

### Inativação do *Mycobacterium Bovis* (espoligotipo sb1141) em creme de leite submetido a alguns parâmetros comerciais de pasteurização

*Mycobacterium bovis* (spoligotypesb1141) inactivation in whipping cream submitted to commercial pasteurization parameters

Rodrigues, L. A.<sup>1</sup>; Ferreira Neto, J.S.<sup>1</sup>; Ferreira, F.<sup>1</sup>; Amaku, M.<sup>1</sup>; Dias, R. A.<sup>1</sup>; Gonçalves, V. S. P.<sup>2</sup>; Souza, G. O.<sup>1</sup>; Telles, E. O.<sup>1</sup>

A resistência térmica dos microorganismos é influenciada pelas características do agente, do substrato e do teor de gordura, dentre outros fatores. Embora a pasteurização do creme de leite tenha como objetivo a eliminação de microorganismos patogênicos eventualmente presentes no leite, além de reduzir os deteriorantes, não há parâmetro legal de tempo e temperatura de processamento desse produto. O *Mycobacterium bovis* é considerado um dos patógenos não formadores de esporo de maior resistência térmica que pode normalmente ser transmitido pelo leite. Em decorrência das atividades do Plano Nacional de Controle e Erradicação da Tuberculose e Brucelose Bovina, têm-se vários isolados autóctones dessa espécie. Assim, este trabalho se propõe a avaliar a inativação de *Mycobacterium bovis* (espoligotipo SB1141 isolado de bovino abatido no Estado de São Paulo) em creme de leite fresco submetido a alguns parâmetros comerciais de pasteurização. Creme de leite pasteurizado foi obtido no mercado, contaminado e submetido ao tratamento térmico em banho-maria a 75° C, 80° C, 85° C e 90° C, por 5 e 15 segundos. O agente foi quantificado por semeadura das diversas diluições, em duplicata, em meio Stonebrink com incubação a 36°C/45 dias. A redução na população variou de 3,9 log UFC/mL até a 6,8 log UFC/mL o que mostra que, nas condições do estudo, todos os binômios estudados mostraram-se capazes de reduzir a carga contaminante para níveis tão baixos ou menores que 0,1 log UFC/mL, considerando a máxima contaminação inicial natural do leite por *M. bovis* (4 log UFC/mL), citada por Ball (1943).

Financiamento: CNPq/Mapa edital 64 e Fapesp (auxílio nº 2007/07595-9).

<sup>1</sup>Universidade de São Paulo, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87, CEP 05508-270, São Paulo, SP, Brasil.

E-mail: bufalo@usp.br

<sup>2</sup>Universidade de Brasília, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Brasília, DF, Brasil.

### Protocolo para estudos de sobrevivência do *Mycobacterium Bovis* em queijo parmesão

Protocol for study of *Mycobacterium bovis* surviving in parmesan cheese

Starikoff, K. R.<sup>1\*</sup>; Ferreira Neto, J. S.<sup>1</sup>; Ferreira, F.<sup>1</sup>; Amaku, M.<sup>1</sup>; Dias, R. A.<sup>1</sup>; Gonçalves, V. S. P.<sup>2</sup>; Souza, G. O.<sup>1</sup>; Telles, E. O.<sup>1</sup>

A legislação brasileira exige o uso de leite pasteurizado na fabricação de queijos, exceto se o produto tiver um período de cura superior a 60 dias. Porém, não há comprovação científica sólida de que o processo de maturação de queijos, por si só, seja suficiente para inviabilizar os patógenos eventualmente presentes no leite cru. Assim, este projeto se propõe a estabelecer um protocolo de estudo sobre o efeito do processo de cura na viabilidade do *Mycobacterium bovis* em queijo, que poderá ser utilizado para estudar o processo de cura de diferentes queijos sobre os diversos isolados autóctones que circulam no País, inclusive

outros patógenos. A escolha desse queijo para o estudo se deve ao fato de que, apesar de ser um queijo de cura longa (portanto pode ser fabricado com leite cru), observa-se no mercado a existência de produtos que apresentam características de cura curta, como a casca fina e massa macia, provenientes de empresas pequenas que dificilmente teriam condições de manter a produção de 60 dias em câmara de cura antes de colocar o produto no mercado. Dois queijos foram fabricados com leite experimentalmente contaminado com o espoligo tipo 1033 do *M. bovis* (6,0 log UFC/mL) e os queijos foram analisados semanalmente durante a cura a 18° C (dias 1, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56 e 63). As amostras foram submetidas à diluição decimal e seriada e semeadas em garrafas de cultivo celular contendo meio Stonebrink-Leslie adicionado de antibiótico e incubados a 36° C/45 dias. Os resultados mostraram uma redução média de 1,4 log UFC/g durante os 63 dias de cura (média foi de 5,5 log UFC/g no dia 1 e 4,1 log UFC/g no dia 63). Um terceiro queijo foi fabricado, mas os resultados foram perdidos porque houve grande crescimento de fungos no queijo, o que inviabilizou a análise, devido à deterioração do meio de cultura durante o período de incubação. Estão sendo realizados estudos com esses fungos, de forma a se conseguir alterar a fórmula do meio e reduzir a ocorrência dos danos causados por eles.

Financiamento: CNPq/Mapa edital 64

\*Bolsista: Capes – cota de curso.

<sup>1</sup>Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87, CEP 05508-270, São Paulo, SP, Brasil.  
E-mail: bufalo@usp.br

<sup>2</sup>Universidade de Brasília, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Brasília, DF, Brasil.

### Desenvolvimento e validação de um novo método para produção de maleína para diagnóstico de mormo

Development and validation of a new method for production of malein for the diagnosis of glanders

Reis, J.K.P.<sup>1</sup>; Leite, R.C.<sup>1</sup>; Carvalho Filho, M.B.<sup>2</sup>; Ramos, R.M.<sup>2</sup>; Machado, E.R.<sup>3</sup>

O mormo é uma doença de potencial zoonótico que acomete primariamente os equídeos. O agente causal do mormo é a bactéria *Burkholderia mallei*, um bastonete pequeno, gram-negativo, imóvel, intracelular facultativo. No Brasil, as normas para controle e erradicação do mormo preconizam o uso dos métodos de diagnóstico de fixação de complemento e o teste imunológico da maleína. A maleína atualmente utilizada no Brasil é importada e produzida com cepas exóticas de *B. mallei* a partir de uma adaptação da técnica utilizada para produção de tuberculina, resultando em um produto primariamente proteico, mas ainda pouco purificado. No projeto em tela, com o objetivo de aumentar a qualidade do reagente e a especificidade do teste, foi efetuada a purificação parcial de quatro lotes de maleína produzidos com cepas autógenas de *B. mallei*. A purificação do reagente visou a separação das frações proteicas de peso molecular acima de 350.000 Da, consideradas mais imunorreativas. Foi utilizado um concentrado proteico produzido pela precipitação do sobrenadante de culturas de *B. mallei* pela adição de ácido tricloroacético. O antígeno foi purificado em um sistema de filtração tangencial equipado com uma membrana de celulose regenerada com ponto de corte de 300.000 Da. A fração purificada foi caracterizada por SDS-PAGE e HPLC e apresentou possuir peso molecular na faixa de 660.000 Da. As maleínas experimentais tiveram sua potência testada frente a um padrão internacional pela inoculação de

equinos sensibilizados. A especificidade dos antígenos foi avaliada pela comparação das reações produzidas nos animais sensibilizados e nos controles negativos. As reações foram medidas pela diferença das leituras da dobra da pele, em milímetros, em cada ponto de inoculação, antes e 48 horas após a inoculação. As médias das reações produzidas pelas maleínas experimentais e pela maleína-padrão nos animais sensibilizados foram 6,82 mm e 3,15 mm, respectivamente. No grupo controle, a média das reações produzidas pelas maleínas experimentais foi 1,80 mm. O tratamento estatístico dos dados obtidos dos testes de potência e especificidade revelou que as maleínas experimentais são mais potentes que a maleína-padrão e não produzem reações inespecíficas.

Auxílio financeiro: SDA/Mapa/CNPq (Edital nº 64/2008).

<sup>1</sup>Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Laboratório de Retrovírus, Av. Antonio Carlos 6627, CEP 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brasil.

E-mail: jenner@ufmg.br

<sup>2</sup>Laboratório Nacional Agropecuário, Pedro Leopoldo, MG, Brasil.

<sup>3</sup>Instituto Mineiro de Agropecuária, Belo Horizonte, MG, Brasil.

### Utilização de inteligência artificial (redes neurais de inteligência artificial) para a classificação de patogenicidade de amostras de *Escherichia Coli* isoladas de frangos de corte

*Use of artificial intelligence (artificial neural networks) to classify the pathogenicity of Escherichia coli isolates from broilers*

Salle, C.T.P.<sup>1</sup>; Rocha, A.C.G.P.<sup>2</sup>; Souza, G.F.<sup>3</sup>; Salle, F.O.<sup>1\*</sup>; Moraes, L.B.<sup>1\*\*</sup>; Nascimento, V.P.<sup>1</sup>; Moraes, H.L.S.<sup>1</sup>

Os avanços nas pesquisas e nas ferramentas utilizadas vêm resultando no maior entendimento dos mecanismos de patogenicidade das *E. coli* e cada vez mais é demonstrada a grande importância da interação dos diversos fatores de virulência na determinação da patogenicidade. Entretanto, a diferenciação de cepas virulentas e avirulentas continua sendo um problema no diagnóstico e, por consequência, na tomada de decisão pelos veterinários de campo. Neste trabalho, são apresentadas três redes neurais de inteligência artificial que foram desenvolvidas por análise dos genes responsáveis pela capacidade de adesão, fimbria P (*papC*) e fimbria F11 (*felA*), produção de colicinas (*cvaC*), presença de aerobactina (*iutA*), resistência sérica (*iss*), hemaglutinina temperatura sensível (*tsh*) e presença dos antígenos capsulares K1 e K5 (*kpsII*), motilidade e do índice de patogenicidade (IP) para a predição ou classificação de patogenicidade de cepas de *E. coli* sem a necessidade da utilização de animais. Na Rede 1, utilizando 11 categorias de IP houve 54,27% de acerto. No intuito de melhorar o desempenho do modelo, foi criada uma segunda rede, utilizando três categorias de IP com classificação correta de 80,55%. Na tentativa de melhorar ainda mais seu desempenho, passou-se a trabalhar com apenas duas categorias, construindo, dessa forma, a Rede 3. Com essa nova configuração a classificação correta foi de 83,96%. As características do modelo permitem a classificação da patogenicidade das amostras isoladas nos galpões com bom grau de confiabilidade, levadas em conta a sensibilidade e a especificidade. Com esta metodologia a patogenicidade da amostra é conhecida sem a necessidade da inoculação de animais.

\*Bolsista de Pós-Doutorado, PPG-Cirurgia.

\*\*Bolsita CNPq, DTI 1.

Apoio Financeiro: Mapa/CNPq.

<sup>1</sup>Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia, Av. Bento Gonçalves, 8824, CEP 91540-000, Porto Alegre, RS, Brasil.

E-mail: ctps@ufrgs.br

<sup>2</sup>Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Coordenação Geral de Laboratório, Brasília, DF, Brasil.

<sup>3</sup>Diplomata Alimentos, Concórdia, SC, Brasil. Porto Alegre, RS, Brasil.

### Técnicas de identificação do Circovírus tipo 2 em suínos provenientes de granjas e matadouros do Estado de São Paulo, Brasil

*Techniques for the identification of Circovirus type 2 in swine from pig farms and slaughterhouse of the state of São Paulo, Brazil*

Martins, A.M.C.R.P.F.; Catroxo, M.H.B.; Bersano, J.G.; Ogata, R.

O Circovírus Suíno tipo-2 é o agente etiológico da síndrome multissistêmica do definhamento do leitão desmamado (SMDLD) ou da síndrome multissistêmica caquetizante pós-desmame. Tem sido relatado em vários países, associado ou não a achados patológicos. É uma doença emergente, que pode tornar-se um fator limitante para o desenvolvimento da suinocultura mundial, com mortalidade variando de 3% a 10%, podendo atingir 35%. O PCV-2 foi descrito, pela primeira vez, no Canadá em 1991, associado à síndrome de refugagem multissistêmica dos suínos, em animais sem sinais clínicos de enfermidade e em animais com síndrome de dermatite e nefropatia suína, distúrbios reprodutivos, síndrome do complexo respiratório suíno, pneumonia proliferativa e necrosante e tremor congênito. É um DNA vírus fita simples, não envelopado, com simetria icosaédrica, medindo de 15 a 17 nm de diâmetro e tendo a sua replicação favorecida por inibir a produção de interferon. Objetivando a detecção do PCV-2, em amostras teciduais, foram utilizadas as técnicas histopatológica, de contração negativa, de imunohistoquímica, de imunocitoquímica eletrônica (imunomarcagem com partículas de ouro coloidal em contração negativa), contribuindo para posteriores exames de rotina dessas viroses nos suínos e, portanto, colaborando com o agronegócio suínico nacional. Foram examinados 65 animais provenientes de várias cidades do Estado de São Paulo (Ibiúna, Jacarei, Pedra Bela, Franco da Rocha, Boituva, Descalvado, Embu-Guaçu e São José dos Campos). As lesões histológicas localizaram-se de forma regular nos tecidos linfóides (depleção linfocitária) (linfonodos, baço, tonsila, placas de Peyer) e pulmão, e de forma menos frequente no rim, fígado e outros tecidos. O achado relevante para o diagnóstico é a presença de células multinucleadas e inclusões basofílicas intracitoplasmáticas principalmente nos histiócitos, as quais são patognomônicas da doença. Cortes de tecidos positivos ou suspeitos pela histopatologia foram submetidos à imunohistoquímica, usando o anticorpo monoclonal. A reação antígenoanticorpo foi corada em marrom pelo DAB e visualizada em 12 animais dos 65 (18,46%) examinados. Em todos os órgãos, as células positivas foram encontradas nos infiltrados inflamatórios. Esses resultados foram confirmados pela técnica de contração negativa (preparação rápida) e de imunocitoquímica com marcação com ouro coloidal para microscopia eletrônica de transmissão, sendo visualizadas partículas de circovírus, não envelopadas, esféricas e isométricas, caracterizadas como partículas completas e vazias, medindo de 17 a 20 nm de diâmetro. A reação antígeno-anticorpo foi realizada pelas partículas de ouro coloidal. O exame coproparasitológico das fezes e alças intestinais apresentou resultados negativos. A IHQ e a imunocitoquímica foram muito sensíveis para detectar PCV-2. Como os animais eram portadores aparentemente são, fica um alerta sobre essa patologia emergente e limitante do desenvolvimento dos suínos.