pela confiança, paciência e pelos conhecimentos transmitidos no decorrer dessa etapa.

Aos membros da banca, Valdinete e Viviane, pelas importantes considerações para melhoria do meu trabalho de conclusão de curso.

Às empresas, Centro Avançado de Pesquisa e Desenvolvimento em Sanidade Avícola (CEAV), Mercolab Laboratórios LTDA e Cobb-Vantress LTDA, pela experiência compartilhada e recepção durante o período de estágio. Em especial a Dra. Ana Maria Iba Kanashiro e a Dra. Lais Rizotto, pelos conselhos e carinho.

À República As Bardosa, minha segunda família e meu lar durante a graduação, que me permitiu amadurecer e vivenciar experiências que levarei para vida toda.

Às minhas amigas, Victória, Giovanna e Vitória, por todo incentivo e companhia ao longo da graduação, que nossa amizade perdure na nova etapa que se iniciará.

ÍNDICE

I-RELATÓRIO DE ESTÁGIO.....	1
1.INTRODUÇÃO	1
2.CEAV - CENTRO AVANÇADO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO EM SANIDADE AVÍCOLA	1
2.1.Descrição da Empresa.....	1
3.MERCOLAB LABORATÓRIOS LTDA.....	4
3.1.Descrição da Empresa.....	4
4. Granja nº06 da Cobb-Vantress LTDA	7
4.1. Descrição da Empresa.....	7
5.DESCRICÃO DAS ATIVIDADES DO ESTÁGIO	9
5.1. Padronização de Procedimentos Laboratoriais Segundo o Plano Nacional de Sanidade Avícola (PNSA).....	9
5.2. Atividades desenvolvidas no CEAV	9
5.3.Atividades desenvolvidas no Mercolab Laboratórios LTDA	20
5.4.Atividades Desenvolvidas na Granja nº06 da Cobb-Vantress LTDA	26
6.Discussão das Atividades	35
7.Conclusão	35
8.Referências	36
II.Assunto de Interesse: Enterite Necrótica das Aves.....	40
1.Introdução	40
2.Agente Etiológico	41
3.Fatores de Virulência	41
3.1.Toxina <i>Alfa</i>	42
3.2.Toxina <i>Beta</i>	43
3.3.Toxina <i>Épsilon</i>	43
3.4.Toxina <i>Iota</i>	43
3.5.Toxina CpE	43
3.6.Toxina Net-B	43
4.Epidemiologia e Fatores Predisponentes.....	44
4.1.Formulação de dieta	44
4.2.Fatores imunossupressores.....	45
4.3.Manejo da cama dos aviários	45
4.4.Coccidiose	46
5.Patogênese	46

5.1. Forma clínica	46
5.2. Forma subclínica.....	47
5.3. Lesões microscópicas.....	48
6. Diagnóstico	48
7. Diagnóstico diferencial	49
8. Prevenção e Controle de <i>C. perfringens</i> em Aves	49
9. Discussão	50
10. Conclusão	52
11. Referências	52

I-RELATÓRIO DE ESTÁGIO

1.INTRODUÇÃO

O estágio curricular obrigatório foi realizado no período de 14 de agosto a 22 de dezembro de 2023, totalizando 602 horas, como parte dos requisitos para a conclusão do curso de Medicina Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (Unesp/FCAV). O trabalho foi realizado sob orientação do Prof. Dr. Angelo Berchieri Junior, em três empresas do ramo avícola, voltadas à experimentação, diagnóstico e produção de material genético, respectivamente. As atividades foram desenvolvidas no CEAV-Centro Avançado de Pesquisa e Desenvolvimento em Sanidade Avícola, em Descalvado-SP, sob supervisão da Dr^a. Laís Rizotto; no Mercolab Laboratórios LTDA, situado em Cascavel-PR, sob a supervisão da Me. Rafaela Berto e na Granja nº06 da empresa Cobb Vantress LTDA, alocada em Água Clara-MS, sob supervisão do M.V. Leonildo Turra Neto. → EXPERIMENTAÇÃO, DIAGNÓSTICO DO RAMO AVÍCOLA

2.CEAV - CENTRO AVANÇADO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO EM SANIDADE AVÍCOLA

2.1.Descrição da Empresa

O CEAV, laboratório mantido pelo Instituto Biológico, da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (IB-APTA), está localizado na Rua Bezzerra Paes nº2278, na cidade de Descalvado-SP. A instituição atua no desenvolvimento de pesquisas científicas e é credenciada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para realizar exames de monitoramento de doenças contempladas no Plano Nacional de Sanidade Avícola (PNSA), segundo a NBR ISO/IEC 17025:2017. Além dessas atribuições, o laboratório é acreditado pelo Inmetro, em conformidade com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), para realização de análises microbiológicas de alimentos (ABNT, 2006).

A atividade científica do CEAV direciona-se à realização de estudos nas áreas de sanidade avícola e qualidade microbiológica de alimentos, como a pesquisa de patógenos em carnes de frango (TESSARI et al., 2003) e ovos comerciais (CARDOSO et al., 2001).

2.1.1.Instalações

O CEAV possui quatro setores voltados à realização de ensaios laboratoriais (microbiologia de alimentos, sorologia, microbiologia de amostras de aves e biologia molecular) e dois setores de apoio (preparo de meios de cultura e descontaminação de materiais). Todos contêm uma antessala para paramentação e desparamentação dos colaboradores.

2.1.1.1.Setor de preparo de meios de cultura

A pesagem de componentes e elaboração de meios de cultura ocorrem em uma sala equipada com duas estufas de secagem (operando em temperatura de 36°C), dois deionizadores de água, uma balança de precisão e dois fluxos laminares com luz ultravioleta (UV). Além desse ambiente, o setor apresenta uma área destinada à esterilização de materiais utilizados na rotina laboratorial e de meios de cultura, que conta com duas autoclaves.

2.1.1.2.Setor de microbiologia de alimentos

A infraestrutura projetada para execução de ensaios microbiológicos de alimentos é composta por três fluxos laminares com luz ultravioleta (UV), duas estufas microbiológicas (operando em temperatura de 36°C), um termociclador, uma mesa agitadora e um refrigerador (operando em um intervalo de temperatura de 2 e 5°C) nesse último equipamento, realiza-se a preservação de estirpes cultivadas para validar os ensaios microbiológicos (controles positivos), como *Candida albicans*, *Salmonella enterica* sorovar Mbandaka, *Escherichia coli* e *Clostridium perfringens* (*C. perfringens*). Em complemento, o setor possui uma sala anexa equipada com balança de precisão, destinada à pesagem de amostras.

2.1.1.3.Setor de sorologia

As análises sorológicas são conduzidas em um ambiente subdivido em duas salas. Na primeira, estão instaladas uma lavadora e uma leitora de microplacas, equipamentos destinados à execução e análise dos resultados de ensaio imunoenzimático (ELISA). A segunda sala, especializada na realização da prova de imunodifusão dupla em gel de agarose (IDGA), está equipada com uma bomba de vácuo e uma bancada com luz branca para a interpretação dos resultados.

2.1.1.4.Setor de microbiologia de amostras de aves

Neste setor, há um laboratório no qual ocorre a investigação e o isolamento de bactérias patogênicas, em especial do gênero *Salmonella*, a partir de material biológico avícola. No laboratório, encontram-se dois fluxos laminares providos de luz ultravioleta (UV), duas estufas microbiológicas (operando em temperaturas de 36°C e 42°C) e um refrigerador (operando no intervalo de temperatura entre 2°C e 5°C), destinado à preservação de amostras. Adicionalmente, o setor possui uma sala de apoio destinada à colheita de amostras de órgãos e exame necroscópico em aves.

2.1.1.5.Setor de biologia molecular

O setor de biologia molecular é composto por quatro salas isoladas. Na primeira, denominada “Sala de Preparo do *mix*”, procede-se à mensuração e armazenamento dos reagentes para realização de ensaios moleculares, a qual é equipada com um fluxo laminar com luz ultravioleta (UV) e um refrigerador (operando no intervalo de temperatura entre 2°C e 5°C).

A segunda sala é dedicada à extração de material genético e contém um refrigerador (operando no intervalo de temperatura entre 2°C e 5°C) para o armazenamento de amostras que serão analisadas, dois fluxos laminares com luz ultravioleta (UV), uma centrífuga e um extrator semi-automatizado de material genético.

A terceira sala, onde ocorrem ensaios moleculares, é equipada com um *freezer* (operando em temperatura de -20°C) para o armazenamento de amostras já analisadas, um fluxo laminar com luz ultravioleta (UV), uma centrífuga e dois termocicladores. A quarta sala é para a realização de eletroforese em gel de agarose e dispõe de um fotodocumentador e dois computadores para análise de resultados.

2.1.2.6.Setor de descontaminação de materiais

O descarte e a descontaminação de resíduos laboratoriais ocorrem em um espaço com duas autoclaves destinadas à esterilização de vidrarias. Nesse ambiente, armazenam-se ponteiros, objetos perfurocortantes e resíduos químicos em recipientes específicos até o momento de descarte. Ademais, o setor possui uma sala adjacente, equipada com dois *ultra-freezers* (operando em temperatura de -80°C), onde são mantidas as contraprovas (soros e amostras de colheita de órgãos) por até 60 dias até o descarte.

3.MERCOLAB LABORATÓRIOS LTDA

3.1.Descrição da Empresa

O Mercolab Laboratórios LTDA dispõe de duas unidades, a primeira na cidade de Cascavel – PR e a segunda situada em Chapecó – SC. A unidade em que ocorreu o estágio curricular está localizada na Rua Maringá nº2.388, em Cascavel - PR. A empresa foi fundada em 2002 e oferece serviços veterinários nas áreas de microbiologia de alimentos, bromatologia, análise de água e sanidade animal. O escopo de análises inclui exames para aves, bovinos, equinos, suínos e peixes.

A instituição é credenciada pelo MAPA para realizar análises oficiais de monitoramento para *Salmonella* spp. e *Mycoplasma* spp. em aves domésticas, conforme o PNSA.

3.1.1. Instalações

As instalações da empresa dividem-se em cinco setores destinados à execução de ensaios laboratoriais (sorologia, biologia molecular, microbiologia, setor de histopatologia e análise de micotoxinas em alimentos) e dois setores de apoio (preparo de meios de cultura e desinfecção de materiais). Todos contêm uma antessala para paramentação e desparamentação dos colaboradores.

3.1.1.1.Setor de preparo de meios de cultura

O setor voltado à esterilização de materiais e preparo de meios de cultura está organizado em três salas distintas. A primeira sala destina-se à elaboração de meios de cultura, a segunda à esterilização de materiais e a terceira ao armazenamento de meios de cultura. Esse ambiente contém uma sala equipada com quatro autoclaves, outra com duas balanças de precisão, dois fluxos laminares com luz ultravioleta (UV) e uma câmara fria (operando em temperatura de 4°C). A infraestrutura dispõe de um elevador para simplificar a entrega de materiais aos laboratórios microbiológicos.

3.1.1.2.Setor de sorologia

O ambiente destinado à execução de testes sorológicos conta com uma lavadora e uma leitora de placas de ELISA, uma bomba a vácuo e uma bancada de mármore com luz branca para interpretação dos resultados de soroaglutinação rápida em placa (SAR) e imunodifusão dupla em gel de agarose (IDGA). Os

reagentes (*kits* de ELISA, antígenos e antissoros comerciais) utilizados na rotina do setor ficam armazenados em dois refrigeradores industriais (operando no 1º intervalo de temperatura entre 2°C e 5°C).

3.1.1.3. Setor de biologia molecular

O setor de biologia molecular divide-se em três áreas. A primeira é destinada à extração de ácidos nucleicos e encontra-se equipada com duas máquinas de extração semiautomatizada de material genético. A segunda área, destina-se à realização de ensaios moleculares, possui dois termocicladores e um fluxo laminar com luz ultravioleta (UV). A terceira sala, denominada sala de preparo do *mix*, possui quatro refrigeradores industriais para o armazenamento de insumos (operando no intervalo de temperatura entre 2°C e 5°C) e um fluxo laminar com luz ultravioleta (UV).

3.1.1.4. Setor de histopatologia

O setor de histopatologia está equipado com uma capela de exaustão de gases. Equipamento empregado para evitar a exposição direta do operador a substâncias tóxicas e voláteis. O ambiente possui um processador semiautomático de tecidos (Figura 1) e um micrótomo manual.



Figura 1. Processador semiautomático de tecidos. **Fonte:** Arquivo Mercolab Laboratórios LTDA, 2023.

3.1.1.5. Setor de análise de micotoxinas em alimentos

O setor de análise de micotoxinas em alimentos possui um fluxo laminar com luz ultravioleta (UV), um refrigerador para armazenamento dos reagentes (operando no intervalo de temperatura de 2°C a 5°C), dois trituradores de grãos e um equipamento para leitura de placas de ELISA.

3.1.1.6. Setor de microbiologia de amostras de aves

O setor de microbiologia de amostras de aves concentra suas atividades na pesquisa de *Salmonella* spp., segundo o procedimento preconizado pela Portaria nº 126, de 03 de novembro de 1995, e está dividido em cinco áreas. A primeira destina-se à colheita de amostras e ao exame necroscópico, está equipada com quatro bancadas de mármore que contam com Bicos de Bunsen e uma mesa de metal para recepção de amostras (Figura 2).



Figura 2. Sala de necropsias e colheita de amostras de origem animal. **Fonte:** Arquivo Mercolab Laboratórios LTDA, 2023.

A segunda área, destinada ao pré-enriquecimento de amostras, possui quatro bancadas com bico de Bunsen e dois refrigeradores (operando no intervalo de temperatura entre 2°C e 5°C). A terceira sala centra suas atividades no cultivo seletivo e no plaqueamento de amostras, possui vinte bancadas de mármore equipadas com bicos de Bunsen e dois fluxos laminares equipados com luz ultravioleta (UV). A quarta subdivisão do setor está equipada com quatro estufas microbiológicas (operando em temperaturas de 36°C e 42°C), de uso exclusivo para a incubação de placas de Petri e amostras enriquecidas com caldos. A quinta área,

projetada para a realização do exame bioquímico complementar e a sorotipificação de estirpes do gênero *Salmonella*, dispõe de dois fluxos laminares equipados com luz ultravioleta (UV) e uma bancada de mármore para a manipulação de amostras.

3.1.1.7. Setor de descontaminação de materiais

A esterilização de vidrarias para reutilização e o descarte de resíduos ocorrem em um ambiente equipado com quatro autoclaves.

4. Granja nº06 da Cobb-Vantress LTDA

4.1. Descrição da Empresa

A Cobb-Vantress LTDA é uma empresa multinacional especializada no desenvolvimento, produção e venda de material genético de aves de corte. Conhecida como a primeira empresa de genética avícola, fundada em 1916, com sede na cidade de Siloam Springs, no estado de Arkansas nos Estados Unidos da América (EUA). Atualmente, as principais unidades estão distribuídas nos EUA, Brasil, Nova Zelândia e Reino Unido, que são responsáveis pelo abastecimento de mais de 120 países.

A empresa iniciou suas atividades no Brasil em 1995, com sede na cidade de Guapiaçu-SP. No Brasil, a Cobb-Vantress LTDA possui seis granjas em funcionamento (Granja nº01, em Guapiaçu-SP; Granja nº02, em Palestina-SP; Granja nº 03, em Paulo de Faria-SP; Granja nº04, em Uberlândia-MG; Granja nº05, em Campina Verde-MG e Granja nº06, em Água Clara-MS) e uma em construção (Prata-MG). O estágio foi realizado na granja nº06, localizada na Rodovia Benevenuto Ottoni, nº79.680 em Água Clara-MS.

A empresa objetiva o desenvolvimento de soluções inovadoras e sustentáveis que atendam às necessidades do mercado consumidor sem comprometer a rentabilidade dos produtores.

4.1.1. Instalações

A granja nº06 é constituída por nove núcleos (Figura 3) contendo quatro aviários cada, todos possuem um sistema de pressão negativa para garantir a ambiência e o bem-estar das aves. A granja possui três núcleos de crescimento (A, D e G) com capacidade de alojar 58.000 aves por núcleo e seis núcleos de produção

(B, C, E, F, H e I) com capacidade de alojar 38.700 aves por núcleo, totalizando a lotação máxima da granja em 406.200 aves.



Figura 3. Vista panorâmica da Granja nº06 da Cobb-Vantress LTDA. **Fonte:** Arquivo Cobb-Vantress LTDA, 2023.

Os núcleos são constituídos por uma estrutura que inclui a portaria, uma área que possui sanitários e vestiários internos e externos, área de banho, fumigador de materiais, escritório/refeitório e lavanderia. Nos núcleos de produção encontra-se ainda um depósito de maravalha, fumigador de ovos e sala de ovos.

Os aviários de recria possuem pé direito de 2,3 metros de altura, 130 metros de comprimento por 12 metros de largura, totalizando 1.560 m². No meio do aviário há um depósito de ração com 36 m², permanecendo 1.524 m² disponíveis para as aves. Os galpões contam com sistemas automatizados para distribuição de ração e ambiência das aves (controle de umidade, temperatura, luminosidade e pressão).

Os aviários de produção possuem 145 metros de comprimento por 12 metros de largura, totalizando 1.680 m². Assim como na recria, há um depósito de ração com 60 m², resultando em um espaço disponível para as aves de 1.740 m². O pé direito da estrutura tem de 2,3 a 3,0 metros de altura (dependendo do núcleo). Os aviários são construídos com materiais de fácil higienização (metal e concreto) e cobertos com telhas isotérmicas. O piso de concreto possui uma camada de 8 cm de espessura. Os galpões contam com sistemas automatizados para distribuição de ração das aves, colheita de ovos e ambiência das aves.

Os núcleos possuem uma distância mínima de 300 metros, a distância entre os galpões é de 15 metros na recria e 30 metros na produção. O estabelecimento avícola mais próximo (Incubatório Cobb de Matrizes – ICM) está a 25 km de distância.

5.DESCRICÃO DAS ATIVIDADES DO ESTÁGIO

5.1. Padronização de Procedimentos Laboratoriais Segundo o Plano Nacional de Sanidade Avícola (PNSA)

As atividades acompanhadas no CEAV e no Mercolab Laboratórios LTDA foram realizadas objetivando o monitoramento preventivo de enfermidades contempladas no PNSA do MAPA.

O PNSA monitora *Paramyxovirus* tipo 1 (APMV-1), agente etiológico da Doença de Newcastle; vírus Influenza aviária A (H5N1), agente etiológico da influenza aviária; *Mycoplasma gallisepticum*, agente da doença respiratória crônica; *Mycoplasma synoviae*, agente etiológico da sinovite infecciosa aviária; *Mycoplasma meleagridis*, agente etiológico da sinusite infecciosa em perus; *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar Gallinarum biovar Gallinarum, agente etiológico do tifo aviário; *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar Gallinarum biovar Pullorum, agente etiológico da pulorose; *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar Typhimurium e *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar Enteritidis, causadores de doenças de transmissão hídrica e alimentar (DTHA) em humanos.

A metodologia empregada nos laboratórios credenciados é padronizada para garantir que as condições de análise sejam semelhantes. Os resultados de análises oficiais (direcionadas ao monitoramento pelo MAPA) são sigilosos.

5.2. Atividades desenvolvidas no CEAV

O estágio no CEAV foi realizado de 14 de agosto a 12 de outubro de 2023, com carga horária de 30 horas semanais, totalizando 252 horas de atividades. Neste período, houve o acompanhamento da rotina nos setores de preparo de meios de cultura, sorologia, microbiologia de alimentos, microbiologia de material de origem animal e biologia molecular.

5.2.1. Triagem de amostras para pesquisa de agentes etiológicos contemplados no PNSA

O CEAV avalia a integridade de amostras de origem animal para realização de ensaios laboratoriais. Segundo as especificações do MAPA, as amostras devem ser conservadas em temperaturas entre 2°C e 8°C, por no máximo 96h.

Durante o estágio, o laboratório recebeu amostras de soro sanguíneo de aves comerciais, ovos bicados de pintos de um dia de vida, suabes de traqueia e amostras de órgãos (fragmentos de traqueia e ceco). Um certificado indicando a data, horário e local de colheita é enviado juntamente com a amostra. Após a verificação dos dados, realiza-se a aferição da temperatura de preservação do conteúdo destinado aos ensaios laboratoriais.

5.2.2.Preparo de meios de cultura

O CEAV realiza o preparo de meios de cultura para utilização no próprio laboratório. Os meios de cultura são sintéticos, sendo necessária a realização dos procedimentos de dissolução e esterilização.

A pesagem dos componentes ocorre em balança de precisão e o volume de água deionizada é mensurado com auxílio de uma proveta volumétrica com capacidade de 1L. A esterilização dos meios de cultura ocorre em autoclaves, segundo as especificações do fabricante.

Durante o estágio, foram preparados caldos nutrientes como água peptonada tamponada (APT) e caldo *Brain Heart Infusion* (BHI), também foram desenvolvidos meios para a diluição de amostras, como a *Phosphate-Buffered Saline* (PBS). Para a contagem microbiológica, foram preparados os ágaros Sabouraud, dicloran com rosa bengala e cloranfenicol (DRBC), *plate count agar* (PCA) e Shahadi-Ferguson Perfringens (SPF). Ademais, foram elaborados caldos de enriquecimento, como tetrationato e Rappaport-Vassiliadis, e ágaros seletivos, incluindo MacConkey (MAC) e Desoxicolato-lisina-xilose (XLD), para a pesquisa de *Salmonella* spp.

5.2.3.Processamento de amostras de alimento para contagem microbiológica

O CEAV realiza a diluição seriada de amostras para estimar a concentração de microrganismos presentes em uma amostra desconhecida. O procedimento inicia-se com a pesagem de 25g de alimento em balança de precisão, seguida pela diluição da amostra em 225mL de PBS e homogeneização em mesa agitadora por dez minutos. Em seguida, transfere-se 1mL da amostra diluída, para um tubo de

ensaio contendo 9mL de PBS, sucessivamente, obtendo-se as diluições de 10^{-1} e 10^{-2} da amostra inicial para realização das contagens microbiológicas.

No decorrer do estágio, processaram-se amostras de alimentos para consumo humano (ovos comerciais e confeitos para doces), ração para *pets*, farinha de vísceras e farelo de soja.

5.2.4. Contagem de *Escherichia coli*

Mesófilos são microrganismos que apresentam multiplicação em temperaturas entre 20°C e 45°C (ANVISA, 2020). O grupo inclui enterobactérias, como *Klebsiella* spp., *Citrobacter* spp. e *Escherichia coli* (*E. coli*), coliformes totais constituem uma subdivisão do grupo de mesófilos, podendo ter origem fecal ou não. Entre esses microrganismos, a espécie *E. coli* destaca-se como o melhor indicador de contaminação fecal em produtos de origem animal, conforme estabelecido pela Instrução Normativa nº60, publicada em 23 de dezembro de 2019 (IN 60/2019).

Acompanhou-se o procedimento de pesquisa de *E. coli* para contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/mL), no qual 1mL de cada diluição decimal da amostra (10^{-1} e 10^{-2}) foi adicionada em placas de Petri e coberto com 20mL do meio ágar PCA fundido e resfriado a 56°C. Após a solidificação do ágar, as amostras foram incubadas a temperatura de 36°C/24h. Essa metodologia resulta no desenvolvimento de colônias em suspensão no meio de cultura, facilitando a visualização de colônias (TECKEMEYER et al., 2023).

Dessa forma, o número de colônias vegetadas (UFC/mL) foi enumerado após o período de incubação e multiplicado pelo título de diluição, resultando no número de bactérias presentes na amostra original.

Na avaliação da integridade do processo, são incluídos controles obrigatórios, sendo um controle positivo, que contém uma estirpe de *E. coli* conhecida e cultivada no próprio laboratório, e um controle negativo, no qual a amostra é substituída por água deionizada e livre de contaminação microbiológica.

5.2.5. Contagem de *Clostridium* sulfitorredutores e pesquisa de *Clostridium perfringens*

Segundo o relatório divulgado pela Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente (SVSA, 2023), o gênero *Clostridium* é um dos principais causadores de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar (DTHA) no Brasil. A espécie

Clostridium perfringens destaca-se por causar uma enterotoxemia, resultando em quadros de enterite necrótica em seres humanos e animais.

Diante dos riscos em saúde única relacionados a essa bactéria, a ANVISA tornou compulsória a pesquisa da presença de *C. perfringens* em todos os alimentos nos quais forem identificados *Clostridium* sulfitorredutores (IN 60/2019). O procedimento segue as orientações técnicas normatizadas pela ISO7937:2004, que descreve um método para enumeração de *C. perfringens*.

Acompanhou-se a pesquisa de estirpes do gênero *Clostridium* para contagem microbiológica. O procedimento foi realizado adicionando 1mL das amostras diluídas (10^{-1} e 10^{-2}) nas placas de Petri, as alíquotas foram cobertas com 20mL do meio ágar SPF fundido e resfriado a 56°C. Para proporcionar condições favoráveis à proliferação de *C. perfringens*, as placas de Petri foram incubadas em condições de anaerobiose, obtidas com o auxílio do kit Anaerobac®-PROBAC, por 36°C/48h. O número de colônias vegetadas foi enumerado após o período de incubação e multiplicado pelo título de diluição, resultando no número de bactérias, em UFC/mL, presentes na amostra original.

Caso observe-se a redução de sulfito a sulfeto de hidrogênio no meio de cultura, acompanhada do desenvolvimento de colônias enegrecidas, procede-se à identificação de *C. perfringens*. Neste processo, com o auxílio de uma pipeta Pasteur, retira-se uma colônia da placa de SPF e deposita-se em um tubo contendo caldo BHI, tampões de vaselina e um tubo de Durham. A produção de gás sulfídrico no tubo de Durham permite classificar o microrganismo como *C. perfringens*.

Na avaliação integridade do processo são incluídos controles obrigatórios, sendo um controle positivo, que contém uma estirpe de *C. perfringens* (conhecida e cultivada no próprio laboratório), e um controle negativo, em que a amostra é substituída por água deionizada e livre de contaminação microbiológica.

5.2.6. Contagem de bolores e leveduras

Bolores e leveduras são organismos saprófitos responsáveis pela deterioração de alimentos e demandam controle rigoroso em produtos destinados ao consumo humano, conforme estipulado pela ANVISA em 2020.

No CEAV, o isolamento de bolores é realizado por meio do cultivo em ágar Sabouraud (ACHARYA & HARE, 2022). Para leveduras, emprega-se o ágar DRBC, utilizados para favorecer a visualização do citoplasma e inibir a proliferação de

fungos filamentosos (PEREIRA et al., 2010). O procedimento de pesquisa de bolores e leveduras foi realizado com a adição de 1mL de cada diluição da amostra inicial (10^{-1} e 10^{-2}) em placas de Petri. O plaqueamento ocorreu vertendo-se 20mL do respectivo meio de cultura fundido e resfriado a 56°C sobre as alíquotas das amostras, as placas foram incubadas a 36°C/120h. O número de colônias vegetadas, em UFC/mL, foi enumerado após o período de incubação e multiplicado pelo título de diluição, resultando no número de bactérias presentes na amostra original.

Na avaliação da integridade do processo foram incluídos controles obrigatórios, sendo um controle positivo de *Candida albicans*, conhecida e cultivada no próprio laboratório, e um controle negativo, em que a amostra é substituída por água deionizada e livre de contaminação microbiológica.

5.2.7. Teste de soroaglutinação rápida em placa (SAR) e soroaglutinação lenta em tubos (SAL) para detecção de anticorpos contra *Mycoplasma* spp. e *Salmonella* spp.

O SAR é um exame de triagem para detecção da resposta imunológica frente a patógenos dos gêneros *Salmonella* e *Mycoplasma*, agentes etiológicos de doenças avícolas de interesse no PNSA. Esse ensaio caracteriza-se por ser direto, qualitativo e alta especificidade, conforme indicado pelo MAPA (2022).

No decorrer do estágio, efetuou-se o procedimento de SAR para triagem de amostras sorológicas, visando verificar a resposta imunológica de aves contra patógenos contemplados no PNSA. Foram pesquisados anticorpos contra *S. Pullorum*, *Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma synoviae*.

O antígeno (SAR Pul Rápido®, SAR MG® ou SAR MS® da Inata) é homogeneizado para prevenir a precipitação durante a execução do ensaio. Em seguida, depositam-se 30µL do soro animal e do antígeno utilizado no exame em uma placa de vidro demarcada. Para uma visualização precisa do resultado, agita-se a placa por 2 minutos, realizando movimentos circulares. A ocorrência de aglutinação (grumos) deve ser observada com o auxílio de uma fonte luminosa branca, em fundo branco, conforme especificado pelo MAPA (2022). Assegurando-se a integridade do teste são incluídos um soro controle positivo e um soro controle negativo. Em caso de resultado positivo, o exame é repetido em triplicata.

Resultados positivos no teste de SAR, tanto de *Mycoplasma* spp. quanto de *Salmonella* spp., devem ser confirmados com outra técnica. Durante o período de estágio acompanhou-se a metodologia empregada no CEAV, o teste de SAL. Antes da realização do teste, o antígeno (SAR Pul Lento® da Inata) e as amostras são mantidos a temperatura ambiente (23°C a 27°C) por 30 minutos. A técnica ocorre com a adição de 40µL do soro positivo no SAR e de 1mL do antígeno em um tubo de ensaio estéril (com capacidade de 10mL). O frasco é vedado com parafilme e incubado a 36°C/24h. Os resultados positivos são indicados pela formação de grânulos quando observados na luz direta, em fundo escuro e devem ser confirmados no Laboratório Federal de Defesa Agropecuária (LFDA), situado em Campinas-SP.

5.2.8. Ensaio imunoenzimático (ELISA)

O ELISA é um exame imunológico fundamentado na mensuração da atividade enzimática resultante da interação entre antígeno e anticorpo. A reação deve-se à modificação que o complexo enzimático provoca em um substrato, geralmente manifestada por uma alteração na coloração da reação. Essa técnica é caracterizada por sua alta especificidade e sensibilidade, sendo utilizada para monitorar a exposição de aves a patógenos e mensurar a resposta imune vacinal. Durante o estágio, acompanhou-se a determinação quantitativa de anticorpos contra o vírus influenza aviária A e o *Paramyxovirus* tipo 1 (APMV-1), *M. gallisepticum* e *M. synoviae* por meio da técnica de ELISA Indireto.

Os antígenos empregados no método ELISA são impregnados em microplacas de poliestireno com 96 cavidades. Após a deposição dos soros sanguíneos, o material das placas seletivamente adsorve o anticorpo e as substâncias não relacionadas ao complexo formado são removidas pelo procedimento de lavagem (AYDIN, 2015). O complexo antígeno-anticorpo, retido nas microplacas, interage com a antiglobulina quimicamente conjugada à enzima. Essa antiglobulina se liga ao anticorpo e ao entrar em contato com um substrato específico resulta na mudança de cor. Essa mudança pode ser quantificada por meio de análise de densidade óptica em espectrofotômetro, (TIZARD et al., 2017) ou expressão de um produto detectável, como marcadores de fluorescentes (ZHAO et al., 2022), no CEAV, acompanhou-se a mensuração através de densidade óptica.

Os *kits* fornecem amostras contendo diferentes concentrações de anticorpos, as quais são empregadas para estabelecer uma curva padrão. Ao comparar a densidade óptica dos soros testados com essa curva, é possível determinar a titulação de anticorpos, adicionalmente, nos *kits* são incluídos controles positivos e negativos para garantir a integridade dos ensaios. Os resultados positivos obtidos de amostras oficiais são confirmados no Laboratório Federal de Defesa Agropecuária (LFDA), situado em Campinas-SP.

5.2.9. Pesquisa de anticorpos contra os agentes etiológicos da influenza aviária e laringotraqueíte infecciosa das aves por imunodifusão dupla em gel-ágar (IDGA)

A técnica de imunodifusão dupla em gel-ágar (IDGA) avalia a presença de anticorpos antivirais, sendo possível observar linhas (resultados negativos) ou arcos (resultados positivos) de precipitação decorrentes da difusão gradual do antígeno e do anticorpo no meio de cultura em ágar. A técnica pode ser empregada para avaliar a resposta imunológica do organismo. No entanto, a baixa sensibilidade inviabiliza a detecção de baixas concentrações de anticorpos.

Durante o estágio, realizou-se o preparo das placas para a técnica de IDGA. Nesse procedimento o meio ágar tipo II purificado (pH=7) foi cortado para criar seis orifícios periféricos e um central, formando uma figura denominada roseta. O excedente do material foi eliminado com uma bomba a vácuo.

Antes de iniciar a prova de IDGA, os soros foram aquecidos por 30 minutos a 56°C em banho-maria. Em seguida, distribuíram-se 50µL de cada amostra em posições alternadas na periferia do hexágono. Nos demais poços, adicionaram-se os anticorpos comerciais, enquanto no centro do hexágono é colocado o antígeno. As placas são mantidas à temperatura ambiente (23°C a 27°C) em um recipiente plástico com tampa e os resultados são observados em 24h.

Durante o período de estágio, a técnica de IDGA foi empregada para verificação da resposta imunológica de aves comerciais contra o vírus influenza aviária A (H5N1) e *Gallid herpesvirus* tipo 1 (agente etiológico da laringotraqueíte infecciosa das aves). Os resultados foram reportados ao MAPA.

5.2.10. Processamento de amostras para ensaios moleculares

Executou-se o processamento de amostras de conteúdo de cecal, fragmentos de traqueia e suabes de traqueia para ensaios moleculares. O procedimento iniciou-

se com a adição de solução fosfatada tamponada (PBS) na proporção de 1:1 (v:v) nas amostras; esse conteúdo foi homogeneizado em um vórtex durante 30 segundos. Posteriormente, 2mL da amostra diluída foram transferidos para microtubos tipo *Eppendorf* e centrifugados a 3.000 rotações por minuto (RPM) durante 2 minutos. O sobrenadante resultante foi submetido à extração de material genético.

5.2.11.Extração semiautomatizada de material genético de amostras de origem animal

No CEAV, a extração e purificação de ácidos nucleicos ocorre através de nanopartículas magnéticas (MNPs). Durante o período de estágio, acompanhou-se o procedimento de extração semiautomatizada de amostras processadas para realização da RT-PCR e RT-qPCR.

Os reagentes do *kit* de extração foram manipulados na sala de preparo do *mix*, seguindo as orientações do fabricante. O protocolo iniciou-se com a adição de uma solução contendo sais caotrópicos e Proteinase K, que promovem a lise celular. Na etapa seguinte, as MNPs são incorporadas ao conteúdo lisado e ligam-se aos ácidos nucleicos. As nanopartículas magnéticas são imobilizadas por ímãs externos e, em seguida, passam por duas lavagens em solução de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). O material resultante foi submetido a um processo de secagem e eluição, finalizando o procedimento de extração de material genético (MA et al., 2013).

5.2.12.Ensaio moleculares para detecção de agentes contemplados no PNSA

A utilização de técnicas de diagnóstico molecular é amplamente difundida na medicina veterinária, sendo consideradas padrão-ouro para detecção de diversos patógenos devido à alta especificidade. A técnica de Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (RT-PCR) permite a quantificação dos ácidos nucleicos, oferecendo eficiência analítica quando comparada à PCR convencional.

A PCR convencional inicia-se com a separação das fitas de ácido desoxirribonucleico (DNA) molde a 95°C. Em seguida, a 60°C, os iniciadores (*primers*), pareiam-se a um gene específico, indicando a região a ser amplificada. Sucede-se a etapa de extensão, na qual a temperatura do dispositivo é reajustada a 70°C, para permitir a ação da enzima Taq DNA-polimerase, que promove a extensão

da fita de DNA complementar (MACKAY et al., 2004). Essas etapas são repetidas várias vezes, cada repetição representa um ciclo da PCR.

No início da reação, a abundância de reagentes permite uma amplificação exponencial do material genético de interesse. Contudo, no decorrer do procedimento, ocorre diminuição da eficiência de amplificação, devido à redução de componentes disponíveis, atingindo um platô. Na PCR convencional, a visualização dos genes amplificados ocorre por eletroforese em gel de agarose, possibilitando uma análise qualitativa ao final da reação. Enquanto na RT-PCR, a fase de amplificação exponencial é monitorada por meio de marcadores fluorescentes (SyberGreen® e Taqman®), permitindo uma análise quantitativa baseada na correlação entre a velocidade de amplificação e a quantidade de material genético amplificado.

A RT-PCR é utilizada para detectar e quantificar genes de interesse de patógenos com DNA. Para a detecção de agentes etiológicos que possuem o ácido ribonucleico (RNA) como material genético principal, é necessária a combinação da transcrição reversa do RNA para DNA com a técnica de RT-PCR. Essa combinação caracteriza a RT-qPCR (GALLAGHER & WILEY, 2008).

Durante o período de estágio, acompanhou-se a execução da PCR convencional para pesquisa de *Mycoplasma meleagridis*. Ademais, observou-se a RT-PCR para pesquisa do *Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma synoviae* e a RT-qPCR para pesquisa do vírus da influenza aviária A (H5N1) e *Paramyxovirus* tipo 1.

Na instituição, a pesquisa dos agentes virais contemplados no PNSA ocorre por meio da localização do gene M (codificador da matriz proteica), abordagem mais sensível que o isolamento viral convencional (FOUCHIER et al., 2000). O *Paramyxovirus* tipo 1 é identificado pelo gene M, localizado nas posições nucleotídicas de 3884 a 3903 ou 5054 a 5078 do DNA completo, obtido após transcrição reversa (WISE et al., 2004). No vírus da Influenza aviária A (H5N1) o gene M localiza-se nas posições nucleotídicas 26 a 784 ou 740 a 1.007 do DNA completo pós-transcrição reversa e, codifica as proteínas M1 (constituente da matriz viral) e M2 (constituente do envelope viral) (FURUSE et al., 2009).

No CEAV, os reagentes e o material resultante da extração genética são dispostos nas microplacas em fluxo laminar, em seguida, as amostras são

centrifugadas durante dois minutos e inseridas no termociclador, onde ocorre o processo de amplificação do material genético.

Após a análise dos resultados ocorre o diagnóstico, levando em consideração que no Brasil a vacinação empregando-se vivas atenuadas contra a doença de Newcastle é permitida e ocorre circulação de vírus não-patogênico de Influenza Aviária. Portanto, a detecção desses patógenos em ensaios moleculares não indica necessariamente a ocorrência de doenças. A identificação de agentes patogênicos por técnicas moleculares é confirmada no LFDA, situado em Campinas-SP, os resultados são investigados pelo MAPA.

5.2.13.RT-PCR para pesquisa de *Salmonella* spp. em amostras de alimentos

No CEAV, a pesquisa de *Salmonella* spp. em amostras de alimentos ocorre por RT-PCR. Segundo o fabricante, o procedimento deve incluir a realização das etapas de pré-enriquecimento e extração térmica do material genético objetivando-se otimizar os resultados da reação.

O pré-enriquecimento de amostras possibilita a recuperação e a proliferação de bactérias a níveis detectáveis nos ensaios laboratoriais (D'AOUST et al., 2007). Esse procedimento inicia-se com a inoculação de 28,5g da amostra em saco plástico estéril contendo 375mL de água peptonada tamponada, seguido pela incubação a 36°C/24h. Posteriormente, executa-se o enriquecimento de uma alíquota (100µL) da amostra em 500µL BHI, o material é incubado a 36°C/3h.

A extração de material genético é conduzida com o auxílio de proteases e oscilação de temperatura. As amostras pré-enriquecidas são submetidas a uma solução de lise celular a 36°C/20 minutos, visando o rompimento da parede celular. Na etapa seguinte, o conteúdo lisado é transferido para um bloco aquecedor a 95°C/10 minutos para separação dos componentes da matriz celular, esse processo é interrompido com o resfriamento a 5°C/5 minutos. As amostras resultantes são inseridas no termociclador, para amplificação do material genético, descritas no item “5.2.11.” do presente documento.

5.2.14.Colheita de amostras biológicas para ensaios microbiológicos

Realizou-se a colheita de órgãos provenientes de ovos bicados, pintos de um dia de vida de frangos de corte e ovos bicados de perus para pesquisa de *Salmonella* spp., segundo as especificações do MAPA (2022).

O procedimento inicia-se com a desinfecção da região torácica e abdominal, utilizando álcool 70%. Em seguida, realizou-se a secção do epitélio com tesoura cirúrgica estéril para a colheita de fragmentos de fígado, baço e coração. Depois, procede-se à colheita do saco da gema e dos cecos, completando o processo de amostragem. Todas as amostras são dispostas em recipientes estéreis e identificados antes dos ensaios e imediatamente direcionadas ao processamento no setor de microbiologia de amostras de aves.

5.2.15. Pesquisa e isolamento microbiológico de *Salmonella* spp.

Segundo a metodologia proposta pelo MAPA (2022), o procedimento de pesquisa e isolamento microbiano deve abranger as etapas de pré-enriquecimento, enriquecimento, plaqueamento seletivo e sorotipificação no LFDA.

O pré-enriquecimento facilita a recuperação de microrganismos estressados ou em pequenas quantidades na amostra e estabelece condições propícias para técnicas de isolamento subsequentes (JACOBSON et al., 2017). Durante o estágio, realizou-se a etapa de pré-enriquecimento de amostras em de água peptonada tamponada a 1% (APT). O procedimento é realizado na proporção de 1:10 (p:v), ou seja, 2g em material biológico em 20mL de APT, o cultivo foi incubado a 37°C/24h.

O enriquecimento, no qual a multiplicação do microrganismo de interesse é favorecida e proliferação da microbiota acompanhante é inibida através da utilização de meios de cultura elaborados com componentes seletivos (nutrientes e antimicrobianos) (ÁVILA et al., 2012). Acompanhou-se o enriquecimento de amostras para o isolamento de bactérias do gênero *Salmonella*. O procedimento ocorreu, em duplicata, com a adição de 2mL de amostras pré-enriquecidas em tubos de ensaio, contendo 20mL de caldo Rappaport-Vassiliadis e de caldo tetratonato (enriquecido com 0,1mL de iodeto a 10% e 1mL de Novobiocina a 4% imediatamente antes do uso). Esse conteúdo é incubado a 36°C e 42°C por 24h.

Após o enriquecimento as amostras passam pelo plaqueamento seletivo, técnica que permite a multiplicação de colônias isoladas, facilitando o processo subsequente de identificação bacteriana. No procedimento, 10µL dos cultivos enriquecidos são distribuídos em duplicata, com alças plásticas descartáveis, nos meios ágar MAC e XLD, em seguida, as placas são incubadas a temperaturas de 36°C e 42°C/24h.

Em seguida, realizam-se os testes bioquímicos preliminares para caracterização de colônias suspeitas. O teste consiste na inoculação de uma colônia isolada em placa nos meios meio ágar tríplice açúcar ferro (TSI), ágar de lisina ferro (LIA), caldo ureia e meio SIM. Amostras com a caracterização bioquímica compatível com estirpes de *Salmonella* contempladas no PNSA (Quadro 1) são enviadas para o LFDA, situado em Campinas-SP, onde ocorre a identificação.

Quadro 1. Comportamento bioquímico de estirpes de *S. Pullorum*, *S. Gallinarum*, *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis* em meio ágar TSI, ágar LIA, caldo ureia e meio SIM.

Substrato		<i>S. Pullorum</i>	<i>S. Gallinarum</i>	<i>S. Typhimurium</i> e <i>S. Enteritidis</i>
Ágar TSI (24 horas)	Base	Gás + ou -*	Gás -**	Gás -***
	Bisel	Vermelho	Vermelho	Vermelho
	H ₂ S	+ ou -	+	+
Ágar LIA (24 horas)	Base	Púrpura	ÇPúrpura	Púrpura
	Bisel	Púrpura	Púrpura	Púrpura
	H ₂ S	+ ou -	+	+
Caldo Ureia		-	-	-
Meio SIM		-	-	+

+ = Ocorre reação enzimática; - = Não ocorre reação enzimática.

S. Pullorum = *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar *Gallinarum* biovar *Pullorum*; *S. Gallinarum* = *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar *Gallinarum* Biovar *Gallinarum*; *S. Typhimurium* = *Salmonella enterica* sorovar *Typhimurim*; *S. Enteritidis* = *Salmonella enterica* sorovar *Enteritidis*. *Gás + ou - = Ocorre ou não produção gás no meio ** Gás + = Ocorre produção de gás no meio ***Gás - = Não ocorre produção de gás no meio.

Fonte: Manual de Consulta Pública, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), 2022.

5.2.14. Visitas técnicas

Durante o período de estágio, realizou-se visitas técnicas para conhecer as instalações da Granbiagi, em Descalvado-SP e da Globoaves em Itirapina-SP.

5.3. Atividades desenvolvidas no Mercolab Laboratórios LTDA

O estágio no Mercolab Laboratórios LTDA foi realizado de 27 de novembro a 22 de dezembro de 2023, com carga horária de 40 horas semanais, totalizando 160

horas de atividades. Neste período, acompanhou-se a rotina dos setores de preparo de meios de cultura, sorologia, microbiologia de material de origem animal, biologia molecular e análises histopatológicas. O estágio foi direcionado para a realização de ensaios microbiológicos para pesquisa de *Salmonella* spp. em amostras avícolas.

5.3.1.Preparo de meios de cultura utilizados em testes bioquímicos

O Mercolab Laboratórios LTDA prepara os meios de cultura sintéticos para uso na própria instituição. A pesagem dos componentes ocorre em balança de precisão e o volume de água deionizada é mensurado com auxílio de uma proveta volumétrica com capacidade de 1L. A esterilização dos meios de cultura ocorre em autoclaves, segundo as especificações do fabricante.

Durante o período de estágio, preparou-se substratos destinados à realização de testes bioquímicos como os caldos lactose, sacarose, dulcitol, manitol, maltose glicose, arginina desidrolase, ornitina descarboxilase, lisina descarboxilase, fenilalanina desaminase, citrato, malonato e, ágaros LIA e TSI. Os substratos foram depositados em tubos de ensaio com capacidade de 10mL e conservados em câmara fria operando a temperatura de 4°C.

5.3.2.Esterilização de materiais empregados na realização de ensaios microbiológicos

Acompanhou-se a esterilização de alças descartáveis para realização de análises microbiológicas. O procedimento é realizado agrupando-se 120 unidades do instrumento em pacotes de papel de gramatura de 120g/m². Em cada pacote inclui-se um fragmento de aproximadamente 2cm de fita adesiva de autoclave, para verificar se a temperatura de esterilização foi atingida. A esterilização ocorre em autoclave, operando a 121°C, durante 20 minutos.

5.3.3.Processamento de tecidos para análise histopatológica

O exame histopatológico avalia microscopicamente a morfologia celular e identifica lesões teciduais, auxiliando no diagnóstico de enfermidades. No decorrer do estágio, foi prestado auxílio no preparo de lâminas histológicas, em especial no procedimento de inclusão em parafina de fragmentos de baço, fígado, coração, intestino delgado, Bursa de Fabricius e cérebro de aves de produção.

A instituição recebe fragmentos de aproximadamente 2cm da amostra, previamente conservados em solução de formol tamponado a 10% durante 24h.

Esse tecido é desidratado e clarificado através de banhos com concentrações crescentes de solventes, como álcool e xilol.

No Mercolab Laboratórios LTDA, a desidratação e clarificação de tecidos é realizada em um processador de tecidos semiautomático. A amostra é submersa em cada solvente durante 1h, sendo o primeiro deles o álcool, em concentrações crescentes (70%, 90% e 100%), seguido pelo xilol, em concentrações crescentes (70%, 90% e 100%).

A inclusão em parafina permite a realização de cortes finos e uniformes do tecido, facilitando a análise microscópica. Durante o estágio, realizou-se essa técnica adicionando parafina derretida aos fragmentos de tecidos dispostos em um recipiente plástico, com volume de 2cm³. Após a solidificação da parafina, a amostra era mantida a 4°C durante 20 minutos para facilitar o corte.

Em seguida, inicia-se a etapa de microtomia e inserção do fragmento em lâminas de vidro. Os cortes, com espessura padronizada de 1µm, são obtidos com micrótomo manual. Segue-se para etapa de fixação, na qual as lâminas recebem banhos em concentrações decrescentes de solventes, iniciados pela submersão das lâminas em xilol (100%, 90% e 70%) e em álcool (100%, 90% e 70%).

A coloração do tecido é realizada com hematoxilina e eosina, que pigmentam o núcleo celular e o citoplasma, respectivamente. O exame histopatológico não ocorre na unidade de Cascavel-PR, as placas coradas são enviadas a um profissional terceirizado que faz a leitura e interpretação dos resultados na cidade de Chapecó-SC.

5.3.4.Processamento de amostras de sangue

As amostras de sangue destinadas a testes sorológicos chegam no laboratório em tubos do tipo *Eppendorf*, com capacidade de 2mL, sem adição de anticoagulante. O processamento da amostra inicia-se com a centrifugação da amostra de sangue por 3.000 RPM/5min, em seguida, executa-se a colheita do sobrenadante (soro sanguíneo), com o auxílio de micropipetador e o coágulo retraído é descartado.

5.3.5.SAR para detecção de anticorpos contra *Mycoplasma spp.* e *Salmonella spp.*

Os ensaios de SAR são utilizados como exames de triagem para o monitoramento oficial de doenças contempladas no PNSA, segundo as

especificações do MAPA (2022), descritas no item “5.2.7.” do presente documento. Foram pesquisados anticorpos contra *S. Pullorum*, *M. gallisepticum* e *M. synoviae*. Os resultados positivos ao SAR devem ser confirmados por outra técnica, no Mercolab Laboratórios LTDA, utiliza-se o ELISA que fornece a titulação dos anticorpos. Amostras positivas são enviadas ao LFDA, localizado em Campo Grande - MS, para análise.

5.3.6. Ensaio Imunoenzimático (ELISA) para titulação de anticorpos contra doenças de aves comerciais

Acompanhou-se a execução e interpretação de resultados obtidos no ELISA para pesquisa de anticorpos contra o *Gyrovirus* (agente etiológico da anemia infecciosa das aves), *Aviadenovirus* tipo 1 (agente etiológico da adenovirose aviária), *M. gallisepticum* (agente etiológico da doença respiratória crônica), *Paramyxovirus* tipo 1 (agente etiológico da Doença de Newcastle) e *Avibirnavirus* tipo 1 (agente etiológico da doença de Gumboro).

O procedimento ocorre segundo a descrição do item “5.2.8.” deste documento. Os títulos de anticorpos são obtidos por espectrofotometria, sendo que cada *kit* oferece um *software* específico para avaliação da densidade óptica. A interpretação dos resultados requer a análise do título dos anticorpos e anamnese dos animais (histórico vacinal, idade e apresentação de sinais clínicos).

Os resultados positivos a análises oficiais são encaminhados ao LFDA, localizado em Campo Grande-MS.

5.3.7. Colheita de órgãos para pesquisa de bactérias do gênero *Salmonella*

Durante o período de estágio, foi realizada a colheita de órgãos para pesquisa de sorotipos de *Salmonella* de interesse no PNSA. A amostragem era proveniente de ovos embrionados, ovos bicados e pintos de um dia de vida de *Gallus gallus*. O procedimento segue as orientações do MAPA, descritas no item “5.2.12.”

5.3.8. Pesquisa Microbiológica de *Salmonella* spp. em Amostras Biológicas

A pesquisa de *Salmonella* ocorre seguindo as especificações do MAPA, descritas no item “5.2.13.” do presente documento. No Mercolab Laboratórios LTDA, a acadêmica foi supervisionada na execução do pré-enriquecimento de amostras biológicas (órgãos e fezes) APT, acompanhou o procedimento de enriquecimento seletivo em Rappaport- Vassiliadis e tetracionato (enriquecido com 0,1mL de iodeto a

10% e 1mL de Novobiocina a 4% imediatamente antes do uso) e auxiliou no plaqueamento seletivo de amostras em ágar verde brilhante (VB) e Hecktoen.

5.3.9. Análise bioquímica de sorovares de *Salmonella* spp. contemplados no PNSA

A análise de propriedades bioquímicas permite caracterizar e identificar uma cultura bacteriana, em especial a diversidade de atividades enzimáticas. Para estas análises, a cultura bacteriana é cultivada em substratos distintos e a detecção dos produtos de degradação indica a presença da enzima pesquisada (ÁVILA et al., 2012).

Foram tipificados mais de 2.600 sorovares da espécie *Salmonella enterica*, com 80 a 90 deles identificados em seres humanos e animais (ISSENHUTH et al., 2014). O PNSA preconiza o monitoramento de estirpes relevantes no contexto de saúde avícola e saúde humana, tornando compulsório o monitoramento de *S. Gallinarum* (agente do tifo aviário), *S. Pullorum* (agente da pulorose), *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis* (potenciais causadores de DTHA).

No Mercolab Laboratórios LTDA, a caracterização bioquímica de colônias do gênero *Salmonella* ocorre em duas etapas. Na primeira, denominada teste bioquímico preliminar, busca-se identificar características que direcionam a análise para um grupo específico de bactérias. Os substratos utilizados são os ágar TSI e LIA, caldo ureia e meio SIM (resultados descritos no Quadro 1, item “5.2.13.”).

Na segunda etapa, denominada teste bioquímico complementar, o objetivo é confirmar o gênero do microrganismo, proporcionando uma abordagem mais abrangente no processo de identificação bacteriana. A caracterização dos comportamentos bioquímicos das estirpes contempladas no PNSA está descrita no Quadro 2.

Quadro 2. Comportamento bioquímico dos sorovares *S. Pullorum*, *S. Gallinarum*, *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis* no teste bioquímico complementar.

Substrato	<i>S. Pullorum</i>	<i>S. Gallinarum</i>	<i>S. Typhimurium</i> e <i>S. Enteritidis</i>
Caldo Lactose	-	-	-
Caldo Sacarose	-	-	-
Caldo Dulcitol	-	+	+

Caldo Manitol	+	+	+
Caldo Maltose	-	+	+
Caldo Glicose (produção de ácido)	+	+	+
Caldo Glicose (produção de gás)	+/-	-	+
Caldo Arginina desidrolase	+/-	-	+/-
Caldo Ornitina descarboxilase	+	-	+
Caldo Lisina descarboxilase	+	+	+
Ágar Fenilalanina desaminase	-	-	-
Caldo Citrato de Simons	-	-	+
Caldo Malonato	-	-	-

“+” = Ocorre reação enzimática, “-” = Não ocorre reação enzimática.

S. Pullorum = *Salmonella enterica* sorovar Pullorum; S. Gallinarum = *Salmonella enterica* sorovar Gallinarum; S. Typhimurium = *Salmonella enterica* sorovar Typhimurim; S. Enteritidis = *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis.

Fonte: Manual de Consulta Pública, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), 2022.

Durante o período de estágio, realizou-se os exames bioquímicos complementares, o procedimento ocorre com a inoculação do material proveniente de uma colônia suspeita nos caldos (lactose, sacarose, dulcitol, manitol, maltose glicose, arginina desidrolase, ornitina descarboxilase, lisina descarboxilase, fenilalanina desaminase, citrato e malonato). Os resultados compatíveis com a caracterização bioquímica de estirpes de *Salmonella* spp. contempladas no PNSA devem ser confirmados através de RT-PCR pelo LFDA, localizado em Campo Grande- MS.

5.3.10. Processamento de amostras para ensaios biomoleculares

No Mercolab Laboratórios LTDA, o processamento de amostras para ensaios moleculares ocorre com a colheita de suabes estéreis do material destinado à análise. A região contaminada do suabe é inserida em um tubo do tipo *Eppendorf* com 1mL de PBS. O conteúdo é homogeneizado em vórtex por 30 segundos e centrifugado a 3.000 RPM/5min. Durante o estágio, realizou-se o processamento de

amostras de traqueia, *pool* de órgãos (coração, fígado e baço) e cecos para extração genética por *kits* contendo BEADs magnéticas.

5.3.11. Pesquisa de micotoxinas em alimentos

Micotoxinas são substâncias resultantes do metabolismo secundário à proliferação de fungos filamentosos, esses compostos não possuem imunogenicidade e causam um quadro tóxico em seres humanos e animais. As principais micotoxinas podem ser divididas em três grupos, aflatoxinas (produzidas pelo gênero *Aspergillus*), ocratoxinas (produzidas pelo gênero *Penicillium*) e as fusariotoxinas (produzidas pelo gênero *Fusarium*). Durante o período de estágio curricular, acompanhou-se a pesquisa de aflatoxina em amostra de milho por meio de ELISA.

A técnica ELISA é empregada na pesquisa de micotoxinas por sua alta especificidade e sensibilidade, permitindo a detecção de baixas concentrações de micotoxinas. Entretanto, a possibilidade de ocorrência de reação cruzada é elevada nesse método devido à semelhança estrutural das moléculas, por isso, recomenda-se que resultados positivos ao ELISA sejam confirmados por alguma técnica cromatográfica instrumental, como a cromatografia líquida de alta eficiência (MALLMANN & DILKIN, 2020).

No Mercolab Laboratórios LTDA, o procedimento inicia-se com a pesagem e trituração de 25 g dos produtos destinados à análise. Em seguida, a amostra é diluída em 100 mL de metanol (90%) e filtrada em filtro de papel. O ensaio ocorreu segundo as orientações do *kit* AgraQuant® Aflatoxin M1 da Romer Labs.

5.4. Atividades Desenvolvidas na Granja nº06 da Cobb-Vantress LTDA

O estágio na Granja nº06 da empresa Cobb-Vantress LTDA foi realizado de 16 de outubro a 24 de novembro de 2023, com carga horária de 30 horas semanais, totalizando 190 horas. Durante o período de estágio, acompanhou-se o médico veterinário responsável pela gestão de qualidade e sanidade de uma granja de avós. As atividades realizadas foram direcionadas à gestão de qualidade.

5.4.1. Procedimento diário de biossegurança

Os colaboradores que possuem contato direto com as aves podem disseminar patógenos nos aviários. Por isso, diretrizes que proíbem o contato com

outras granjas, incubatórios ou criações de aves por pelo menos 72 h antes da entrada nos núcleos são adotadas pela maioria das empresas do ramo avícola.

Para diminuir a transmissão indireta de patógenos, os colaboradores da empresa tomam banhos supervisionados na portaria da unidade e antes de adentrar cada setor. Na unidade, os colaboradores utilizam uniformes e calçados desinfetados diariamente. Além disso, a utilização de equipamentos de proteção individual (máscara e óculos de proteção) é obrigatória nos galpões, objetivando a segurança das aves e dos colaboradores responsáveis pelo manejo. Na entrada de cada galpão há um pedilúvio com uma solução de desinfetante à base de amônia quaternária e glutaraldeído a 0,2ml/L.

Diariamente, os colaboradores devem preencher um formulário indicando a data, o local e o número do lote da última granja visitada. Os visitantes ou colaboradores respondem o mesmo questionário e assinam um documento atestando que não tiveram contato com aves de vida livre no período de 72 h que precedeu a visita à Granja nº06.

A utilização de produtos químicos com propriedades desinfetantes deve ser documentada, indicando-se a origem do produto, o lote e a data de vencimento. É responsabilidade do veterinário sanitaria conferir esses dados mensalmente, pois são passíveis de auditoria pelo MAPA.

Durante o período de estágio, acompanhou-se a verificação da documentação referente ao fluxo de pessoas e os registros de utilização de produtos químicos na unidade e em cada um dos nove núcleos da granja.

5.4.2. Controle de insetos

Insetos são vetores mecânicos de diversos patógenos, podendo facilitar a transmissão indireta de enfermidades para aves comerciais. Na avicultura, os insetos de maior importância sanitária são o *Alphitobius diaperinus* e a *Musca domestica*.

Alphitobius diaperinus, popularmente conhecido como cascudinho, desenvolve-se principalmente nas camas dos aviários. Esse inseto é ingerido em grandes quantidades pelas aves comerciais, o que gera desuniformidade no lote e a transmissão indireta de patógenos como *Salmonella* spp., *Eimeria* spp. e *Aspergillus* spp.

O controle populacional de *Alphitobius diaperinus* é realizado com a pulverização de inseticidas piretróides que agem no sistema nervoso central dos insetos, causando paralisia e mortalidade imediata (SANTOS et al., 2008). Semanalmente, piretróides são pulverizados no perímetro externo dos aviários.

Musca domestica, também possui um papel importante na propagação de doenças entre aves, aumentando o risco de disseminação de patógenos causadores de enfermidades como salmoneloses, colibacilose e coccidiose. A infestação desse inseto revela problemas de higiene e no manejo sanitário das granjas. O controle populacional de *Musca domestica* ocorre principalmente com a utilização de armadilhas ecológicas com feromônios sexuais sintéticos que atraem as fêmeas da espécie. Além disso, a adoção de medidas preventivas como o descarte correto de animais mortos e de ovos trincados é essencial no controle desse inseto.

A utilização de agentes químicos para o controle de insetos deve ser registrada, indicando-se o lote e a data de validade do produto. O registro deve incluir o responsável pela pulverização, a concentração e a data de aplicação do produto.

Na empresa em que se realizou o estágio, a supervisão desses registros é de responsabilidade do médico veterinário sanitarista. Acompanhou-se a verificação mensal da documentação do uso de agentes químicos para o controle de insetos dos nove núcleos da Granja nº06.

5.4.3. Controle de roedores

Os roedores podem atuar como reservatórios biológicos de patógenos do gênero *Salmonella* e *Campylobacter* (DOMANSKA-BLICHARZ et al., 2023). O controle desse animal baseia-se na utilização de barreiras físicas e armadilhas químicas. Ao redor dos aviários, são distribuídas sete iscas rodenticidas do tipo bloco parafinado e pó de contato. Os pontos de controle de roedores internos e externos nos núcleos são identificados seguindo a IN 56/2007. Além do controle físico e químico, deve-se evitar a disponibilidade de alimento e abrigo para esses animais dentro dos núcleos.

A utilização de agentes químicos para o controle de roedores deve ser registrada, indicando-se o lote e a data de validade do produto. O registro deve incluir o responsável pela instalação de armadilhas químicas.

Durante o período de estágio, acompanhou-se a verificação mensal da documentação do uso de agentes químicos para o controle de roedores dos nove núcleos da Granja nº06.

5.4.4. Auditoria interna de biossegurança

As auditorias internas são realizadas mensalmente pelo médico veterinário, havendo avaliação de todos os setores dentro da granja, seguindo a sequência de idade dos lotes. Durante o procedimento, 66 pontos de cada aviário são avaliados, dando ênfase na análise da estrutura dos galpões visando detectar falhas de vedação. Verifica-se a presença de ninhos de aves de vida livre, insetos e roedores.

Durante o período de estágio, acompanhou-se auditorias internas em três setores de produção (setor F, H e I) e dois setores de recria (D e G). Ao final da auditoria, os pontos que requerem melhoria são comunicados aos gerentes de produção para elaboração de um plano de ação para correção da irregularidade.

5.4.5. Manejo de vazio sanitário

O vazio sanitário compreende o intervalo de 30 dias em que as instalações de produção avícola permanecem sem aves. O manejo adotado nesta etapa é essencial para manter a biossegurança nas operações avícolas. Durante esse período, os procedimentos de desinfecção reduzem a comunidade de microrganismos ambientais, evitando a transmissão de doenças entre lotes sucessivos. No período de estágio, acompanhou-se o procedimento de limpeza e desinfecção do setor G, de recria.

Após a retirada completa das aves e da cama, inicia-se a desmontagem e desinfecção de todos os equipamentos com solução viricida e bactericida (desinfetante a base de amônia quaternária e glutaraldeído). A limpeza e desinfecção estende-se para as calçadas, muretas, alambrado, pátio e áreas de apoio do núcleo. Em seguida, adiciona-se maravalha nos boxes em que as aves serão alojadas. O maquinário é remontado e recebe a manutenção necessária.

O procedimento é finalizado com a colheita de suabes ambientais de 90 pontos ao longo de cada galpão, esse material é enviado para pesquisa de *Salmonella* spp. O ambiente livre de *Salmonella* spp. é considerado pronto para recepcionar o novo lote. Caso o ambiente esteja contaminado ocorre um novo protocolo de desinfecção.

5.4.6. Manejo de alojamento de aves no setor de recria

As aves alojadas nos núcleos de recria são provenientes do Incubatório Cobb de Avós (ICA). Na semana que precede a chegada das aves, realiza-se a preparação do aviário para garantir condições adequadas nos primeiros dias de vida. Inicia-se o manejo de alojamento com a subdivisão dos boxes onde as aves serão alojadas. A delimitação de cada divisória é feita com papelão. Essa configuração mantém-se durante a primeira semana de vida dos animais e objetiva evitar a mortalidade por amontoamento, além de facilitar o acesso à água e alimento.

Na chegada das aves, realiza-se uma amostragem de peso de 240 animais de cada galpão, nesse momento são observados sinais de desidratação cutânea, integridade do umbigo e debicagem. No primeiro dia de alojamento, administra-se o probiótico FloraMax® via água de bebida, para melhorar a qualidade intestinal dos pintos. Durante os primeiros três dias, a água é oferecida em bebedouros do tipo *nipples* e *mini drinks*. A ração é disponibilizada em comedouros infantis do tipo cone com regulagem manual, havendo oferta de alimento *ad libitum*. O sistema automático de ambiência é configurado para manter uma temperatura de 32°C e fornecer 23 h de luz às aves.

No curso do estágio, acompanhou-se o alojamento das aves do setor G de recria e os manejos adotados nas duas primeiras semanas de vida, em especial a administração do probiótico, amostragem de peso, oferta de ração e estímulo ao consumo de água.

5.4.7. Manejo de cama

A cama do aviário é utilizada para melhorar as condições sanitárias e de bem-estar animal durante o período em que as aves estão alojadas. Uma cama de qualidade adequada pode prevenir a formação de calos e proteger a ave de oscilações de temperatura enquanto absorve as excretas, diminuindo a umidade ambiental. A realização de manejos periódicos ajuda a mantê-las em boas condições, sendo imprescindível na prevenção de enfermidades.

O excesso de umidade e a temperatura dentro dos aviários pode favorecer a proliferação de fungos e bactérias, além disso, a amônia proveniente das excretas das aves diminui a qualidade do ar e aumenta os riscos de intoxicação.

Na empresa, as camas são movimentadas com o auxílio de microtrator para permitir a ventilação do material, facilitando a secagem e diminuindo a contaminação

por microrganismos. Caso a cama esteja molhada, ocorre a distribuição cal virgem nas camas dos aviários para favorecer a secagem.

5.4.8. Colheita e desinfecção de ovos férteis

Diariamente, realizam-se seis colheitas de ovos por meio de esteiras automáticas acopladas aos ninhos e dez colheitas manuais de ovos de cama. Os ovos passam por um processo de desinfecção para evitar a disseminação de patógenos. Além disso, a incubação de ovos contaminados diminui os índices de eclosão e pode resultar no nascimento de pintos com qualidade inferior, aumentando a probabilidade de mortalidade precoce (VILELA, 2012).

Os ovos limpos são fumigados com paraformaldeído na concentração de 7,5 g/m³ durante 30 minutos. Ovos com fezes e sangue são lavados com solução desinfetante à base de amônia quaternária e glutaraldeído na concentração de 0,2 mL/L.

Executou-se a colheita e desinfecção de ovos férteis dos setores F, H e I. Durante o procedimento, houve a classificação de ovos impróprios para incubação, nessa categoria incluem-se os ovos trincados, com gema dupla e ovos com deformidades na casca (sem mineralização da casca e com deposição irregular de cálcio).

5.4.9. Monitoramento do peso de aves reprodutoras

Durante o estágio, foram realizadas três pesagens nos setores D e G (recria) e duas pesagens no setor I (produção). O procedimento é realizado com auxílio de uma balança digital portátil com sistema de pendura. A pesagem ocorre em 3% das fêmeas e 3% dos machos selecionados aleatoriamente ao longo do galpão.

5.4.10. Avaliação de fertilidade em machos

Os galos apresentam características sexuais secundárias relacionadas à produção de testosterona, hormônio responsável pela libido e qualidade espermática. Um galo acasala em média com dez fêmeas. Para manter o índice de fertilidade alto no plantel recomenda-se a substituição dos machos inférteis.

A avaliação de fertilidade inicia-se com a inspeção do desenvolvimento e coloração de crista e barbelas, que devem se encontrar bem desenvolvidas e avermelhadas. Segundo Celeghini et al. (2001), galos com cristas e barbelas bem

desenvolvidas tendem a apresentar melhor concentração e motilidade espermática favorecendo a fecundação.

Machos com a musculatura peitoral muito desenvolvida não conseguem realizar a cópula e, pouco desenvolvida pode indicar deficiência nutricional, podendo interferir na qualidade espermática e diminuir os índices de fertilidade (Celeghini, et al. 2001). Ao mesmo tempo, avalia-se a cloaca dos machos que deve encontrar-se entumecida e úmida, indicando a ocorrência de atividade sexual constante.

No estágio, foram realizadas duas avaliações de fertilidade dos machos alojados no setor H e I (produção). As aves alojadas no setor H estavam com 26 semanas de vida, iniciando o período produtivo, enquanto as aves do setor I encontravam-se com 38 semanas de vida, no pico de produção.

Após a avaliação, galos inférteis foram eutanasiados por deslocamento cervical, segundo a Resolução Normativa do CONCEA nº37, de 15 de fevereiro de 2018. A reposição dos animais descartados ocorria no decorrer das três semanas seguintes, após a adaptação de galos provenientes dos núcleos de recria da unidade.

5.4.11. Vacinação

A vacinação de aves reprodutoras previne enfermidades e aumenta a transmissão de anticorpos maternos à prole (JAENISCH, 2003).

Durante o estágio, acompanhou-se a elaboração do protocolo vacinal de aves reprodutoras alojadas no setor G (Quadro 1 e Quadro 2). Nesse contexto, realizou-se a vacinação das aves do mesmo setor, imunizando-as contra Doença de Newcastle, bronquite infecciosa das aves e Doença de Gumboro.

Além disso, a discente participou da vacinação contra a síndrome da queda de postura, Doença de Gumboro, Doença de Newcastle e bronquite infecciosa das aves, administradas por via intramuscular no plantel alojado no setor A.

Quadro 3. Protocolo vacinal de aves reprodutoras na fase de recria.

Idade (semanas)	Idade (dias)	Vacina contra a enfermidade	Nome Comercial da vacina	Via de administração	Laboratório
0	1	Doença de Marek (<i>Herpesvirus</i> tipo 1)	POULVAC OVOLINE	<i>In ovo</i>	Zoetis
	1	Artrite Viral (<i>Reovirus</i>)	REO2177	Subcutânea	MSD
	1	Coccidiose (<i>Eimeria</i> spp.)	EVALON	<i>Spray</i>	Hipra

1	7	Doença de Newcastle (<i>Paramyxovirus</i> tipo 1)	NEWCASTLE HB1	Ocular	Boehringer
		Bronquite Infecciosa das Aves (<i>Coronavirus</i>)	BIORAL H	Ocular	Boehringer
		Doença de Gumboro (<i>Avibirnavirus</i>)	GUMBORO D78 OCULAR	Ocular	MSD
4	28	Doença de Newcastle (<i>Paramyxovirus</i> tipo 1)	NEWCASTLE LASOTA	Spray	Boehringer
		Bronquite Infecciosa das Aves (<i>Coronavirus</i>)	BIORAL H-120		Boehringer
		Doença de Gumboro (<i>Avibirnavirus</i>)	GUMBORO D78		MSD
6	42	Pneumovirose Aviária (<i>Metapneumovirus</i>)	NEMOVAC	Ocular	Boehringer
		Artrite Viral (<i>Reovirus</i>)	POULVAC REO	Asa	Zoetis
		Bouba Aviária (<i>Avipoxvirus</i>)	DIFTOVAX SUAVE	Punção de asa	Boehringer
		Encefalomielite Aviária (<i>Hapatovirus</i>)	PROVAC AE	Água de bebida	Zoetis
8	56	Anemia Infecciosa (<i>Gyrovirus</i>)	THYMOVAC	Água de bebida	Elanco
9	63	Doença de Newcastle (<i>Paramyxovirus</i> tipo 1)	NEWCASTLE LASOTA	Spray	Boehringer
		Bronquite Infecciosa das Aves (<i>Coronavirus</i>)	BIORAL H-120		Boehringer
		Doença de Gumboro (<i>Avibirnavirus</i>)	GUMBORO D78		MSD
12	84	Pneumovirose Aviária (<i>Metapneumovirus</i>)	POULVAC TRT	Spray	Zoetis
15	105	Encefalomielite Aviária (<i>Hapatovirus</i>)	POXINE-AE	Punção de asa	Zoetis
		Bouba Aviária (<i>Avipoxvirus</i>)			
		Artrite Viral (<i>Reovirus</i>)	REOVÍRUS	IM	Inata
		Adenovirose Aviária (<i>Aviadenovirus</i> tipo 1)/ Nefrite Aviária (<i>Astrovirus</i> -CAstV)	ADENOVIRUS TIPO 1/ ASTROVIRUS	IM	Inata
		TRT/IB/ND/BD	IBMULTI	IM	Boehringer
		Doença de Newcastle (<i>Paramyxovirus</i> tipo 1)	NEWCASTLE LASOTA	Spray	Boehringer
		Bronquite Infecciosa das Aves (<i>Coronavirus</i>)	BIORAL	Spray	Boehringer

20	140	Adenovirose Aviária (<i>Aviadenovirus</i> tipo 1)/ Nefrite Aviária (<i>Astrovirus</i> -CAstV)	ADENOVIRUS TIPO 1/ ASTROVIRUS	IM	Inata
		Artrite Viral (<i>Reovirus</i>)	NOBILIS REO INAC	IM	MSD
		TRT/IB/ND/BD	IB MULTI	IM	Boehringer
		Pneumovirose Aviária (<i>Metapneumovirus</i>)	NEMOVAC	Ocular	Boehringer

IM = Intramuscular em peito; TRT = Síndrome da queda de postura; IB= Doença de Gumboro; ND= Doença de Newcastle; BD= Bronquite Infecciosa

Fonte: Arquivo Cobb-Vantress LTDA.

Quadro 4. Protocolo vacinal de aves reprodutoras na fase de produção.

Idade (Semanas)	Idade (Dias)	Vacina contra a enfermidade	Nome Comercial da vacina	Via de administraçã o	Laboratório
34	238	Pneumovirose Aviária (<i>Metapneumovirus</i>)	HIPRAVIAR	Água de bebida	Hipra
36	252	Bronquite Infecciosa das Aves (<i>Coronavirus</i>)	BIORAL H	Spray	Hipra
40	260				
42	294	Pneumovirose Aviária (<i>Metapneumovirus</i>)	HIPRAVIAR	Água de bebida	Hipra
44	308	Bronquite Infecciosa das Aves (<i>Coronavirus</i>)	BIORAL H	Spray	Hipra
48	336				
50	350	Pneumovirose Aviária (<i>Metapneumovirus</i>)	HIPRAVIAR	Água de bebida	Hipra
52	364	Bronquite Infecciosa das Aves (<i>Coronavirus</i>)	BIORAL H	Spray	Hipra
56	392				
58	406	Pneumovirose Aviária (<i>Metapneumovirus</i>)	HIPRAVIAR	Água de bebida	Hipra
60	420	Bronquite Infecciosa das Aves (<i>Coronavirus</i>)	BIORAL H	Spray	Hipra

Fonte: Arquivo Cobb-Vantress LTDA.

5.4.12. Necropsias

O exame necroscópico das aves é realizado pelo médico veterinário para monitorar as condições sanitárias do lote. A eutanásia de aves moribundas ou com baixo desempenho zootécnico é realizada por deslocamento cervical para início dos procedimentos. No período de estágio acompanhou-se a necropsia de aves moribundas para verificar a ocorrência de doenças no plantel de aves.

Objetivando-se facilitar a visualização de lesões e evitar a contaminação de amostras para ensaios microbiológicos, o exame necroscópico segue uma ordem pré-estabelecida. Inicialmente, avalia-se o papo para verificar se houve consumo de água e alimento, seguida pela verificação de lesões articulares. Posteriormente, inicia-se a secção do epitélio da região do pescoço à cavidade celomática, observando-se o estado da traqueia, coração, fígado, baço e sacos aéreos. A seguir, verifica-se o sistema digestório, avaliando as condições do intestino delgado e dos cecos.

6.Discussão das Atividades

Durante o estágio, observou-se que o médico veterinário é responsável pela compreensão e execução de medidas que viabilizem a produção segura e sustentável de produtos avícolas. Evidenciou-se a importância da atuação dos órgãos federais no monitoramento sanitário da avicultura.

As atividades práticas permitiram aprofundar os conhecimentos teóricos adquiridos no decorrer do curso de Medicina Veterinária e vivenciar os principais desafios da profissão nas granjas, em especial a conscientização coletiva dos colaboradores sobre medidas de bem-estar animal e biossegurança. Foi possível compreender a execução dos principais exames disponíveis para o monitoramento da saúde de aves.

Ao acompanhar o cotidiano empresarial, ficou evidente a importância do desenvolvimento de habilidades interpessoais, como comunicação e liderança, para manter o engajamento da equipe.

7.Conclusão

As atividades desenvolvidas no estágio contribuíram para o entendimento prático da atuação do Médico Veterinário na área de sanidade avícola, desde as granjas até a área laboratorial e científica.

Profissionalmente, foi possível aprimorar os conhecimentos práticos sobre como o médico veterinário atua na cadeia avícola, objetivando-se a obtenção de aves cada vez mais saudáveis e livres de patógenos de importância, como *Salmonella* spp., garantindo que o consumidor obtenha um produto de qualidade. Além disso, a realização de atividades em locais distintos contribuiu para o

desenvolvimento de habilidades interpessoais e para o conhecimento de novas culturas.

8.Referências

ACHARYA, T. & HARE, J. **Laboratory Protocols in Fungal Biology: Current Methods in Fungal Biology**. Cham. Springer International Publishing, p. 69-86, 2022.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Padrões Microbiológicos de Alimentos – Conceitos e Alterações**. ANVISA, 2020.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução RDC N.º 12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos**. Diário Oficial da União. Brasília, 2001.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ISO/IEC 17025: requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração**. Rio de Janeiro, 2006.

AYDIN, S. **A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA**. Peptides, v. 72, p. 4-15, 2015.

CARDOSO, A. L. S. P., et al. **Pesquisa de coliformes totais e coliformes fecais analisados em ovos comerciais no laboratório de patologia avícola de Descalvado**. Arquivos do Instituto Biológico, v. 68, n. 1, p. 19-22, 2001.

CELEGHINI, E. C. C. et al. **Avaliação das características seminais de galos selecionados para a reprodução pelo desenvolvimento da crista**. Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science, v. 38, p. 177-183, 2001.

D'AOUST, J. Y. et al. **Evaluation of the BAX gel and fluorometric systems for the detection of foodborne Salmonella**. Journal of food protection, v. 70, n. 4, p. 835-840, 2007.

DOMANSKA-BLICHARZ, K., et al. **Bacterial and viral rodent-borne infections on poultry farms. An attempt at a systematic review.** Journal of Veterinary Research, v. 67, n. 1, p. 1-10, 2023.

FREITAS NETO, O. C.; PENHA FILHO, CASARIN, R. A.; BERCHIERI JUNIOR, A. **Samoneloses aviárias.** In: Andreatti, RL; Berchieri Junior, A., Silva, EN; Back, A.; Fábio, J; Zuanaze, M. (Org.). Doenças das aves. 3ed.Campinas-SP: Facta, v. 1, p. 495-517, 2020.

FURUSE, Y. et al. **Evolution of the M gene of the influenza A virus in different host species: large-scale sequence analysis.** Virology journal, v. 6, n. 1, p. 1-13, 2009.

ISSENHUTH-JEANJEAN S. et al. Supplement 2008-2010 (n. 48) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. **Research in Microbiology**, v.165, p. 526-530, 2014.

JACOBSON, A. P. et al. **Relative effectiveness of selected preenrichment media for the detection of *Salmonella* from leafy green produce and herbs.** Food microbiology, v. 63, p. 123-128, 2017.

JAENISCH, F. R. F. **Como e por que vacinar matrizes, frangos e poedeiras.** 2003.

MA, C. et al. **Magnetic Nanoparticles-Based Extraction and Verification of Nucleic Acids from Different Sources.** Journal of Biomedical Nanotechnology, v.9, n.4, p.703–709, 2013.

MACKAY, M. I. **Real-time PCR in the microbiology laboratory.** Clinical microbiology and infection, v. 10, n. 3, p. 190-212, 2004.

MALLMANN, A. O. & DILKIN, P. **Micotoxinas na Avicultura (parte 1).** In: Andreatti Filho, R.L.; Berchieri Júnior, A.; Silva, E.N.; Back, A.; Di Fábio, J.; Zuanaze, M.A.F..

(Org.). Doenças das Aves. 3ed.Campinas: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, 2020, v. 1, p. 969-984.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA)**. MAPA, 2002.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Manual de Métodos Oficiais para Diagnóstico de Doenças Animais**. MAPA, 2022.

MINISTÉRIO DA SAÚDE E SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE E AMBIENTE. **Informe de Surtos de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar de 2022**. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/dtha/publicacoes/surtos-de-doencas-de-transmissao-hidrica-e-alimentar-no-brasil-informe2023>>. Acesso em: 15 de novembro de 2023.

PEREIRA, V. J. et al. **Assessment of the presence and dynamics of fungi in drinking water sources using cultural and molecular methods**. Water Research, v. 44, n. 17, p. 4850-4859, 2010.

SANTOS, M. D., AREAS, M. A., & REYES, F. G. R. **Piretróides—uma visão geral**. Alimentos e Nutrição Araraquara, v. 18, n. 3, p. 339-349, 2008.

TESSARI, E. N. C. et al. **Prevalência de *Salmonella* Enteritidis em carcaças de frango industrialmente processadas**. Hig. aliment, p. 52-55, 2003.

TIZARD, R. I. **Veterinary Immunology-E-Book**. Elsevier Health Sciences, 2017.

VILELA, C.O. et al. **Propolis: a natural product as an alternative for disinfection of embryonated eggs for incubation**. Arq. Inst. Biol., São Paulo, v. 79, n. 2, p. 161-167, 2012.

WISE, M. G. et al. **Development of a real-time reverse-transcription PCR for detection of Newcastle disease virus RNA in clinical samples**. Journal of clinical microbiology, v. 42, n. 1, p. 329-338, 2004.

ZHAO, N. et al. **Tetraplex fluorescent microbead-based immunoassay for the serodiagnosis of Newcastle disease virus and avian influenza viruses in poultry sera.** Pathogens, v. 11, n. 9, p. 1059, 2022.

FALAR SOBRE A DIFICULDADE NO CONTROLE DE C. PERFRINGENS NA PAGINA 40

II.Assunto de Interesse: Enterite Necrótica das Aves

1.Introdução

A Enterite Necrótica das Aves (ENA) é uma enterotoxemia aguda, não contagiosa, ocasionada pela proliferação rápida e exacerbada de *Clostridium perfringens* (*C. perfringens*) no sistema digestório de aves comerciais (SCHOCKEN-ITURRINO et al., 2020). Destaca-se como uma das principais enfermidades que acometem as aves domésticas ao redor do mundo, acarretando perdas produtivas devido às lesões intestinais que causam queda nos indicadores zootécnicos e mortalidade súbita.

A doença foi relatada pela primeira vez em aves por Parish (1961) e passou a ser controlada pelo uso de antimicrobianos promotores de crescimento adicionados à ração. No ano de 2006, a União Europeia aboliu essa prática, visando minimizar a seleção de estirpes bacterianas, de interesse em saúde pública, resistentes a antimicrobianos, levando a um aumento no número de casos de doenças relacionadas a patógenos oportunistas, como *C. perfringens*. Dessa forma, os pesquisadores passaram a buscar alternativas para minimizar os prejuízos econômicos oriundos da ENA de forma sustentável, sem a utilização dos promotores de crescimento (DAHIYA et al. 2006).

Em frangos de corte, os surtos da doença geralmente ocorrem entre duas e cinco semanas de idade, causando desuniformidade e condenação de carcaças, além da mortalidade em média de 15% do lote na forma clínica da enfermidade (IMMERSEEL et al., 2004). Em poedeiras, as manifestações ocorrem entre o terceiro e o sexto mês de idade (SCHOCKEN-ITURRINO et al., 2020). Apesar dos prejuízos associados à apresentação clínica da doença, as principais perdas produtivas relacionam-se com a forma subclínica, que causa desuniformidade do lote e queda de postura.

Nos Estados Unidos da América, o impacto econômico anual relacionado ao *C. perfringens* na avicultura é estimado em 6 bilhões de dólares (WADE & KEYBURN, 2015) e o número de internações pela ingestão de produtos de origem animal contaminados chega a 1 milhão de casos por ano (USDA, 2021). No Brasil, segundo o Informe de Surtos de DTHA de 2022 (SVSA, 2023), em 2022, cerca de 4,6% das internações relacionadas à DTHA foram causadas por *C. perfringens*.

Diante da necessidade de atenuar os prejuízos econômicos associados à ENA na avicultura. Dessa forma, ressalta-se a importância de compreender os aspectos epidemiológicos e preventivos dessa enfermidade que possui uma epidemiologia complexa por tratar-se de um problema clínico secundário.

2. Agente Etiológico

Clostridium perfringens é um bastonete Gram-positivo móvel, por meio do pilus tipo IV, integrante da família Bacillaceae. Normalmente, encontra-se isolado ou aos pares, assumindo a forma esporulada no ambiente. Apesar de caracterizar-se como anaeróbico, não exige condições estritas de ausência de oxigênio para multiplicar-se, ao contrário demais espécies do gênero (SCHOCKEN-ITURRINO et al., 2020).

O patógeno desenvolve-se em uma faixa de temperatura que varia de 6°C a 50°C, com a temperatura ótima de proliferação entre 43°C e 47°C. A multiplicação bacteriana ocorre preferencialmente em pH neutro (pH=7,0), mas a espécie sobrevive a variações de pH de 5,0 a 9,0. A bactéria é capaz de fermentar glicose, lactose, frutose, maltose, manose, galactose, sacarose, inositol e amido (FATHIMA et al., 2022). A forma esporulada do *C. perfringens* pode sobreviver a temperaturas acima de 100°C, radiação solar e desidratação, dificultando a sua remoção completa do ambiente (SARKER et al., 2000).

Diante desses aspectos, fica evidente a dificuldade no controle e eliminação completa do microrganismo, ressaltando-se a necessidade de adotar manejos integrados que minimizem o risco da bactéria se multiplicar de forma exacerbada.

3. Fatores de Virulência

A espécie *C. perfringens* é subdividida em sorotipos, classificados de acordo com o perfil de produção de toxinas (ENGSTRÖM et al., 2003). Estima-se que a espécie produza cerca de 20 toxinas distintas (UZAL et al., 2014), caracterizando cinco sorotipos oficiais (A, B, C, D e E). No entanto, estudos recentes conseguiram associar as toxinas CpE e Net-B a novos sorogrupos que não foram oficialmente classificados até o presente momento, F e G, respectivamente, visando facilitar o diagnóstico e a avaliação epidemiológica da enfermidade (ROOD et al., 2018).

A toxina *alfa* foi considerada durante décadas a principal causa de ENA. Entretanto, observou-se que a atividade patogênica relacionada à forma subclínica

da enfermidade está correlacionada à toxina Net-B, produzida apenas pelo sorotipo G (MOHIUDDIN et al., 2021). Ademais, o sorotipo C pode infectar frangos de corte,

Quadro 1. Relação entre sorotipos de *C. Perfringens* e a produção de toxinas *alfa*, *beta*, *épsilon*, *iota*, CpE e Net-B

Sorotipo	Toxina Produzida					
	<i>Alfa</i>	<i>Beta</i>	<i>Épsilon</i>	<i>Iota</i>	CpE	Net-B
A	+	-	-	-	-	-
B	+	+	+	-	-	-
C	+	+	-	-	+/-	-
D	+	-	+	-	+/-	-
E	+	-	-	+	+/-	-
F*	+	-	-	-	+	-
G*	+	-	-	-	-	+

O sinal “+” indica que o sorotipo de *C. perfringens* produz a toxina; enquanto o sinal “-” indica que o sorotipo não produz a toxina. *Sorotipos F e G ainda não foram oficialmente classificados, integrando o sorotipo A.

Fonte: Adaptado de Rood et al., 2018

3.1.Toxina *Alfa*

A toxina *alfa* está presente em todos os sorotipos de *C. perfringens* e é considerada o principal fator de virulência da espécie (TAKEHARA et al., 2020). Classifica-se como uma lecitinase, apresentando atividade enzimática relacionada à hidrólise dos fosfolipídios fosfatidilcolina e esfingomiélin, importantes constituintes das membranas celulares de eucariotos, levando à morte celular (TITBALL et al., 1899). A lise celular, oriunda desse processo, resulta no surgimento de lesões nas mucosas intestinais, inflamação e comprometimento da barreira epitelial que evolui para um quadro ulcerativo e necrótico (TITBALL et al., 1989).

A atividade tóxica relacionada a esse composto pode interferir na circulação periférica ao redor das lesões necróticas, podendo evoluir para o estado de mionecrose e interrupção do peristaltismo, quadro clínico observado nas formas mais graves da enfermidade (ZÚÑIGA-PEREIRA et al., 2019).

3.2.Toxina *Beta*

A toxina *beta* atua como uma neuraminidase, induzindo a formação de poros nas membranas plasmáticas através da ligação com as proteínas carreadoras difusas na bicamada lipídica (LENCER, 2020). Esse mecanismo interfere no controle do sistema nervoso autônomo, elevando a pressão arterial e diminuindo a frequência cardíaca. Além disso, causa edema e necrose no tecido epitelial que reveste o trato digestório (NAGAHAMA et al., 2015).

3.3.Toxina *Épsilon*

A toxina *épsilon* é secretada pelos sorotipos B e D. A molécula atua via endocitose formando vacúolos ribossomais ou lisossomais e formando poros na membrana plasmática que alteram o funcionamento da bomba de sódio e potássio (SAKAGUCHI et al., 2023). Essa alteração metabólica aumenta a permeabilidade vascular, resultando no surgimento de edemas generalizados (STILES et al., 2013).

3.4.Toxina *Iota*

A toxina *iota* classifica-se como uma toxina ADP-ribosilantes, produzida exclusivamente pelo sorotipo E de *C. perfringes*. Possui capacidade de formar poros na membrana plástica e adentrar o citoplasma, destruindo o citoesqueleto e inviabilizando a manutenção da homeostase (SAKURAI et al., 2009). Esse mecanismo degenera a mucosa e induz a necrose, resultando no acúmulo de líquidos no lúmen do intestino delgado (REDONDO et al., 2017).

3.5.Toxina CpE

A toxina CpE é codificada por DNA plasmidial e atua nas junções intracelulares das células intestinais, estruturas que mantêm a aderência entre as células formadoras do tecido. Essa toxina está relacionada principalmente à intoxicação alimentar humana e diarreia mediada por *C. perfringens* não-alimentar, normalmente associada ao uso de antimicrobianos que alteram a constituição da flora intestinal (MCCLANE et al., 2012).

3.6.Toxina Net-B

A toxina Net-B foi descrita pela primeira vez em 2008 e, até o ano de 2018, era associada ao sorotipo A de *C. perfringens* (MOHIUDDIN et al., 2021). Net-B

classifica-se como uma toxina formadora de poros na membrana plasmática, possuindo similaridade molecular com a toxina *beta* de *C. perfringens*. Acredita-se que esse composto cause lesões na forma subclínica da ENA em frangos, apresentação da doença com maior impacto econômico (KEYBURN et al., 2008).

4.Epidemiologia e Fatores Predisponentes

A transmissão de ENA não ocorre de forma direta entre os animais, pois *C. perfringens* é um microrganismo natural da microbiota de intestino grosso e cecos de aves domésticas desde os primeiros dias de vida (SHANE et al., 1984). Além disso, a bactéria é frequentemente encontrada nos produtos de origem animal utilizados na formulação de rações (UDHAYAVEL et al., 2017).

Dessa maneira, a ocorrência de fatores predisponentes é necessária para o desenvolvimento do quadro enterotoxêmico característico da enfermidade (YANG et al., 2019). Os surtos de ENA normalmente associam-se a formulação de dietas ricas em componentes de absorção lenta, doenças imunossupressoras e outras enfermidades, como a coccidiose.

4.1.Formulação de dieta

Os componentes da dieta interferem diretamente na microbiota e homeostasia intestinal das aves (DAL PONT et al., 2023). Rações formuladas com carboidratos de baixa digestibilidade, como trigo e cevada, favorecem o aumento da viscosidade e fermentação no trato digestório, resultando na proliferação de bactérias fermentadoras como *C. perfringens* (RIDEELL & KONG, 1992).

Outro componente associado a surtos de ENA são as proteínas de origem animal, como farinha de peixe, ossos e carne, as quais caso encontrem-se deterioradas podem causar lesões no epitélio intestinal, favorecendo indiretamente a proliferação de *C. perfringens*. Além disso, assim como nas aves, o *C. perfringens* encontra-se naturalmente difundido na comunidade bacteriana do trato digestório de diversos animais de produção. Dessa maneira, o risco de contaminação associado à utilização de subprodutos oriundos de vísceras e ossos é elevado (UDHAYAVEL et al., 2017).

4.2.Fatores imunossupressores

Micotoxinas são substâncias tóxicas produzidas por fungos que podem contaminar matérias-primas e rações animais (MURUGESAN et al., 2015). No caso da avicultura, as micotoxinas desoxinivalenol (DON), fumonisina (produzidas por fungos do gênero *Fusarium*) e aflatoxina (produzida por fungos do gênero *Aspergillus*) favorecem a proliferação de *C. perfringens*.

A aflatoxina reduz o consumo de ração devido à ocorrência de alterações morfológicas no intestino delgado e fígado de aves domésticas. Ademais, a toxina causa imunossupressão, favorecendo doenças oportunistas como a ENA (CRAVENS et al., 2013).

A micotoxina DON altera a morfologia intestinal, diminuindo a altura das vilosidades e aumentando a permeabilidade de jejuno e duodeno (GRENIER & APPLGATE, 2013). Por sua vez, a fumonisina reduz a altura das vilosidades e a profundidade das criptas intestinais, favorecendo o deslocamento microbiano (FATHIMA et al., 2022). Dessa maneira, a digestão e absorção de proteínas fica debilitada, tornando o nutriente disponível para patógenos intestinais.

Ademais, doenças imunossupressoras, como a Doença de Gumboro, Marek e anemia infecciosa das aves, também predispõe à emergência de enfermidades ocasionadas por patógenos oportunistas, como o *C. perfringens* (TIMBERMONT et al., 2011). A vulnerabilidade imunológica nos primeiros dias após a imunização com vacinas vivas, como ocorre nas vacinas que previnem a Doença de Gumboro e Coccidiose, também permite a proliferação do patógeno causador da ENA, sendo inclusive adotada como protocolo para desafios experimentais por *C. perfringens* (JUSTINO et al., 2022).

4.3.Manejo da cama dos aviários

A concentração elevada de excretas e microrganismos de origem fecal nas camas do aviário favorece a ocorrência de doenças entéricas, como a ENA. O aumento da densidade populacional de aves agrava esse problema e gera um estímulo de estresse contínuo para os animais, causando imunossupressão secundária (SCANES, 2016). Adicionalmente, a umidade e as temperaturas nas camas dos aviários propiciam um ambiente ideal para proliferação de microrganismos anaeróbicos.

A presença do artrópode *Alphitobius diaperinus*, popularmente conhecido como cascudinho, na cama dos aviários aumenta a probabilidade de surto de ENA, pois o inseto é vetor mecânico do *C. perfringens* (VITTORI et al., 2007) e da *Eimeria* spp. (GOODWIN & WALTMAN, 1996), patógeno amplamente associado a ocorrência de ENA.

4.4.Coccidiose

Coccidiose é a doença parasitária intestinal de maior importância em avicultura, tendo como agente etiológico *Eimeria brunetti*, *E. maxima*, *E. tenella*, *E. acervulina* e *E. necatrix*. Cerca de 75% dos casos de ENA ocorre de forma secundária à coccidiose (LONG, 1973), principalmente aquelas causadas por *E. maxima* e *E. acervulina*, que parasitam o intestino delgado, lesando a parede intestinal e prejudicam a digestão e absorção de alimentos (WILLIAMS, 2005).

O protozoário é responsável pela invasão da mucosa intestinal, causando hemorragias que aumentam a concentração de proteínas plasmáticas e a oferta de nutrientes disponíveis no lúmen intestinal, favorecendo a proliferação de *C. perfringens* (PETIT et al., 1999). Experimentalmente, a infecção por protozoários do gênero *Eimeria* é utilizada como forma de induzir a enterotoxemia por *C. perfringens*, geralmente associada à vacina de Gumboro para imunossupressão (SHOJADOOST et al., 2012; JANG et al., 2013).

5.Patogênese

5.1.Forma clínica

A manifestação clínica da ENA caracteriza-se principalmente por sinais sistêmicos inespecíficos, como apatia, anorexia e penas arrepiadas (SCHOCKEN-ITURRINO et al., 2020). Em manifestações clínicas com início súbito e curso hiperagudo, a mortalidade pode ocorrer de uma a duas horas após o início da proliferação dos microrganismos no trato intestinal, apresentando mortalidades médias de 15%, com variação de 1 a 50% do lote de frangos de corte (IMMERSEEL et al., 2004).

As fezes apresentam-se diarreicas, escurecidas (melena) e, em alguns casos, com manchas de sangue. No exame necroscópico, na maioria dos casos, é possível observar o escurecimento da musculatura peitoral. Na porção intestinal, verifica-se a presença de lesões ulcerativas e necrose confluenta (Figura 1), com a formação de

gás na região de jejuno e íleo. Em intoxicações mais graves, estas lesões encontram-se distribuídas no ceco (SCHOCKEN-ITURRINO et al., 2020). Na apresentação clínica, muitas vezes, os vasos sanguíneos encontram-se ocluídos por trombos hialinos. Outro sinal observado é a hepatomegalia com pontos esbranquiçados, que ocorre devido a deposição de fibrinogênio oriundo da lesão necrótica (COOPER & SONGER, 2009).



Figura 1. Necrose confluyente em jejuno. **Fonte:** Timbermont et al., 2011.

5.2. Forma subclínica

As manifestações subclínicas apresentam-se de forma inespecífica e crônica, sem apresentar sinais clínicos. Essa manifestação caracteriza-se pela queda de uniformidade e parâmetros zootécnicos do lote. Durante a avaliação de integridade de vísceras nos abatedouros, é possível observar as lesões intestinais provenientes da forma subclínica da enfermidade.

Nestes casos, no exame necroscópico, observa-se a ocorrência de lesões intestinais necróticas focais (Figura 2) e hepatite secundária. Os pontos necróticos do intestino delgado são circundados por depósitos de fibrina, enquanto o fígado apresenta-se pálido e aumentado. (LOVLAND & KALDHUSDAL, 1999). Com a cronicidade da doença, pode-se observar a formação de edemas nos membros posteriores e a formação de lesões gangrenosas, similares ao observado na Gangrena gasosa (SCHOCKEN-ITURRINO et al., 2020).

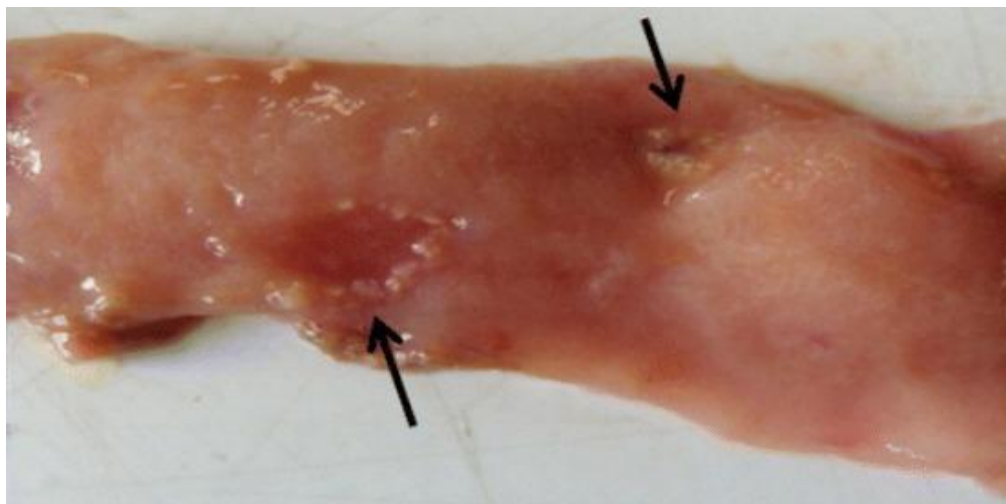


Figura 2. Necrose focal em intestino delgado de ave de corte. **Fonte:** Timbermont et al., 2011.

5.3. Lesões microscópicas

Microscopicamente, verifica-se a presença de lesões necróticas que se estendem nos vilos e criptas intestinais, muitas vezes com a adesão de células imunes mononucleares. Há perda dos vilos e exposição da lâmina própria, podendo evoluir até a musculatura intestinal em casos mais graves (SCHOCKEN-ITURRINO et al., 2020).

No fígado, observa-se a hiperplasia de ductos biliares e necrose fibrinoide (LOVLAND & KALDHUSDAL, 1999)

6. Diagnóstico

O diagnóstico da enfermidade ocorre pela observação dos sinais clínicos e de lesões macroscópicas em necropsia (COOPER et al., 2013). Na condução de pesquisa científica, o patógeno pode ser identificado laboratorialmente através do cultivo seletivo de amostras oriundas do intestino de aves. O material é cultivado em ágar SPS para verificação de sulfitorredução e em ágar sangue para avaliação de hemólise. A incubação deve ocorrer em condições anaeróbicas, por 24-48 horas a 37°C. A confirmação bioquímica ocorre com a execução do teste de catalase (SCHOCKEN-ITURRINO et al., 2020).

A pesquisa de toxinas-alvo pode direcionar sorotipificação de *C. perfringens*. Esse procedimento normalmente ocorre pelo método de neutralização de toxinas, teste realizado a partir da reação da antitoxina com a amostra (SCHOCKEN-ITURRINO et al., 2020). Para fins científicos, emprega-se a Reação em Cadeia da

Polimerase *Multiplex* (PCR *Multiplex*), que identifica o gene codificador de toxinas-alvo (BAUMS et al., 2004; HUSSAIN et al., 2021) e o ELISA (HALE & STILES, 1999).

7. Diagnóstico diferencial

Os sinais clínicos e achados de necropsia da enterotoxemia causada por *C. perfringens* são semelhantes ao encontrado na enterite ulcerativa, causada por *Clostridium colinum* (*C. colinum*). Ambas as enfermidades causam lesões ulcerativas e necróticas ao longo do intestino delgado, além do acúmulo de gás e hepatomegalia. No entanto, as lesões associadas ao *C. colinum* normalmente caracterizam-se pela presença de mucosa diftérica, levemente amarelada e estriações esbranquiçadas no epitélio do intestino delgado. Além disso, na enterite ulcerativa o baço pode encontrar-se hemorrágico, sinal clínico que não é observado na ENA (SCHOCKEN-ITURRINO et al., 2020).

8. Prevenção e Controle de *C. perfringens* em Aves

O controle de surtos ocorre pela utilização de antimicrobianos, como as lincomicinas, bacitracinas e oxitetraciclinas, e de anticoccidianos quando a doença ocorre de forma secundária à coccidiose (MCCLANE et al., 2012). Outra estratégia que auxilia no controle da enfermidade é a utilização de produtos de exclusão competitiva, como os probióticos comerciais à base de *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp. (SCHOSTER et al., 2013) e *Bacillus* spp. (RAMLUCKEN et al., 2020).

Por tratar-se de um patógeno amplamente difundido no ambiente e natural do microbioma intestinal das aves, medidas severas de biossegurança não garantem a prevenção da ENA. Torna-se, assim, necessária a adoção de estratégias de manejo integradas que minimizem a ocorrência de fatores predisponentes à ENA.

Dentre as recomendações práticas, destaca-se o controle do excesso de umidade da cama, fator que favorece a proliferação de bactérias patogênicas e fungos. Recomenda-se a troca ou tratamento da cama do aviário no período de vazio sanitário para evitar contaminação cruzada entre os lotes (ÁVILA et al., 2007).

Em relação ao manejo nutricional, deve-se dar preferência a carboidratos digestíveis para as aves, como é o caso do milho (PÊSSOA et al., 2012). Além disso, a utilização de proteínas de origem animal também se relaciona à ocorrência

de ENA. Neste aspecto, ressalta-se a necessidade de adquirir matérias-primas de alta qualidade e baixos níveis de contaminação microbiológica.

9. Discussão

O Brasil lidera a exportação de carne de frango no mundo (ABPA, 2023), levando a necessidade de intensificar a cadeia produtiva para atender à demanda de mercado, agravando os problemas sanitários como a ENA, enfermidade causada pelo *C. perfringens* (MORA et al., 2020).

Esta bactéria é um patógeno oportunista e amplamente distribuído no ambiente e na microbiota das aves desde os primeiros dias de vida, tornando necessária a realização do controle dos fatores predisponentes a ocorrência da doença.

Na apresentação aguda da ENA, a mortalidade ocorre de forma massiva e rápida sem sinais clínicos predisponentes (SKINNER et al., 2010), resultando em perdas produtivas elevadas antes do início do tratamento das aves. Na manifestação clínica, a mortalidade significativa e a redução dos índices zootécnicos é elevada. Caso não ocorra tratamento, os sinais clínicos perduram duram em média até o 14º dia após o início dos sintomas. A forma subclínica não apresenta sinais clínicos evidentes, dificultando o diagnóstico. Nesse caso, observa-se a ocorrência de desuniformidade do lote e queda nos índices de produção decorrentes da diminuição da absorção de nutrientes (KALDHUSDAL & HOFSHAGEN, 1992). Estima-se que a prevalência da forma subclínica de ENA seja o principal fator de perda econômica associado a *C. perfringens* na avicultura, afetando até 40% dos lotes e causando uma diminuição do ganho de peso corporal de até 12%, além de um aumento da taxa de conversão alimentar de 11% em frangos de corte (SKINNER et al., 2010).

Os prejuízos acerca da enfermidade não se limitam às perdas econômicas, visto que alimentos contaminados com altas concentrações de *C. perfringens* têm o potencial de causar diarreias em humanos. Em idosos e imunossuprimidos o quadro clínico pode se agravar e evoluir para o óbito (MCCLANE et al., 2001).

O tratamento da apresentação clínica de ENA em aves ocorre através de antimicrobianos. No entanto, a existência de estirpes de *C. perfringens* resistentes a esses fármacos foi relatada em diferentes nações, como Índia (YADAV et al., 2017), Bélgica (GHOLAMIANDEHKORDI et al., 2009), Estados Unidos da América (WATKINS et al., 1997) e Brasil (SILVA et al., 2009). Diante disso, o

desenvolvimento de tratamentos alternativos que não favorecem a seleção de estirpes resistentes, como probióticos (SCHOSTER et al., 2013; RAMLUCKEN et al., 2020) e fitobióticos (HUSSEIN et al., 2020), tem sido aplicado no controle desse patógeno. A utilização de bacteriófagos multivalentes (MILLER et al., 2010) e específicos (VENHORST et al., 2022) também apresenta alta eficácia terapêutica. Entretanto, o elevado custo financeiro atrelado à aplicação prática desses tratamentos limita sua utilização.

A coccidiose é o principal fator associado a ocorrência de ENA. Dessa maneira, a utilização de anticoccidianos é adotada no tratamento do fator predisponente à enterotoxemia causada por *C. perfringens*. Todavia, já há casos de resistência dos protozoários a esses fármacos (USMAN et al., 2011), relatados inclusive no Brasil (KRAIESKI et al., 2021). Neste sentido, é essencial a adoção de manejos preventivos contra a coccidiose e, consequentemente, contra ENA. Dentre esses, a estratégia mais eficaz é a vacinação (VERMEULEN et al., 2001), aliada à adoção de manejos que garantam boas condições de vida para as aves, como oferecimento de água limpa e condições sanitárias adequadas. Recentemente, a utilização de fitoterápicos tem apresentado sucesso terapêutico no tratamento de coccidiose sem selecionar parasitas resistentes (NAHED et al., 2022). No entanto, assim como no caso dos antimicrobianos, as estratégias alternativas são dificilmente adotadas por conta do custo associado.

Diante dessa realidade, fica evidente a necessidade de focar os esforços no manejo preventivo da ENA. Isso inclui fornecer uma dieta de qualidade microbiológica adequada, o que pode ocorrer com a ação de produtos desinfetantes e com a análise microbiológica das matérias-primas utilizadas na formulação das rações (CASAGRANDE et al., 2013). O manejo nutricional com ingredientes de fácil digestão para as aves é fundamental, visando evitar a fermentação devido ao acúmulo de matéria orgânica no lúmen intestinal.

Outra estratégia nutricional que apresentou resultados positivos no controle da ENA foi a restrição alimentar temporária (TSIOURIS, et al., 2014). A técnica objetiva diminuir o consumo de ração de frangos e, assim, minimizar a quantidade de alimento disponível no trato gastrointestinal que não é aproveitada pelas aves e nem pela microbiota benéfica (TSIOURIS et al., 2016). Essa metodologia obteve sucesso na diminuição de doenças metabólicas decorrentes do crescimento precoce e garante boa conversão alimentar e taxa de crescimento em frangos.

Os estudos que visam classificar de maneira específica as estirpes de *C. perfringens*, conforme a caracterização genotípica, contribuem para o entendimento dos aspectos epidemiológicos e patológicos da enfermidade. Assim como o conhecimento acerca das particularidades e apresentação clínica das enterotoxemias causadas por sorotipos distintos pode facilitar o desenvolvimento de novas estratégias de controle.

10. Conclusão

Os surtos de ENA prejudicam o desempenho e a qualidade das aves, causando prejuízos econômicos na avicultura, além de representar um risco à saúde humana.

Como a doença é secundária a fatores parasitários, imunossupressores e/ou dietéticos, a melhor estratégia para conter os surtos de ENA deve centrar-se no manejo preventivo, evitando-se fatores predisponentes, especialmente lesões intestinais como as observadas na coccidiose. Neste contexto, é essencial que o veterinário aprofunde seus conhecimentos acerca de manejo nutricional, ambiental e sanitário das aves, visando prevenir a ocorrência de fatores predisponentes para o surto de ENA e prescrever um diagnóstico preciso para controlar a causa primária associada a proliferação exacerbada de *C. perfringens*.

Ademais, ressalta-se a importância dos estudos que buscam caracterizar os mecanismos de expressão e produção das toxinas causadoras de ENA para melhor compreensão dos aspectos epidemiológicos da enfermidade.

11. Referências

BAUMS, C. G. et al. **Diagnostic multiplex PCR for toxin genotyping of *Clostridium perfringens* isolates.** Veterinary microbiology, v. 100, n. 1-2, p. 11-16, 2004.

CASAGRANDE, M. F. et al. ***Clostridium perfringens* in ingredients of poultry feed and control of contamination by chemical treatments.** Journal of Applied Poultry Research, v. 22, n. 4, p. 771-777, 2013.

COOPER, K. K.; SONGER, J. G. **Necrotic enteritis in chickens: a paradigm of enteric infection by *Clostridium perfringens* type A.** Anaerobe, v. 15, n. 1-2, p. 55-60, 2009.

COOPER, K. K.; SONGER, J. G.; UZAL, F. A. **Diagnosing clostridial enteric disease in poultry.** Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, v. 25, n. 3, p. 314-327, 2013.

CRAVENS, R. L. et al. **The effects of necrotic enteritis, aflatoxin B1, and virginiamycin on growth performance, necrotic enteritis lesion scores, and mortality in young broilers.** Poultry science, v. 92, n. 8, p. 1997-2004, 2013.

DAHIYA, J. P. et al. **Potential strategies for controlling necrotic enteritis in broiler chickens in post-antibiotic era.** Animal Feed Science and Technology, v. 129, n. 1-2, p. 60-88, 2006.

DAL PONT, G. C. et al. **Distillers dried grains with soluble and enzyme inclusion in the diet effects broilers performance, intestinal health, and microbiota composition.** Poultry Science, v. 102, n. 11, p. 102981, 2023.

ENGSTRÖM, B. E. et al. **Molecular typing of isolates of *Clostridium perfringens* from healthy and diseased poultry.** Veterinary microbiology, v. 94, n. 3, p. 225-235, 2003.

FATHIMA, S. et al. **Necrotic enteritis in broiler chickens: A review on the pathogen, pathogenesis, and prevention.** Microorganisms, v. 10, n. 10, p. 1958, 2022.

GHOLAMIANDEHKORDI, A. et al. **Antimicrobial resistance in *Clostridium perfringens* isolates from broilers in Belgium.** Veterinary research communications, v. 33, p. 1031-1037, 2009.

GOODWIN, M. A.; WALTMAN, W. D. **Transmission of *Eimeria*, viruses, and bacteria to chicks: darkling beetles (*Alphitobius diaperinus*) as vectors of pathogens.** Journal of Applied Poultry Research, v. 5, n. 1, p. 51-55, 1996.

GRENIER, B.; APPLGATE, T. J. **Modulation of intestinal functions following mycotoxin ingestion: Meta-analysis of published experiments in animals.** Toxins, v. 5, n. 2, p. 396-430, 2013.

HALE, M. L.; STILES, B. G. **Detection of *Clostridium perfringens* alpha toxin using a capture antibody ELISA.** Toxicon, v. 37, n. 3, p. 471-484, 1999.

HUSSAIN, M. I. et al. **Densitometric analysis of rep-PCR data: Insight into genetic variability and transmission of *Clostridium perfringens* typed with an improved multiplex PCR.** Anaerobe, v. 70, p. 102383, 2021.

HUSSEIN, E. et al. **Ameliorative effects of antibiotic-, probiotic-and phytobiotic-supplemented diets on the performance, intestinal health, carcass traits, and meat quality of *Clostridium perfringens*-infected broilers.** Animals, v. 10, n. 4, p. 669, 2020.

IMMERSEEL, F. V. et al. ***Clostridium perfringens* in poultry: an emerging threat for animal and public health.** Avian pathology, v. 33, n. 6, p. 537-549, 2004.

JANG, S. I. et al. **Relative disease susceptibility and clostridial toxin antibody responses in three commercial broiler lines coinfecting with *Clostridium perfringens* and *Eimeria maxima* using an experimental model of necrotic enteritis.** Avian Diseases, v. 57, n. 3, p. 684-687, 2013.

JUSTINO, L. et al. **Evaluation of Predisposing Factors of Necrotic Enteritis in Experimentally Challenged Broiler Chickens.** Animals, v. 12, n. 15, p. 1880, 2022.

KALDHUSDAL, M.; HOFSHAGEN, M. **Barley inclusion and avoparcin supplementation in broiler diets.: 2. clinical, pathological, and bacteriological**

findings in a mild form of necrotic enteritis. Poultry Science, v. 71, n. 7, p. 1145-1153, 1992.

KEYBURN, A. L. et al. **NetB, a new toxin that is associated with avian necrotic enteritis caused by *Clostridium perfringens*.** PLoS pathogens, v. 4, n. 2, p. 26, 2008.

KRAIESKI, A. L. et al. **Sensitivity of field isolates of *Eimeria acervulina* and *E. maxima* from three regions in Brazil to eight anticoccidial drugs.** Poultry Science, v. 100, n. 8, p. 101233, 2021.

LENCER, W. I. **Everything Illuminated—*Clostridium perfringens* β -toxin.** Cell Host & Microbe, v. 28, n. 1, p. 5-6, 2020.

LOVLAND, A. & KALDHUSDAL, M. **Liver lesions seen at slaughter as an indicator of necrotic enteritis in broiler flocks.** FEMS Immunology & Medical Microbiology, v. 24, n. 3, p. 345-351, 1999.

LONG, J. R. **Necrotic enteritis in broiler chickens I. A review of the literature and the prevalence of the disease in Ontario.** Canadian Journal of Comparative Medicine, v. 37, n. 3, p. 302, 1973.

MCCLANE, B. A. **The complex interactions between *Clostridium perfringens* enterotoxin and epithelial tight junctions.** Toxicon, v. 39, n. 11, p. 1781-1791, 2001.

MCCLANE, B. A.; ROBERTSON, S. L.; LI, J. ***Clostridium perfringens*.** Food microbiology: fundamentals and frontiers, p. 465-489, 2012.

MILLER, R. W. et al. **Bacteriophage therapy for control of necrotic enteritis of broiler chickens experimentally infected with *Clostridium perfringens*.** Avian diseases, v. 54, n. 1, p. 33-40, 2010.

MINISTÉRIO DA SAÚDE E SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE E AMBIENTE. **Informe de Surtos de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar de 2022**. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/dtha/publicacoes/surtos-de-doencas-de-transmissao-hidrica-e-alimentar-no-brasil-informe2023>>. Acesso em: 15 de novembro de 2023.

MORA, Z. V. et al. ***Clostridium perfringens* as foodborne pathogen in broiler production: pathophysiology and potential strategies for controlling necrotic enteritis**. Animals, v. 10, n. 9, p. 1718, 2020.

MOHIUDDIN, M. et al. **Experimental induction of necrotic enteritis with or without predisposing factors using netB positive *Clostridium perfringens* strains**. Gut Pathogens, v. 13, p. 1-7, 2021.

MURUGESAN, G. R. et al. **Prevalence and effects of mycotoxins on poultry health and performance, and recent development in mycotoxin counteracting strategies**. Poultry science, v. 94, n. 6, p. 1298-1315, 2015.

NAGAHAMA, M. et al. **Recent insights into *Clostridium perfringens* beta-toxin**. Toxins, v. 7, n. 2, p. 396-406, 2015.

NAHED, A. et al. **Phytochemical control of poultry coccidiosis: a review**. Poultry science, v. 101, n. 1, p. 101542, 2022.

PARISH, W. E. **Necrotic enteritis in the fowl: Histopathology of the disease and isolation of a strain of *clostridium welchii***. Journal of Comparative Pathology and Therapeutics, v. 71, p. 377-IN33, 1961.

PETIT, L.; GIBERT, M.; POPOFF, M. R. ***Clostridium perfringens*: toxinotype and genotype**. Trends in microbiology, v. 7, n. 3, p. 104-110, 1999.

RAMLUCKEN, U. et al. **A novel *Bacillus* based multi-strain probiotic improves growth performance and intestinal properties of *Clostridium perfringens* challenged broilers**. Poultry science, v. 99, n. 1, p. 331-341, 2020.

REDONDO, L. M. et al. **Effects of *Clostridium perfringens* iota toxin in the small intestine of mice.** Anaerobe, v. 48, p. 83-88, 2017.

ROOD, J. I. et al. **Expansion of the *Clostridium perfringens* toxin-based typing scheme.** Anaerobe, v. 53, p. 5-10, 2018.

SAKURAI, J. et al. ***Clostridium perfringens* iota-toxin: structure and function.** Toxins, v. 1, n. 2, p. 208-228, 2009.

SAKAGUCHI, Y. et al. ***Clostridium perfringens* epsilon-toxin requires acid sphingomyelinase for cellular entry.** Anaerobe, p. 102753, 2023.

SARKER, R. et al. **Comparative experiments to examine the effects of heating on vegetative cells and spores of *Clostridium perfringens* isolates carrying plasmid genes versus chromosomal enterotoxin genes.** Applied and environmental microbiology, v. 66, n. 8, p. 3234-3240, 2000.

SCANES, C. G. **Biology of stress in poultry with emphasis on glucocorticoids and the heterophil to lymphocyte ratio.** Poultry science, v. 95, n. 9, p. 2208-2215, 2016.

SCHOCKEN-ITURRINO, R. P et al. **Clostridioses.** In: Andreatti Filho, R.L.; Berchieri Junior, A.; Da Silva, E.N.; Back, A.; Di Fabio, J.; Zuanaze, M.A.F.. (Org.). Doenças das aves. 3ed.Campinas: FACTA, 2020, p. 609-630.

SCHOSTER, A. et al. **In vitro inhibition of *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens* by commercial probiotic strains.** Anaerobe, v. 20, p. 36-41, 2013.

SHANE, S. M.; KOETTING, D. G.; HARRINGTON, K. S. **The occurrence of *Clostridium perfringens* in the intestine of chicks.** Avian Diseases, p. 1120-1124, 1984.

SHOJADOOST, B.; VINCE, A. R.; PRESCOTT, J. F. **The successful experimental induction of necrotic enteritis in chickens by *Clostridium perfringens*: a critical review.** Veterinary research, v. 43, p. 1-12, 2012.

SILVA, R. O. S. et al. **Antimicrobial susceptibility of *Clostridium perfringens* strains isolated from broiler chickens.** Brazilian Journal of Microbiology, v. 40, p. 262-264, 2009.

SKINNER, J. T. et al. **An economic analysis of the impact of subclinical (mild) necrotic enteritis in broiler chickens.** Avian diseases, v. 54, n. 4, p. 1237-1240, 2010.

STILES, B. G. et al. ***Clostridium perfringens* epsilon toxin: a malevolent molecule for animals and man?.** Toxins, v. 5, n. 11, p. 2138-2160, 2013.

TAKEHARA, M. et al. ***Clostridium perfringens* α -toxin specifically induces endothelial cell death by promoting ceramide-mediated apoptosis.** Anaerobe, v. 65, p. 102262, 2020.

TIMBERMONT, L. et al. **Necrotic enteritis in broilers: an updated review on the pathogenesis.** Avian Pathology, v. 40, n. 4, p. 341-347, 2011.

TSIOURIS, V. et al. **Temporary feed restriction partially protects broilers from necrotic enteritis.** Avian Pathology, v. 43, n. 2, p. 139-145, 2014.

TSIOURIS, V. **Poultry management: a useful tool for the control of necrotic enteritis in poultry.** Avian Pathology, v. 45, n. 3, p. 323-325, 2016.

TITBALL, R. W. et al. **Molecular cloning and nucleotide sequence of the alpha-toxin (phospholipase C) of *Clostridium perfringens*.** Infection and Immunity, v. 57, n. 2, p. 367-376, 1989.

UDHAYAVEL, S. et al. **Occurrence of *Clostridium perfringens* contamination in poultry feed ingredients: Isolation, identification and its antibiotic sensitivity pattern.** Animal Nutrition, v. 3, n. 3, p. 309-312, 2017.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA), ECONOMIC RESEARCH SERVICE (ERS). **Cost estimates of foodborne illness.** 2021. Link:<
<https://www.ers.usda.gov/data-products/cost-estimates-of-foodborne-illness/>>
 acesso em 02 de dezembro de 2023.

USMAN, J. G. et al. **Anticoccidial resistance in poultry: A review.** New York Science Journal, v. 4, n. 8, p. 102-109, 2011.

UZAL, F. A. et al. **Towards an understanding of the role of *Clostridium perfringens* toxins in human and animal disease.** Future microbiology, v. 9, n. 3, p. 361-377, 2014.

VENHORST, J.; VAN DER VOSSEN, M.; AGAMENNONE, V. **Battling enteropathogenic Clostridia: phage therapy for *Clostridioides difficile* and *Clostridium perfringens*.** Frontiers in Microbiology, v. 13, p. 891790, 2022.

VERMEULEN, A. N.; SCHAAP, D. C.; SCHETTERS, Th PM. **Control of coccidiosis in chickens by vaccination.** Veterinary Parasitology, v. 100, n. 1-2, p. 13-20, 2001.

VITTORI, Juliano et al. ***Alphitobius diaperinus* como veiculador de *Clostridium perfringens* em granjas avícolas do interior paulista Brasil.** Ciência Rural, v. 37, p. 894-896, 2007.

WADE, B. & KEYBURN, A. **The true cost of necrotic enteritis.** World Poult, v. 31, n. 7, p. 16-17, 2015.

WATKINS, K. L. et al. **In-vitro antimicrobial susceptibility of *Clostridium perfringens* from commercial turkey and broiler chicken origin.** Veterinary Microbiology, v. 54, n. 2, p. 195-200, 1997.

WILLIAMS, R. B. **Intercurrent coccidiosis and necrotic enteritis of chickens: rational, integrated disease management by maintenance of gut integrity.** Avian pathology, v. 34, n. 3, p. 159-180, 2005.

YADAV, J. P. et al. **Molecular characterization and antimicrobial resistance profile of *Clostridium perfringens* type A isolates from humans, animals, fish and their environment.** Anaerobe, v. 47, p. 120-124, 2017.

YANG, W. et al. **The netB-positive *Clostridium perfringens* in the experimental induction of necrotic enteritis with or without predisposing factors.** Poultry science, v. 98, n. 11, p. 5297-5306, 2019.

ZÚÑIGA-PEREIRA, A. M. et al. **Deficient skeletal muscle regeneration after injury induced by a *Clostridium perfringens* strain associated with gas gangrene.** Infection and Immunity, v. 87, n. 8, p. 10.1128/iai. 00200-19, 2019.