

Foto: Iara M. Trevisol/Embrapa



## Infetividade de Micro-Organismos em Cama de Frangos de Corte Submetida a Diferentes Tratamentos

Clarissa Silveira Luiz Vaz<sup>1</sup>  
Daiane Voss-Rech<sup>2</sup>  
Iara Maria Trevisol<sup>3</sup>  
Liana Brentano<sup>4</sup>  
Raquel Rebelatto<sup>5</sup>  
Cintia Hiromi Okino<sup>6</sup>  
Marcos Antônio Zanella Morés<sup>7</sup>  
Fátima Regina Ferreira Jaenisch<sup>8</sup>  
Arlei Coldebella<sup>9</sup>  
Virgínia Santiago Silva<sup>10</sup>

### Introdução

A avicultura de corte está pautada na sustentabilidade econômica da atividade e na manutenção do *status* sanitário do plantel nacional. A reutilização da cama aviária entre lotes de frangos é um fator importante na viabilidade da produção e na redução de seu impacto ambiental, devendo ser respaldada pela adoção de procedimentos sanitários adequados à atividade avícola. O reúso da cama aviária nos estabelecimentos comerciais de corte é previsto desde que episódios de maior impacto ao plantel avícola e de interesse para a saúde pública estejam ausentes nos lotes. Todavia, na ocorrência de episódios sanitários, a cama deve passar por tratamento capaz de inativar agentes residuais de doenças antes de sua retirada

do aviário (BRASIL, 2007). O estudo conduzido anteriormente pela Embrapa Suínos e Aves e seus parceiros demonstrou que os tratamentos de cama aviária mais comumente usados no Brasil são efetivos na eliminação de *Salmonella* Enteritidis, como também reduzem o nível de enterobactérias totais e mesófilos aeróbicos (VAZ et al., 2017). No entanto, outras salmonelas paratíficas, como *S. Heidelberg*, vêm sendo relatadas com mais frequência na avicultura de corte (VOSS-RECH et al., 2015) e parecem demonstrar uma especial habilidade de persistir no ambiente avícola.

Além disso, a Doença de Newcastle e a Influenza Aviária (IA) são enfermidades virais altamente contagiosas, cuja prevenção e controle estão contempla-

<sup>1</sup>Médica Veterinária, doutora em Ciências Veterinárias, pesquisadora da Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, SC

<sup>2</sup>Bióloga, mestre em Medicina Veterinária, analista da Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, SC

<sup>3</sup>Médica Veterinária, mestre em Ciências Veterinárias, pesquisadora da Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, SC

<sup>4</sup>Médica Veterinária, doutora em Medicina Veterinária, pesquisadora da Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, SC

<sup>5</sup>Farmacêutica, especialista em Microbiologia, analista da Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, SC

<sup>6</sup>Médica Veterinária, doutora em Patologia Animal, analista da Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP

<sup>7</sup>Médico Veterinário, mestre em Ciências Veterinárias, analista da Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, SC

<sup>8</sup>Médica Veterinária, mestre em Patologia Animal, pesquisadora da Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, SC

<sup>9</sup>Médico Veterinário, doutor em Ciência Animal e Pastagens, pesquisador da Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, SC

<sup>10</sup>Médica Veterinária, doutora em Epidemiologia, pesquisadora da Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, SC

dos no Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). O manejo preventivo e o eventual contingenciamento desses vírus na produção avícola incluem a sua inativação na cama aviária usando método com comprovação científica. Por razões de biossegurança, a experimentação com cepas virulentas do vírus da Doença de Newcastle (VDNC) e da IA é restrita, mas é possível estabelecer relações biológicas utilizando-se modelo experimental vacinal, já que as propriedades físico-químicas são semelhantes. Nesse contexto, o vírus da Doença Infecciosa da Bursa (VDIB) ou Doença de Gumboro, que é endêmico na avicultura e muito resistente ao ambiente, apresenta características desejáveis ao uso como modelo viral; podendo ser indicador do efeito do tratamento na cama aviária (GUAN et al., 2010).

O tratamento da cama aviária pode causar danos aos micro-organismos residuais, prejudicando sua detecção direta. Ainda assim, tais micro-organismos podem preservar a capacidade de multiplicação quando houver condições favoráveis, como, por exemplo, frente a um novo hospedeiro (ISLAM et al., 2013). Sendo assim, a detecção direta de micro-organismos residuais associada ao uso de aves sentinelas é uma estratégia a ser considerada na avaliação do tratamento da cama aviária. Essa pesquisa avaliou o efeito de tratamentos de cama aviária na viabilidade do VDIB, VDNC e S. Heidelberg, associando um bioensaio com aves sentinelas para determinar a infectividade residual desses agentes.

## Pesquisa desenvolvida

As aves utilizadas nesse estudo foram tratadas seguindo os princípios de ética e bem-estar animal aprovados no protocolo 003/2015 da Comissão de Ética no Uso de Animais da Embrapa Suínos e Aves. Cama aviária reutilizada por seis lotes de frangos de corte que não apresentaram problemas sanitários foi transportada às instalações experimentais da Embrapa Suínos e Aves, e apresentou resultado negativo para *Salmonella* spp., VDIB e VDNC. Em seguida, a cama aviária foi distribuída em 16 boxes experimentais (2 m<sup>2</sup>) em volume suficiente para obter 10 cm de altura. A seguir, foi realizada a contaminação viral por meio de pintos SPF com 10 dias de idade, inoculados com VDIB (10<sup>5,7</sup>DIE<sub>50</sub>, cepa vacinal atenuada intermediária) e VDNC (10<sup>6,6</sup>DIE<sub>50</sub>, cepa vacinal

atenuada La Sota) e que foram alojados sobre a cama aviária em cada box (10 pintos/m<sup>2</sup>). Após seis dias, os pintos foram retirados e um cultivo de S. Heidelberg isolada de campo (VOSS-RECH et al., 2015) foi aspergido sobre a cama aviária (1,6x10<sup>9</sup> UFC/m<sup>2</sup>). A seguir (dia 0), a cama foi submetida aos seguintes tratamentos experimentais, cada qual executado em salas individuais e com quatro repetições, durante 14 dias:

### Fermentação plana (T1)

A cama aviária em cada box experimental foi umedecida com água (1,5 L/m<sup>2</sup>) e coberta em toda sua extensão com lona plástica impermeável de 200 µm (Figura 1). As extremidades da lona foram inseridas sob a camada de cama aviária para impedir a troca de gases com o ambiente. No dia 12, a lona foi removida e a cama foi mantida em repouso até o dia 14.



Foto: Clarissa S. L. Vaz/Embrapa

Figura 1. Fermentação plana da cama aviária.

### Adição de cal (T2)

A cama aviária foi mantida em repouso até o dia 12, quando foi acrescida de 600 g/m<sup>2</sup> de cal (CaO) e revolvida para homogeneização do produto (Figura 2), permanecendo em repouso até o dia 14.

### Fermentação plana seguida de adição de cal (T3)

A cama aviária foi manejada conforme descrito em T1. Após a retirada da lona no dia 12, foram adicionados 600 g/m<sup>2</sup> de cal (CaO), que foi homogeneizada na cama aviária por meio de revolvimento, permanecendo em repouso até o dia 14.

Foto: Clarissa S. L. Vaz/Embrapa



Figura 2. Adição de cal à cama aviária.

### Controle positivo (T4)

A cama aviária foi mantida em repouso, sem intervenção, durante os 14 dias de tratamento.

### Controle negativo (T5)

Composto de cama aviária nova e não contaminada, com o objetivo de detectar eventual contaminação cruzada entre os tratamentos durante o período de avaliação.

Amostras de cama aviária de todos os tratamentos foram colhidas nos dias 0, 6, 12 e 14; sendo submetidas ao isolamento de *Salmonella* spp., quantificação de enterobactérias totais, medida de pH, matéria seca e teor de amônia. A temperatura da cama aviária foi medida ao longo de todos os tratamentos a cada duas horas. Imediatamente ao término do período de tratamento, foram alojados pintos sentinela SPF com três dias de idade (5 pintos/m<sup>2</sup>) sobre a cama aviária de todos os tratamentos. As aves foram monitoradas diariamente quanto à manifestação de sinais clínicos de enfermidades ou mortalidade. Amostras individuais foram colhidas de todas as aves na 1<sup>a</sup> e na 3<sup>a</sup> semana de alojamento, sendo submetidas à pesquisa do RNA viral pelo método de RT-qPCR para detecção de VDIB (suabes de cloaca) e VDNC (suabes de traqueia); e ao isolamento de *Salmonella* spp. (suabes de cloaca). Na 5<sup>a</sup> semana de alojamento, as aves foram eutanasiadas, sendo colhidos suabes de cloaca e de traqueia para análise por RT-qPCR de VDIB e de VDNC, respectivamente; fígado, baço e tonsilas cecais para isolamento de *Salmonella* spp.; e sangue para detecção de anticorpos contra VDIB e de VDNC no soro por meio de ELISA (VOSS-RECH et al., 2017). Os dados foram analisados utilizando-se

a teoria de modelos mistos para medidas repetidas e 15 tipos de estruturas de matriz de variâncias e covariâncias, usando o PROC MIXED do SAS. O desdobramento do efeito de tratamentos foi realizado através do teste t protegido, sempre que o teste F detectou efeito significativo ( $p \leq 0,05$ ) de tratamento.

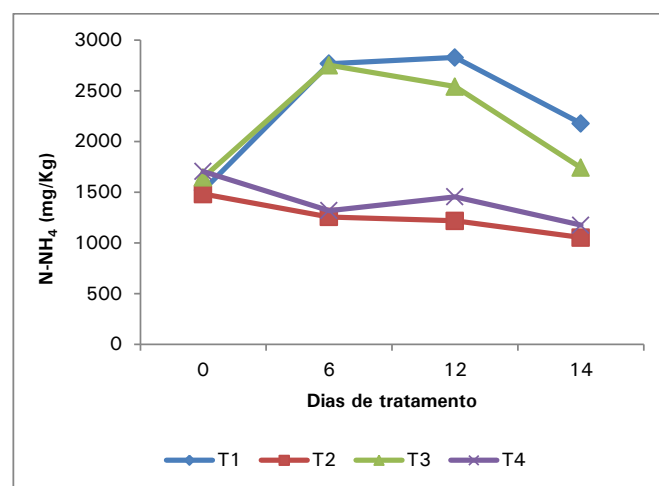
## Resultados

### Contaminação experimental da cama aviária

A contaminação da cama aviária antes dos tratamentos foi comprovada por detecção da replicação viral do VDIB e VDNC nos pintos inoculados e pelo isolamento de *S. Heidelberg* na cama aviária.

### Efeito do tratamento sobre cama aviária contaminada

A Tabela 1 apresenta os resultados observados na cama aviária ao longo do período de tratamento. Ao final do período de avaliação, o T1 resultou em menores níveis de enterobactérias totais na cama, diferindo significativamente dos T2 e T4. A partir do sexto dia, T1 e T3 apresentaram concentrações significativamente maiores de amônia que os demais tratamentos (Figura 3). *S. Heidelberg* foi detectada na cama aviária em T1, T2, T3 e T4 em todos os dias de avaliação.



T1: Fermentação plana; T2: Adição de cal; T3: Fermentação plana seguida de adição de cal; T4: Controle positivo.

Figura 3. Níveis de amônia (N-NH<sub>4</sub>) na cama aviária ao longo do período de tratamento.



**Tabela 1.** Médias e erros-padrão das variáveis medidas na cama aviária reutilizada em função dos tratamentos e do tempo de tratamento.

Tempo de tratamento (dias)	Tratamento*				Pr > F
	T1	T2	T3	T4	
<b>Enterobactérias totais (log<sub>10</sub> UFC/g)</b>					
0	5,662 ± 0,210	5,091 ± 0,427	5,864 ± 0,150	5,005 ± 0,146	0,2747
6	4,096 ± 0,429	4,875 ± 0,217	5,106 ± 0,321	4,919 ± 0,260	0,2289
12	4,469 ± 0,309	4,062 ± 0,597	4,898 ± 0,304	4,742 ± 0,139	0,3981
14	3,435 ± 0,254 a	4,921 ± 0,430 b	4,375 ± 0,256 ab	5,282 ± 0,735 b	0,0060
<b>Matéria seca (%)</b>					
0	73,10 ± 0,66 b	79,52 ± 0,38 a	73,24 ± 0,70 b	78,91 ± 0,51 a	<0,0001
6	72,16 ± 0,73 b	82,94 ± 0,44 a	71,57 ± 0,97 b	82,68 ± 0,25 a	<0,0001
12	73,96 ± 0,65 b	82,45 ± 0,33 a	73,61 ± 0,46 b	81,13 ± 0,38 a	<0,0001
14	74,33 ± 0,26 c	81,86 ± 0,35 a	74,96 ± 0,37 c	80,87 ± 0,27 b	<0,0001
<b>Teor de amônia (mg/Kg)</b>					
0	1520 ± 60 bc	1483 ± 60 c	1646 ± 47 ab	1705 ± 52 a	0,0221
6	2767 ± 170 a	1256 ± 68 b	2751 ± 176 a	1319 ± 68 b	<0,0001
12	2828 ± 163 a	1218 ± 25 b	2541 ± 122 a	1455 ± 106 b	<0,0001
14	2178 ± 94 a	1053 ± 25 c	1742 ± 127 b	1175 ± 26 c	<0,0001
<b>Temperatura (°C)**</b>					
0	21,40 ± 0,23 a	20,80 ± 0,11 b	21,37 ± 0,13 a	19,93 ± 0,21 c	0,0002
6	19,38 ± 0,37 a	17,07 ± 0,20 b	19,47 ± 0,33 a	15,46 ± 0,62 c	<0,0001
12	18,17 ± 0,26 a	17,03 ± 0,22 b	18,67 ± 0,28 a	15,55 ± 0,42 c	<0,0001
14	19,09 ± 0,22 a	18,98 ± 0,26 a	19,48 ± 0,18 a	17,48 ± 0,31 b	0,0005
<b>pH</b>					
0	8,690 ± 0,026	8,558 ± 0,046	8,545 ± 0,027	8,563 ± 0,060	0,1901
6	8,693 ± 0,095	8,593 ± 0,027	8,695 ± 0,057	8,585 ± 0,043	0,2776
12	8,858 ± 0,013 c	10,01 ± 0,06 a	9,423 ± 0,067 b	8,530 ± 0,052 d	<0,0001
14	8,825 ± 0,009 b	9,275 ± 0,063 a	9,303 ± 0,036 a	8,488 ± 0,074 c	<0,0001

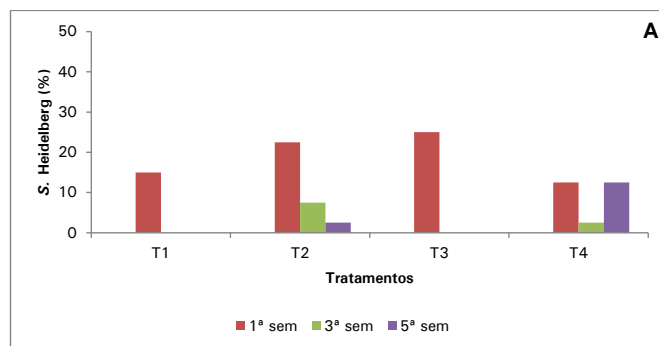
\*T1: Fermentação plana; T2: Adição de cal; T3: Fermentação plana seguida de adição de cal; T4: Controle positivo.

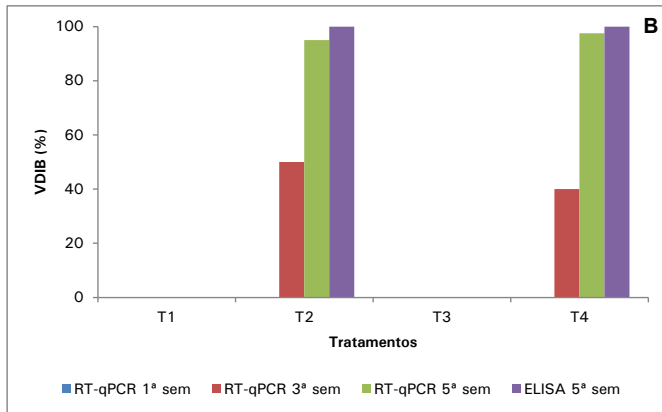
\*\*Média das 12 leituras diárias realizadas em cada tratamento.

Médias seguidas por letras distintas nas linhas diferem significativamente pelo teste t ( $p \leq 0,05$ ).

### Avaliação das aves sentinelas alojadas sobre cama aviária tratada

Os pintos SPF sentinelas alojados sobre a cama aviária após os tratamentos não apresentaram sinais clínicos de enfermidade ou mortalidade. A Figura 4 apresenta os percentuais de aves sentinelas positivas para *S. Heidelberg* (A) e VDIB (B) durante o alojamento sobre a cama aviária submetida aos tratamentos. As aves sentinelas testadas para o VDNC não apresentaram soroconversão, sendo também negativas nas análises de RT-qPCR em todos os tratamentos. As aves sentinelas alojadas sobre a cama aviária do T5 permaneceram negativas para os agentes analisados durante todo o período experimental, confirmando que não ocorreu contaminação cruzada entre os tratamentos avaliados.





T1: Fermentação plana; T2: Adição de cal; T3: Fermentação plana seguida de adição de cal; T4: Controle positivo.

**Figura 4.** Frequência de aves sentinelas positivas para *Salmonella* Heidelberg pelo isolamento bacteriológico (A) e para o vírus da Doença Infecciosa da Bursa – VDIB por RT-qPCR e ELISA (B).

## Comentários

Os resultados observados nas aves sentinelas indicam que T1 e T3 inativaram o VDIB na cama aviária. No entanto, a partir da terceira semana de alojamento, o VDIB foi detectado nas aves do T2 e T4, indicando que o vírus residual permaneceu infectante na cama aviária submetida a esses tratamentos. Adicionalmente, o T1 apresentou menores níveis de enterobactérias totais ao final do tratamento quando comparado ao T3, proporcionando uma melhor qualidade microbiológica da cama aviária.

O teor de amônia detectado na cama aviária nos T1 e T3 foi maior a partir do 6º dia em relação aos demais tratamentos e essa maior concentração foi provavelmente associada ao efeito antimicrobiano observado. A cobertura com lona usada em ambos os tratamentos pode ter atuado como uma barreira impermeável que permitiu o acúmulo da amônia na cama. Por outro lado, a amplitude de temperatura observada nas 12 medidas diárias ao longo de todos os tratamentos (12,6 - 25,1°C; dados não apresentados) não atingiu níveis críticos para inativar os micro-organismos avaliados. A umidificação da cama aviária em T1 e T3 antes da cobertura com lona resultou em menores níveis de matéria seca e, apesar disso, estes tratamentos foram mais efetivos na redução de enterobactérias totais e na inativação do VDIB. Por outro lado, houve aumento dos valores de pH no dia 12, após a adição da cal virgem, em T2 e T3. Entretanto, esse aumento não foi associado à redução dos micro-organismos avaliados.

As aves sentinelas alojadas sobre a cama aviária de todos os grupos experimentais apresentaram resultado negativo para o VDIB nos testes de ELISA e RT-qPCR, indicando que o vírus não foi capaz de sobreviver na cama aviária, independente do tratamento avaliado. Houve variação na porcentagem de aves sentinelas positivas para *S. Heidelberg* no T1, T2, T3 e T4 ao longo do tempo de alojamento sobre a cama aviária. Contudo, nenhum dos tratamentos avaliados foi eficaz na eliminação de *S. Heidelberg* na cama aviária. A detecção de *S. Heidelberg* nas aves sentinelas demonstrou que a cama aviária contaminada é fonte potencial de infecção para o lote subsequente.

## Recomendações

A fermentação plana da cama de frangos antes do reúso entre lotes ou de sua retirada do aviário pode ser recomendada para inativar vírus com características de resistência equivalentes ao modelo usado nesse estudo.

Outras estratégias devem ser consideradas para o manejo da cama aviária contaminada por *S. Heidelberg*.

## Referências

- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº56, de 4 de dezembro de 2007. Estabelece os procedimentos para registro, fiscalização e controle de estabelecimentos avícolas de reprodução e comerciais. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 6 dez. 2007. Seção 1, p. 11.
- GUAN, J.; CHAN, M.; BROOKS, B. W.; SPENCER, J. L. Infectious bursal disease virus as a surrogate for studies on survival of various poultry viruses in compost. **Avian Diseases**, v. 54, p. 919-922, 2010.
- ISLAM, A. F. M. L.; WALKDEN-BROWN, S. W.; GROVES, P. J.; WELLS, B. Development of a chick bioassay for determination of infectivity of viral pathogens in poultry litter. **Australian Veterinary Journal**, v. 91, p. 65-71, 2013.

VAZ, C. S. L.; VOSS-RECH, D.; DE AVILA, V. S.; COLDEBELLA, A.; SILVA, V. S. Interventions to reduce the bacterial load in recycled broiler litter. **Poultry Science**, v. 96, p. 2587-2594, 2017.

VOSS-RECH, D.; TREVISOL, I. M.; BRENTANO, L.; SILVA, V. S.; REBELATTO, R.; JAENISCH, F. R. F.; OKINO, C. H.; MORÉS, M. A. Z.; COLDEBELLA, A.; BOTTON, S. A.; VAZ, C. S. L. Impact of treatments for recycled broiler litter on the viability and infectivity of microorganisms. **Veterinary Microbiology**, v. 203, p. 308-314, 2017.

VOSS-RECH, D.; VAZ, C. S. L.; ALVES, L.; COLDEBELLA, A.; LEÃO, J. A.; RODRIGUES, D. P.; BACK, A. A temporal study of Salmonella enterica serotypes from broiler farms in Brazil. **Poultry Science**, v. 94, p. 433-441, 2015.

### Comunicado Técnico, 546

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:

#### Embrapa Suínos e Aves

Endereço: BR 153, Km 110,  
Distrito de Tamanduá, Caixa Postal 321,  
89.715-899, Concórdia, SC  
Fone: 49 3441 0400  
Fax: 49 3441 0497  
[www.embrapa.br/fale-conosco/sac](http://www.embrapa.br/fale-conosco/sac)

MINISTÉRIO DA  
AGRICULTURA, PECUÁRIA  
E ABASTECIMENTO



1ª edição  
Versão Eletrônica: (2017)

### Comitê de Publicações

Presidente: *Marcelo Miele*

Membros: *Airton Kunz, Ana Paula A. Bastos, Gilberto S. Schmidt, Gustavo J.M.M. de Lima e Monalisa L. Pereira*  
Suplente: *Alexandre Matthiensen e Sabrina C. Duarte*

### Revisores Técnicos

*Cássio A. Wilbert, Marisa Macagnan e Paulo A. Esteves*

### Expediente

Coordenação editorial: *Tânia M.B. Celant*

Editoração eletrônica: *Vivian Fracasso*

Revisão gramatical: *Lucas S. Cardoso*

Normalização bibliográfica: *Cláudia A. Arrieche*