

## Virginia Léo de Almeida Pereira

### Recursos Genéticos Microbianos na Avicultura: Sanidade, Segurança Alimentar e Agronegócio

Entrevista realizada por Maíra Halfen Teixeira Liberal (PESAGRO-RIO/CEPGM)



*Médica Veterinária pela Universidade Estadual do Ceará – UECE (1986), mestrado e doutorado em Medicina Veterinária (em Ornitopatologia – 1996; e em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Aves, Ovos e Derivados – 2004), ambos pela Universidade Federal Fluminense – UFF. Experiência profissional com ênfase em Sanidade Avícola. Atuou nas áreas de Matrizes Pesadas, Incubatório, Frangos de Corte e Postura Comercial. Gerenciou equipes na assistência técnica e desenvolvimento de produtos para a indústria de Biológicos Veterinários. Atualmente é Professora Associada do curso de graduação em Medicina Veterinária da UFF e credenciada como membro permanente no Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (Higiene Veterinária Processamento Tecnológico de Aves, Ovos e Derivados), orientando alunos principalmente nos seguintes temas: Micoplasmoses Aviárias, Salmoneloses, e Resistência Antimicrobiana. Faz parte da comissão de Avaliadores Especialistas da Coordenação Geral de Acreditação – Inmetro, na área de Saúde Animal. É membro efetivo do Comitê Estadual de Sanidade Avícola do Estado do Rio de Janeiro (COESA-RJ) desde 2009 e membro do Departamento Técnico da Associação Fluminense de Avicultura e Suinocultura - AFLAS.*

#### O que motivou à criação do Núcleo de Diagnóstico Avícola na UFF (NUDIAV)?

O Brasil é o maior exportador de carne de frango do mundo, além de ocupar a segunda colocação em produção de frangos de corte e a sexta como maior produtor de ovos. O Setor Avícola tem cada vez mais importância no contexto do Agronegócio Brasileiro e a preocupação com Sanidade tem acompanhado e favorecido essa evolução. O estado do Rio de Janeiro tem uma produção expressiva de frangos de corte por mês, distribuídos em municípios como São José do Vale do Rio Preto, Três Rios, Bom Jardim, e Rio Claro, entre outros. Além das aves do Setor Industrial, existem ainda pequenas criações “caipiras” espalhadas por todo o estado. Apesar da Avicultura Fluminense não ter grande representatividade no panorama nacional, o Rio de Janeiro é o segundo estado consumidor de alimentos do país, atrás apenas de São Paulo. O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento estabeleceu um Programa de Gestão de Risco Diferenciado, baseado em Vigilância Epidemiológica e na adoção do uso de vacinas, para os estabelecimentos avícolas considerados de maior susceptibilidade à introdução e disseminação de agentes patogênicos no Plantel Avícola Nacional e para estabelecimentos avícolas que exerçam atividades que necessitam de maior rigor sanitário. A criação do Núcleo de Diagnóstico Avícola na UFF teve como objetivo o monitoramento sorológico e microbiológico de aves e a pesquisa de agentes de doenças com prioridade para aquelas abordadas no Programa Nacional de Sanidade Avícola do Brasil, como a Micoplasmose e a Salmonelose. Outros fatores que interferem na eficiência produtiva também estão sendo avaliados, como a qualidade da água, do manejo e das instalações e a higiene dos produtos derivados, como a qualidade da carne e dos ovos. Durante todos esses anos tem-se obtido resultados interessantes como o estabelecimento da prevalência da Micoplasmose em aves industriais, caipiras e silvestres; o monitoramento da infecção por salmonelas; e o estudo da suscetibilidade antimicrobiana, além do diagnóstico de doenças como Coccidiose, Candidíase, Doença de Marek e outras que acometem as aves nos pequenos criadores, prejudiciais ao desenvolvimento de seus negócios.

#### Como está estruturado o Núcleo e quais são os parceiros que atuam junto ao NUDIAV- UFF?

O NUDIAV-UFF é estruturado para atender às demandas de grandes e pequenos produtores em relação à sanidade dos plantéis avícolas, e ao diagnóstico e monitoramento das principais doenças avícolas. No NUDIAV realizam-se testes microbiológicos, sorológicos, de biologia molecular, e exames histopatológicos. Também se estabeleceu uma parceria institucional com os Laboratórios do Centro Estadual de Pesquisa em Sanidade Animal “Geraldo Manhães Carneiro” –

CEPGM, da Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro / PESAGRO-RIO, e com o Laboratório de Enterobactérias do Instituto Oswaldo Cruz.

### **Quais são as Famílias e Gêneros Bacterianos e Virais mais isolados, estudados e preservados no NUDIAV-UFF?**

Em relação à pesquisa, o Núcleo foca mais nas Enterobactérias (*Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., e *Escherichia coli*) e nos Micoplasmas aviários. As Salmonelas, além dos sorotipos que causam a Púlorose e o Tifo Aviário (doenças exclusivas de aves e de notificação obrigatória), têm relevância também na infecção das aves por sorotipos zoonóticos, como Enteritidis e Typhimurium (entre outros), de importância em Saúde Coletiva, e pelo impacto no comércio internacional de carnes. *Campylobacter* spp. estão entre as Enterobactérias que requerem grande atenção, porque são patogênicas para humanos e comumente encontradas no trato gastrointestinal das aves. A maioria das infecções por este microrganismo está associada ao consumo de carne de frango e seus subprodutos, que podem ser contaminados durante o processamento. *E. coli* pode provocar em aves doença respiratória, celulite, onfalite, ooforite e é uma das bactérias mais comuns, como agente secundário nos casos de doenças complicadas por coinfeções. Também tem importância em Saúde Pública porque pode causar infecção no trato digestivo, no trato urinário e/ou em muitos outros órgãos de humanos. Há um particular interesse no trabalho com *Mycoplasma* spp., devido aos grandes prejuízos provocados por serem microrganismos de difícil diagnóstico e controle, sendo causadores de doenças respiratórias, articulares e reprodutivas nas aves. O NUDIAV-UFF é um dos poucos laboratórios brasileiros que fazem o isolamento bacteriano para o estudo das cepas que circulam nos plantéis avícolas, e sobre a resistência antimicrobiana dessas bactérias.

### **Sabe-se da importância da Avicultura para o Agronegócio Brasileiro, e que diferentes bactérias e vírus causam enfermidades que podem afetar o desempenho dos plantéis avícolas. Fale-nos um pouco sobre a Doença Respiratória Recorrente em Galinhas Poedeiras.**

A Avicultura Brasileira de Postura ocupa lugar de destaque mundial, como dito anteriormente, e o consumo de ovos vem evoluindo anualmente de forma significativa no Brasil. Desta forma intensifica-se e cresce em importância econômica, e consequentemente surgem novos desafios sobre a Sanidade das Aves. As doenças respiratórias causadas por bactérias e vírus são responsáveis por impactar de forma negativa as criações, elevando custos de produção e prejudicando o desempenho zootécnico avícola. Dentre as diferentes ferramentas diagnósticas, a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) associada à análise dos dados zootécnicos e dos sinais clínicos, vem sendo de grande valia no diagnóstico epidemiológico dessas doenças. O NUDIAV-UFF utiliza-se da PCR, desde 2001, para o diagnóstico das Micoplasmoses Aviárias por *Mycoplasma gallisepticum* (MG) e *M. synoviae* (MS) e, mais recentemente, analisando a associação entre eles e também com os principais agentes bacterianos e virais em galinhas de postura, industriais e caipiras, que apresentam Doença Respiratória Recorrente. Já detectamos a associação entre MG e MS, e de MS e outros micoplasmas, *Avibacterium paragallinarum*, *Ornithobacterium rhinotracheale*, Metapneumovírus aviário, e Vírus da Bronquite Infecciosa e investiga-se, também, com a Laringotraqueíte Infecciosa. O estudo epidemiológico da circulação desses agentes e o entendimento dessas associações visam fornecer subsídios para a adoção de medidas eficazes de tratamento e controle no combate a estas doenças.

### **Dentre os microrganismos importantes em Sanidade Avícola, podemos destacar então os Micoplasmas, as Salmonelas, e alguns vírus, como o da Doença de Newcastle. Todos esses agentes têm prioridade na abordagem do Programa Nacional de Sanidade Avícola do MAPA. Atualize-nos sobre a situação sanitária dos plantéis fluminenses em relação a essas enfermidades.**

No estado do Rio de Janeiro, a Avicultura Industrial tem uma produção expressiva de frangos de corte, mas reduzida em relação às poedeiras comerciais, além de muitas pequenas criações de galinhas caipiras. Agentes de doenças como a Micoplasmose, a Salmonelose, e a Doença de Newcastle, tem prioridade na abordagem do Programa Nacional de Sanidade Avícola, e seus monitoramentos e controles são fundamentais para a produção e a comercialização avícola, por interferirem na eficiência produtiva e depreciação da qualidade dos produtos para consumo. A Avicultura Fluminense tem se mostrado de ótima qualidade sanitária, nestes últimos 15 anos de acompanhamento. Alguns casos isolados de doenças como Doença de Marek, Candidiase, Cocidiose, e outras de menor importância, têm sido diagnosticados em pequenas criações, mas não há relatos de identificação positiva de Laringotraqueíte Aviária em lotes de poedeiras, mesmo quando havia surtos sendo notificados nos estados vizinhos como SP, MG e ES. A Doença de Newcastle é controlada no RJ com vacinação e não houve casos de Salmoneloses notificados. Há 20 anos ocorreram surtos da Doença de Gumboro (ou Doença Infecciosa da Bolsa de Fabrício) em frangos de corte, mas desde então a doença tem sido controlada com a vacinação e a melhoria na

biossegurança das granjas. Acredito que a avicultura industrial do RJ não deixa a desejar quando comparada a dos outros estados da Federação. A realização de palestras, de treinamentos, e a orientação técnica também favorecem a produtividade com a melhoria na qualidade do produto, o aumento no rendimento familiar, a fixação do homem ao meio rural, a melhoria das condições sanitárias das criações animais, e a segurança alimentar aos consumidores, favorecendo, assim, toda a cadeia produtiva e o agronegócio.

### **O NUDIAV-UFF tem organizado eventos técnico-científicos no estado do RJ com foco em Sanidade Avícola. Conte-nos os principais resultados obtidos com essa iniciativa.**

O NUDIAV-UFF participou por quatro anos da organização e realização de eventos técnicos em parceria com Associação dos Produtores de São José do Vale do Rio Preto (AVIVALE), com a Associação Fluminense de Aves e Suínos (AFLAS), e com outras instituições de ensino como o IF-Pinheiral, a UFRRJ e a UENF. Colabora, também, como membro do Comitê Estadual de Sanidade Avícola do Rio de Janeiro (COESA-RJ), contribuindo para a atualização profissional dos envolvidos com Avicultura no estado do RJ, e para a implantação e execução dos programas oficiais de Educação Continuada e da Defesa Sanitária Estadual. Como resultado desse esforço, podemos ressaltar uma maior integração entre os produtores e o atuante Serviço Oficial de Defesa Sanitária, um maior engajamento e conscientização do Setor Avícola com as questões sanitárias, além da maior adesão dos produtores. A participação ativa nos eventos nos últimos dois anos ficou comprovada, tendo sido organizados e realizados pela AFLAS um maior número de parcerias, desde 2017, efetivando-se um excelente trabalho ao manter e desenvolver cada vez mais o Setor Avícola Fluminense. O NUDIAV-UFF também tem contribuído com a difusão de informações técnicas sobre Sanidade Avícola, atendendo aos convites para proferir palestras e divulgar os resultados deste trabalho em eventos em outros estados, como a “Festa do Ovo”, em Bastos, SP; o “Congresso de Comercialização e Produção de Ovos”, em Ribeirão Preto, SP; o “Simpósio de Atualização em Postura Comercial”, em Jaboticabal, SP; e o “I Simpósio de Especialidades Veterinárias do Amazonas”, em Manaus, AM.

### **O aumento da resistência das bactérias aos antimicrobianos é um problema mundial de Saúde Pública. Como a equipe do NUDIAV-UFF vem pesquisando esse assunto?**

A resistência bacteriana aos antimicrobianos tornou-se, durante as últimas décadas, numa questão maior de interesse público e científico. *Salmonella* spp. e *Campylobacter* spp. são gêneros de bactérias cuja importância reside no risco potencial de causar doenças graves em humanos veiculadas por alimentos contaminados, onde os produtos avícolas são considerados como a fonte mais importante em todo o mundo. *E. coli*, também é relevante neste contexto, e mais ainda por ser a bactéria com maior importância na transmissão de genes de resistência entre cepas e para outros gêneros de bactérias. O estudo da resistência antimicrobiana às fluoroquinolonas e cefalosporinas nessas bactérias, isoladas de aves de produção e de seus produtos derivados, reside no fato de que esses medicamentos têm sido amplamente utilizados na Avicultura Industrial, e fazem parte, também, das drogas de escolha para o tratamento das infecções no homem, nos casos em que há a necessidade desse tratamento. Assim sendo, a equipe do NUDIAV-UFF vem avaliando o perfil de resistência antimicrobiana de cepas de *Salmonella* spp, de *Campylobacter* spp, e de *E. coli*, isoladas de frangos de corte e de produtos derivados (carcaças e cortes), pelo Método de Difusão em Disco, da Concentração Inibitória Mínima e da presença de determinantes genéticos dessa resistência por PCR. Na avaliação dessas análises tem-se encontrado resultados muito interessantes de presença de cepas multirresistentes, o que é muito preocupante porque demonstram o avanço da resistência bacteriana a uma gama cada vez maior de medicamentos, e, em consequência, há limitação crescente nos tratamentos a essas infecções, além do aumento da possibilidade de transmissão dessa resistência a outras bactérias que coabitam aqueles ambientes.

### **Relate-nos os principais estudos que o NUDIAV-UFF tem realizado com cepas de *Salmonella* spp. isoladas de plantéis de aves de corte.**

A qualidade microbiológica dos alimentos ingeridos pela população é um aspecto crucial para a Saúde Pública. Cepas microbianas emergentes isoladas de frangos podem representar um risco à Saúde Pública devido à ocorrência de toxinfecções ocasionadas pelo consumo de produtos contaminados. Como alguns microrganismos podem sobreviver por longos períodos no ambiente, os animais portadores constituem uma fonte de infecção, tanto para outros animais quanto para os humanos. Os produtos de origem avícola têm sido os mais comumente relacionados a surtos de Salmonelose em humanos, e o controle desta bactéria é de extrema importância para a competição no mercado externo, que apresenta uma crescente exigência em relação à qualidade sanitária.

Nas contribuições para a caracterização e controle de *Salmonellas*, diversas ferramentas biomoleculares têm sido utilizadas. Dentre elas, a Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE) é considerada a “técnica padrão ouro de subtipagem” de *Salmonella* e adotada pela rede de pesquisa CDC/Pulsenet. Desde 2015, a equipe do NUDIAV-UFF vem avaliando, através de PFGE, em parceria com o Laboratório de Enterobactérias do IOC/FIOCRUZ, os clones de *Salmonella* spp. circulantes em frangos de corte, nas carcaças, e comparando-as, também, com aquelas de origem em animais silvestres e de surtos em humanos, para avaliar a sua dispersão e o seu envolvimento na ocorrência da doença no consumidor final. Também temos estudado o perfil genético de resistência antimicrobiana e de virulência dessas cepas, para melhor entendimento da sua patogenicidade e da dificuldade de tratamento em animais e humanos.

Acompanha-se o aumento de prevalência de *Salmonella* serovar Heidelberg nos plantéis de frangos e em carcaças, em várias regiões produtoras no Brasil, e investiga-se este sorotipo, e a sua circulação. Investigou-se a resistência de várias cepas de *Salmonella* Minnesota e *Salmonella* Heidelberg isoladas de frangos e carcaças pelo Teste de Difusão em Disco e pela detecção dos genes de resistência blaCTX-M-8, blaACC-1 e blaCMY-2 por PCR. Dentre as cepas testadas, 80% eram resistentes a pelo menos um antibiótico. Especificamente, 66,7% eram resistentes à amoxicilina / ácido clavulânico e 75% eram resistentes à cefotaxima. Entre as cepas resistentes à amoxicilina / ácido clavulânico, o gene blaCMY-2 foi detectado em 40%, blaACC-1 em 37,5%, e blaCTX-M-8 em 7,5%. Entre as cepas resistentes à cefotaxima, detectou-se os genes blaCTX-M-8 em 13,3%, blaACC-1 em 33,3% e blaCMY-2 em 31,1%.

A presença de *Salmonella* resistente à cefotaxima e à amoxicilina / ácido clavulânico em frangos de corte e a prevalência de betalactamases de espectro estendido e de AmpC-betalactamases nessas cepas são de grande preocupação para a Saúde Pública e para a produção avícola.

Em outro estudo, cepas de *Salmonella* spp. isoladas de carcaças e de frangos vivos (suabes de cloaca), provenientes de abatedouros frigoríficos sob Inspeção Federal foram sorotipificadas como *Salmonella* Saint Paul (29), *Salmonella* Heidelberg (27), *Salmonella* Anatum (9), *Salmonella* Cerro (5), *Salmonella* Senftenberg (5), *Salmonella* enterica (O: 4,5) (1) e *Salmonella* enterica (O: 9,12) (1), e submetidas ao Teste de Difusão em Disco para a avaliação da resistência frente aos antimicrobianos enrofloxacin, ciprofloxacina e ácido nalidíxico. O sorotipo Heidelberg foi o de maior frequência de resistência às quinolonas testadas.

Foram selecionadas algumas cepas resistentes para detecção dos genes *gyrA*, *gyrB*, *parC* e *parE* pela PCR e para sequenciamento genético visando à identificação de mutações nesses genes. As cepas analisadas apresentaram mutações pontuais no gene *gyrA* ou no gene *parC*. Nenhuma apresentou mais de uma mutação no gene *gyrA* ou nos outros genes.

A existência apenas de mutações pontuais em alguns genes das cepas analisadas explica a resistência fenotípica observada ao ácido nalidíxico, mas não às fluoroquinolonas. Então, supõe-se que outros mecanismos de resistência podem estar relacionados à resistência encontrada às fluoroquinolonas, e que estudos adicionais são necessários para investigar a existência desses outros mecanismos.

Todos esses estudos relatados continuam em andamento e há novas investigações sendo conduzidas, também, em relação à resistência à colistina.

### **Que outras pesquisas estão sendo realizadas para determinar o perfil genético de cepas de microrganismos e resistência antimicrobiana?**

Para os estudos filogenéticos com *Salmonella* spp. tem-se trabalhado com PFGE e para o estudo do perfil genético de resistência das cepas, utilizamos PCR convencional aliada ao sequenciamento. Mas como disse anteriormente, há particular interesse no estudo dos Micoplasmas Aviários, e dedica-se ao estudo da identidade genética das cepas em circulação nas granjas avícolas industriais, caipiras e em outros criatórios de aves, bem como em aves silvestres. Para esses estudos se utiliza de técnicas biomoleculares como PCR, Nested-PCR, sequenciamento e alinhamento dos produtos para comparação entre cepas. Sabe-se que nas aves industriais, o *Mycoplasma gallisepticum* (MG) está sob controle, e que nas poedeiras comerciais, a vacinação com vacina viva tem auxiliado para reduzir o surgimento de casos. Entretanto, *Mycoplasma synoviae* (MS) tem sido encontrado em alta prevalência, e suspeita-se que está favorecendo outras infecções respiratórias concomitantes. Também se estuda a resistência antimicrobiana pela técnica de Concentração Inibitória Mínima, e ainda pretende-se seguir com as análises de detecção de genes de resistência. Alguns resultados serão publicados em breve e outros serão apresentados em congressos em 2020, como no “American Veterinary Medical Association Convention 2020”.

### **Quais as perspectivas de trabalho do NUDIAV-UFF para os próximos anos?**

As perspectivas do NUDIAV-UFF para os próximos anos são de muito trabalho e desafios. Não há, em todo o estado do Rio de Janeiro, laboratórios exclusivos para atender às demandas do Setor Avícola Fluminense, o que nos obriga a enviar

o material biológico para análise em laboratórios localizados nos estados de Minas Gerais e São Paulo. A situação no estado do Espírito Santo é a mesma que temos aqui, apesar de ser o terceiro estado maior produtor de ovos do país. Visando garantir a saúde das aves e a qualidade dos produtos avícolas, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil definiu um Programa de Gestão de Risco Diferenciado. Ele está baseado em Vigilância Epidemiológica por monitoramento laboratorial e adoção de vacinas, para os estabelecimentos avícolas considerados de maior susceptibilidade à introdução e disseminação de agentes patogênicos no plantel avícola nacional, bem como para estabelecimentos avícolas que exerçam atividades que necessitam de um maior rigor sanitário. Uma das expectativas para o futuro seria a adequação do NUDIAV-UFF em atendimento à ABNT NBR ISO/IEC 17025, para a melhoria e garantia dos resultados no monitoramento sanitário e no diagnóstico de doenças em criações avícolas. Dessa forma, será possível a manutenção da saúde dos animais e a garantia da segurança no consumo de seus produtos, bem como consolidará a atividade econômica nas regiões atendidas, fixando o produtor ao meio rural. Mas para que isso seja implantado precisaremos do apoio da gestão da Universidade e também dos órgãos de fomento. Pretende-se, ainda, ampliar o diagnóstico de doenças para atender aos proprietários de aves domesticadas e selvagens, às clínicas veterinárias, aos Hospitais Escola, e aos centros de triagem, e com essa abordagem mais ampla garantir a saúde dos animais e dos humanos que coabitam num mesmo ambiente.