

Dentre as clostridioses, as mionecroses são infecções necrosantes causadas por uma ou pela associação das seguintes bactérias do gênero *Clostridium*: *C. septicum*, *C. chauvoei*, *C. novyi* tipo A e *C. perfringens* tipo A e *C. sordellii*. Trata-se de uma doença que acarreta prejuízos significativos para a pecuária brasileira, devido à elevada taxa de letalidade. A imunohistoquímica (IHQ), uma importante alternativa para o diagnóstico dessas doenças, no País, permite a utilização de materiais fixados em formol, aumentando o prazo entre a coleta e processamento laboratorial, sem interferir na confiabilidade do diagnóstico. Além disso, essa técnica viabiliza o estudo epidemiológico da frequência dos clostrídios histotóxicos, auxiliando a indústria brasileira produtora de vacinas a adequar os imunógenos oferecidos. O objetivo deste trabalho foi padronizar uma IHQ para detecção de clostrídios histotóxicos e aplicá-la no diagnóstico etiológico, em um estudo retrospectivo. A padronização da IHQ foi realizada em tecidos obtidos de cobaios experimentalmente infectados com cepas de referência de *C. septicum*, *C. chauvoei*, *C. novyi* tipo A, *C. perfringens* tipo A e *C. sordellii*, por meio da técnica da estreptavidina e biotina marcada. O diagnóstico etiológico das mionecroses foi realizado em materiais de ruminantes enviados pela Escola de Veterinária, da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, MS. Foram analisadas amostras de 28 bovinos e de quatro ovinos que morreram entre os anos de 2000 e 2010, com sinais clínicos e histopatológicos compatíveis com mionecrose. A IHQ mostrou-se específica para a detecção dos clostrídios histotóxicos nos tecidos de cobaios experimentalmente infectados. No diagnóstico etiológico retrospectivo, *C. chauvoei* foi o agente mais frequente (73,3%), seguido por *C. perfringens* tipo A (53,3%), *C. septicum* (33,3%), *C. sordellii* (13,3%) e *C. novyi* tipo A (10%). Alterações autolíticas leves e moderadas foram encontradas em 25% (n = 8) e 6% (n = 2) dos casos, respectivamente. No entanto, as lesões histológicas associadas aos numerosos bacilos detectados pela IHQ possibilitaram o diagnóstico final. Diante de métodos como a IFD, a análise do estado de conservação do material recebido tende a ser limitada a uma avaliação macroscópica. Porém, a histologia associada à IHQ permite a determinação dos parâmetros que permitem uma maior confiabilidade no diagnóstico laboratorial das mionecroses. Embora *C. perfringens* tipo A seja incriminado como causador de gangrena gasosa em humanos, o mesmo é raramente descrito em ruminantes, sendo este o primeiro estudo que contemplou a análise da frequência de *C. perfringens* tipo A. Apesar de ter sido um dos mais frequentes causadores de gangrena gasosa, ele compõe apenas uma das vacinas comercializadas no País.

Apoio financeiro: CNPq, Fapemig e Capes.

<sup>1</sup>Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Av. Antonio Carlos, 6627, CEP 30123-970, Belo Horizonte, MG.

E-mail: flobato@vet.ufmg.br

<sup>2</sup>Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Belo Horizonte, MG, Brasil.

<sup>3</sup>Lanagro, Pedro Leopoldo, MG, Brasil. <sup>4</sup>Fundação Ezequiel Dias, Belo Horizonte, MG, Brasil.

### Ribotipagem automatizada e resistência antimicrobiana em amostras de *Salmonella* spp. isoladas do programa de redução de patógenos (PRP)

Automated ribotyping and antimicrobial resistance in samples of *Salmonella* spp. isolated of the pathogen reduction program (PRP)

Oliveira, V. G. S.<sup>1</sup>; Gaspari, M. V.<sup>1</sup>; Marques, F.<sup>1</sup>; Santos, A. dos<sup>2</sup>; Freitas, J. B.<sup>3</sup>; Pignatari, A. C. C.<sup>1</sup>

Infecções humanas causadas por *Salmonella* spp. são um importante problema de saúde pública. Dados norte-americanos estimam que anualmente são diagnosticados 1,4 milhões de novos casos, cerca de 17 mil hospitalizações e 585 mortes. Para cada caso confirmado pelo CDC, outros 38 não são reportados e 95% estão associados ao consumo de alimentos contaminados. A identificação dos sorotipos do gênero *Salmonella* é importante para a caracterização de surtos em infecções humanas e na cadeia epidemiológica relacionada a produtos alimentares. No Estado de São Paulo, o aumento no isolamento de *Salmonella enteritidis* tem sido observado desde 1993, em infecções de origem humana e não humana. Esse clone epidêmico isolado na década de 90 foi caracterizado como pertencente ao fagotipo PT-4 e a um único ribogrupo e a resistência aos antibióticos foi observada principalmente em isolados provenientes de pacientes hospitalizados. Para o tratamento de infecções humanas sérias por *Salmonella*, os antibióticos ciprofloxacina e ceftriaxona são os recomendados. Antibióticos como a enrofloxacin são utilizados em animais e podem estar relacionados ao desenvolvimento de resistência à ciprofloxacina, no tratamento de infecções humanas. A resistência aos agentes β-lactâmicos incluindo a terceira geração das cefalosporinas tem sido descrita em surtos de infecções hospitalares. O presente estudo foi desenhado para avaliar a resistência antimicrobiana e caracterizar os sorotipos de *Salmonella* spp. isolados do Programa de Redução de Patógenos (PRP) - Ministério da Agricultura do Brasil. No total, foram analisadas 1781 *Salmonella* spp. isoladas de frangos e perus de corte 2005-2009, de diferentes matadouros e laboratórios certificados. Os isolados foram testados pela técnica de disco-difusão contra os seguintes antibióticos: tetraciclina, ampicilina, sulfametoxazol/trimetoprim, ampicilina/sulbactam, enrofloxacin, ceftriaxona, gentamicina, cloranfenicol e ciprofloxacina. A tipagem molecular foi efetuada pela técnica de ribotipagem automatizada e os genes de resistência foram pesquisados pela reação em cadeia da polimerase nos isolados que apresentaram resistência fenotípica. Foram detectados 53 sorotipos diferentes e os mais prevalentes foram Enteritidis, seguido por Typhimurium e Schwarzengrund/Bredeney. Ribogrupos mais prevalentes foram: 202-S-1 e 205-S-5 nos sorotipos Enteritidis e Typhimurium respectivamente. Resistência aos antimicrobianos foi detectada na seguinte ordem decrescente: tetraciclina (22,23%), ampicilina (9,48%), sulfametoxazol/trimetoprim (5,78%), ampicilina/sulbactam (5,61%), enrofloxacin (4,88%), ceftriaxona (4,54%), gentamicina (4,15%), cloranfenicol (3,25%) e ciprofloxacina (0,50%). Entre os isolados resistentes à tetraciclina a predominância foi do gene *tetA*. Dentre os isolados resistentes à sulfa/trim e ao cloranfenicol a predominância foi dos genes *suh* e *qacEΔ1* respectivamente. Foram detectados os genes *qnr*, principalmente o *qnrB*, nos isolados resistentes à enrofloxacin. Para os isolados resistentes aos β-lactâmicos, foram detectados os genes *bla*TEM, *bla*SHV, *bla*CMY-1 e *bla*CMY-2. Já os genes *aac*6-1b, *bla*PSE, *bla*OXA, *catA*1 e *paspp*-flor-like não foram detectados.

<sup>1</sup>Universidade Federal de São Paulo, Laboratório Especial de Microbiologia Clínica, Rua Leandro Dupret, 188, CEP 04025-010, São Paulo, SP, Brasil.

E-mail: vinicius.sales@lemc.com.br

<sup>2</sup>Laboratório Nacional Agropecuário, Campinas, SP, Brasil.

<sup>3</sup>Coordenação Geral de Apoio Laboratorial, Brasília, DF, Brasil.

### Avaliação da dispersão de bezerras por rebanhos e atuação do projeto de apoio à saúde agropecuária (pasa) no índice de vacinação para brucelose bovina, norte de Minas Gerais, Brasil

Evaluation of calf distribution by herd and effectiveness of "Projeto de Apoio à Saúde Agropecuária (Pasa)" on vaccination level for bovine brucellosis on north of Minas Gerais, Brazil

Cardoso, D. L.<sup>1</sup>; Vieira, L. C.<sup>2</sup>; Rocha, C. M. B. M.<sup>3</sup>; Costa, G. M.<sup>3</sup>; Lucci, J.<sup>3\*</sup>

A vacinação obrigatória de fêmeas de três a oito meses é uma das principais ações do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) no Brasil. O Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA), com o apoio da Vallée, executa o Projeto de Apoio à Saúde Agropecuária (Pasa) desde 2002. Seu princípio é desenvolver metodologias educativas para promover a sanidade animal e consciência para sustentabilidade e saúde. O Pasa tem inovado na inclusão social, ocupação e renda de pequenos agricultores, fixando o homem no campo. Os Agentes de Saúde Agropecuária (ASA) realizam vacinações para buscar os índices acima de 80% recomendados pelo Ministério da Agricultura (Mapa). Com o objetivo de avaliar a relação entre os índices de vacinação e a distribuição de animais nos rebanhos e atuação do Pasa, pois a maior dispersão de animais em inúmeros rebanhos dificulta a ação de vacinação, foram coletados dados do cadastro do IMA de 1/1/2007 a 31/12/2007. Foram estudados 77 municípios do norte do Estado de Minas Gerais, desses 11 com o Pasa em funcionamento, a mais pobre região do Estado. É caracterizada por escassez de centros urbanos e profissionais autônomos, rebanhos com baixa tecnologia e baixa qualidade da terra. O clima é quente, beirando o semiárido, com longos períodos de estiagem. As análises foram efetuadas no SPSS 18.0. Foram retirados dados considerados “outliers”. Foi realizada a análise descritiva de todas as variáveis levantadas e calculadas a correlação de Pearson e regressão linear simples e múltipla considerando-se como variável dependente a “percentagem de vacinação” e como independentes a “presença/ausência do PASA” e a “% de rebanhos com mais de nove bezerras em idade 0-12 meses”. O nível de confiança utilizado foi de 95%. A média de vacinação foi de  $69,69 \pm 19,47$  e de “percentagem de rebanhos com mais de nove bezerras” foi de  $71,88 \pm 16,47$ , com correlação de 49,2% ( $p = 0,000$ ). A cada 1% que aumenta a concentração de “rebanhos maiores de nove bezerras” há um aumento de 0,581 na “% de vacinação”. “Rebanhos que possuem Pasa” têm em média 29,27% a mais de vacinação ( $IC_{23,95-34,59}$ ;  $p = 0,000$ ). Municípios sem Pasa têm média de vacinação de  $65,50 \pm 17,75$  e com  $94,77 \pm 5,02$ . No modelo múltiplo, os incrementos médios ajustados para “com Pasa” = 29,16 e a cada “% de rebanhos maiores” = 0,58 ( $p = 0,000$ ). Concluímos que é fundamental a presença do Pasa naqueles municípios em que há maior dispersão de bezerras.

\*Bolsista de Iniciação Científica, UFLA.

<sup>1</sup>Instituto Mineiro de Agropecuária, Praça Leopoldo Dias, 55, CEP 37260-000, Perdões, MG, Brasil.

E-mail: perdoes@ima.mg.gov.br

<sup>2</sup>Vallée, Montes Claros, MG, Brasil. <sup>3</sup>Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brasil.

### Contamination by mycotoxins in dairy production systems, Paraná State, Brazil\*

Contaminação por micotoxinas em sistemas de produção leiteira no Estado do Paraná, Brasil

Ramos, C. E. C. O.<sup>1</sup>; Santos, G. T.<sup>1</sup>; Damasceno, J. C.<sup>1</sup>; Kazama, R.<sup>2</sup>; Netto, D. P.<sup>3</sup>; Vieira, T. S. W. J.<sup>3</sup>

Aiming to identify and characterize milk and feeds contamination by mycotoxins it were monitored 96 milk farms in 2009/2010. The study was made in three regions of Paraná state, representatives of dairy production according

to report of Ipardes in 2009. Two kinds of data were collected: samples of feedstuff offered to herd, milk, water and in the other hand, production systems data, collected by a guided interview and questionnaire. Toxicology analysis was made according to methodology described by Soares e Rodriguez-Amaya for feedstuff and by ELISA immunoassay kit for aflatoxin M<sub>1</sub> – AFM<sub>1</sub> in milk. Comparison for regions and seasonal variation of contamination was analyzed by Generalized Linear Models – GLM. Data of milk contamination by mycotoxins and their sources were analyzed under path analysis method. Information collected by questionnaire was related to: storage process, type of feedstuff and supply period of these feeds. Contamination prevalence was 29.2% of all feed samples for mycotoxins. The main contamination by mycotoxins was related to corn and these byproducts ( $p < 0.05$ ), especially commercial concentrates. On the other hand, aflatoxins were predominant ( $p < 0.05$ ) over the other mycotoxins metabolites, overall the aflatoxin B<sub>1</sub> – AFB<sub>1</sub>. Milk contamination measured for AFM<sub>1</sub> presented seasonal variation ( $p < 0.05$ ), lower concentrations in rain periods and higher in dry periods. This can be explained for the increase of concentrates, silage and hay supply in dry period, due to restriction in the forage mass production. There was no effect for regions concerning to AFM<sub>1</sub> concentrations, but the range of variation was large, 0.12 to 1.20 µg/L. This shows that the Dairy Production Systems – DPS in farms are widely heterogeneous in terms of practices and this interference in contamination of dairy production by mycotoxins. The main source of milk contamination (AFM<sub>1</sub>) was the presence of metabolites of aflatoxins in feedstuff, independent of the feed source. Corn and those byproducts have weak direct effect in AFM<sub>1</sub> concentrations. This means that the contamination by aflatoxins is generalized among the feed sources and there is no one main source for contamination in analyzed feeds. The major direct effect on AFM<sub>1</sub> (0.51) was observed for AFB<sub>1</sub>, which is reinforced by information available in literature. AFB<sub>1</sub> is the major metabolic precursor of AFM<sub>1</sub>, in mammal's organisms. We conclude that aflatoxins are the main mycotoxins contaminants in feeds and it is widely spread in all studied regions. There is a seasonal variation in those concentrations in feed, consequently in AFM<sub>1</sub> milk levels.

\*This research was supported by CNPq/Mapa/SDA, announcement 64/2008 – line 2.

<sup>1</sup>Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, CEP 87020-900, Maringá, PR, Brasil.

E-mail: jaguaricarlos@gmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário Reitor “João David Ferreira Lima Trindade”, Florianópolis, SC, Brasil.

<sup>3</sup>Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil.

### Detection of pathogens of *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae) in honey with multiplex PCR and its use in Brazilian samples\*

Detecção de patógenos de *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae) em mel com PCR multiplex e seu uso em amostras brasileiras

Puker, A.<sup>1\*\*</sup>; Teixeira, É. W.<sup>2</sup>; de Paula, S. O.<sup>3</sup>; Pinto, F. A.<sup>1</sup>; Silva, I. C.<sup>4\*\*\*</sup>; Santana, W. C.<sup>5</sup>; Message, D.<sup>1\*\*\*\*</sup>

Several pathogens attack the bees *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) around the world, such as the bacteria *Paenibacillus larvae* and the fungi *Ascosphaera apis*, *Nosema apis* and *Nosema ceranae*. Their distributions in some parts of the world, such as Brazil, are not fully known not only because