MARIA FERNANDA DE CASTRO BURBARELLI

Limpeza e desinfecção em galpões de frango de corte: eficiência, produtividade e avaliação econômico-financeira frente a *Campylobacter* spp.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:

Nutrição e Produção Animal

Área de Concentração:

Nutrição e Produção Animal

Orientador:

Prof. Dr. Ricardo de Albuquerque

Co-Orientadora:

Profa. Dra. Andrezza Maria Fernandes

Pirassununga
2016

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.3333
FMVZ

Burbarelli, Maria Fernanda de Castro
Limpeza e desinfecção em galpões de frango de corte: eficiência, produtividade e
avaliação econômico-financeira frente a *Campylobacter* spp. / Maria Fernanda de Castro
Burbarelli. -- 2016.
138 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia. Departamento de Nutrição e Produção Animal, Pirassununga, 2016.

Programa de Pós-Graduação: Nutrição e Produção Animal.

Área de concentração: Nutrição e Produção Animal.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo de Albuquerque.

Co-orientador: Profa. Dra. Andrezza Maria Fernandes

1. Biossegurança. 2. *Campylobacter jejuni*. 3. Desinfetantes. 4. Produção avícola. 5.
Sanidade Avícola. I. Título.

CERTIFICAÇÃO DE ÉTICA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado “Limpeza e desinfecção em galpões de frango de corte: eficiência, produtividade e avaliação econômico-financeira frente a *Campylobacter spp.*”, protocolado sob o nº3025/2013, utilizando 1920 (mil novecentos e vinte) frangos de corte, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Ricardo de Albuquerque, foi aprovado em reunião de 26/6/2013 e está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

We certify that the Research “Cleaning and disinfection of broiler warehouses: efficiency, productivity and economic and financial evaluation front of *Campylobacter spp.*”, protocol number 3025/2013, utilizing 1920 (one thousand, nine hundred and twenty) chickens, under the responsibility Prof. Dr. Ricardo de Albuquerque, was approved in the meeting of day 6/26/2013 and agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee in the Use of Animals of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo.

São Paulo, 20 de agosto de 2015.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: BURBARELLI, Maria Fernanda de Castro

Título: **Limpeza e desinfecção em galpões de frango de corte:** eficiência, produtividade e avaliação econômico-financeira frente a *Campylobacter* spp.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Dedico aos meus pais, Arlei e Neusa,
que deram condições para que trilhasse
meus caminhos. Pelos momentos
difíceis que enfrentaram e que juntos
superaram uma difícil recuperação.
Meus avós, Olímpio e Pedrina, meu
exemplo de amor e carinho.
Ao meu grande amor Diego Levy.

Agradecimentos

Agradeço a Deus por todas as oportunidades que tive desde que cheguei a Pirassununga, desafios superados, pela saúde e disposição.

Aos meus Pais Arlei e Neusa, por permitirem que realizassem o sonho de ser Médica Veterinária. Agradeço também a Deus por tê-los amparado em momentos difíceis.

Aos meus avós, Olímpio e Pedrina, pelo amor e carinho. Exemplo de amor e dedicação.

Ao Professor Ricardo pela orientação, oportunidades proporcionadas, pelo apoio aos projetos, pela confiança e carinho comigo e todos os seus orientados.

A Profa. Andrezza pela co-orientação e amizade. Pela gentileza em mais uma vez ceder as instalações do laboratório para análises microbiológicas e confiança em me acolher em sua equipe.

Ao Prof. Ricardo Moro e a Dra. Sabrina Queiroz pela orientação e ensinamentos quanto as técnicas de PCR e análises de bioinformática.

A Profa. Estela Moro por ceder as instalações onde foram realizados os experimentos do presente estudo.

Ao Prof. Roberto Bordin, pela orientação, colaboração na execução do projeto e amizade.

Diko Becker, pelo fornecimento do material utilizado no experimento e cooperação na realização do projeto.

Aos membros da banca e suplentes que colaboram com críticas construtivas ao presente trabalho.

A Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. Ao departamento de Nutrição e Produção animal VNP.

À Fapesp pela Bolsa concedida para execução do projeto (processo 2013/02457-8).

As empresas Ewabo e Aviagen pelo apoio e fornecimento de produtos e aves.

A CCAMP/ IOC/ Fiocruz, pelo fornecimento das cepas utilizadas como padrão no presente estudo.

A todos aqueles que participaram direta ou indiretamente do experimento, coletas, controles, análises laboratoriais, procedimentos de limpeza e desinfecção, preparação das instalações: Karoline(Garga), Felipe Gastaldo, Carlos Eduardo

Merseguel(Cadu), Carlos Granghelli, Luana de Paula, Amanda, Gabriel Bertini, Bruno, Marina, Gustavo Polycarpo, Joyce, Agatha Carão, Diane Neff, Samara Maganha.

A amiga Karoline (Garga) pela amizade e toda ajuda na realização do experimento.

Às amigas Thayla pela elaboração da metodologia das análises econômicas e Esther na realização e correção das mesmas análises.

Ao amigo Maurício (Xiba) pelo socorro na análise estatística.

Ao amigo Gustavo Polycarpo pela amizade, parcerias, paciência e por sempre dividir seu conhecimento.

A amiga Livia Queiroz que me ajudou a realizar o objetivo de iniciar o voluntariado.

Ao Diego Levy que suportou todo estresse do experimento, me deu bons conselhos e apoio para seguir em frente.

Aos funcionários do aviário: China, Diego, Sr. Pedro, Joel e Edinho.

Aos funcionários da fábrica de ração Cláudio, Rahel, Zé, Ioneo, Maicon.

Funcionários do abatedouro experimental: Élcio, Mauricio, Mauricio, Mario, Dito, Ponciano, Andressa.

Aos funcionários do departamento de nutrição e produção animal – VNP João Paulo, Alessandra, Fabia, D. Lúcia e as meninas da limpeza.

Ao Bigode e Reinaldo, pelo transporte da ração e dos pintinhos utilizados no experimento.

Aos colegas do Piraves.

A todos aqueles que foram meus alunos no Centro Universitário Anhanguera Educacional – Leme no curso de Medicina Veterinária, foi uma experiência incrível poder lecionar para vocês!

Ao Asilo Ns. Senhora de Fátima, todos os internos e funcionários. Experiência que a cada dia me proporciona um enorme aprendizado sobre a vida!

A toda família Hard Roça-Piramodels!! Moradores, ex moradores e agregados...

A minha rep, minha casa, minha família: Hard Roça!!

A Pança minha cadelinha companheira.

Aos 3000 frangos utilizados nos experimentos!

*“Não há razão para temor
Tenha mais fé nos dias seus
Ponha na vida mais amor,
Menos mundo e mais Deus...”*

Milionário e José Rico – Mensagem do Além

(Prado Jr/Praense)

*“Eu lutei tanto, tantos anos, pra chegar a isso...
Vai ter que dar...Vai ter que chegar em
primeiro... Porque Ele é maior do que todos...”*

**Ayrton Senna da Silva – Em entrevista após vencer
o GP do Brasil, 1991**

RESUMO

BURBARELLI, M. F. C. **Limpeza e desinfecção em galpões de frango de corte: eficiência, produtividade e avaliação econômico-financeira frente a *Campylobacter* spp.** [Cleaning and disinfection of poultry houses: efficiency, productivity and economic valuation against *Campylobacter* spp.]. 2016. 138 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2016.

Os procedimentos de limpeza e desinfecção usados na produção frangos de corte são fundamentais para a manutenção do alto nível de saúde do plantel, reduzindo o risco de ocorrência de enfermidades e melhorando o desempenho produtivo das aves. Existe a possibilidade de contaminação dos produtos desde a chegada das aves às instalações até o abate. *Campylobacter* é uma bactéria constantemente encontrada no trato gastrointestinal das aves e merece destaque na produção avícola devido a sua capacidade de provocar enfermidades em humanos. Para evitar a ocorrência de surtos de doenças transmitidas por alimentos como a campilobacteriose, para manutenção da saúde de plantéis avícolas e o aumento da produtividade de lotes de frangos de corte é necessário a realização das práticas preventivas como a limpeza e desinfecção. Desta maneira, o presente estudo teve como objetivos avaliar: o desempenho produtivo em lotes de frangos de corte desafiados com *Campylobacter jejuni*, a redução da pressão de infecção em instalações submetidas a diferentes protocolos de limpeza e desinfecção, e sua viabilidade econômico-financeira. Foi conduzido protocolo experimental no Laboratório de Pesquisa em Aves do departamento de Nutrição e Produção Animal, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, *Campus* Pirassununga. Foram realizados dois alojamentos cada um com 960 pintos de um dia de idade. No primeiro alojamento, todas as aves foram inoculadas com uma cepa conhecida de *Campylobacter jejuni* (atcc 33560) a fim de contaminar o ambiente criando desafio sanitário. No segundo alojamento foram realizados dois protocolos de limpeza e desinfecção, constituindo os dois tratamentos experimentais (Comum e Proposto). Neste lote, para avaliação da produtividade, foram mensurados os parâmetros: viabilidade, mortalidade, conversão alimentar, ganho de peso e consumo de ração. Para avaliação microbiológica do ambiente e das carcaças foi realizada a contagem total de microrganismos para ambiente e a identificação de *Campylobacter* spp.. As amostras positivas foram submetidas a um ensaio de PCR multiplex para identificação de

espécies de *Campylobacter* spp. Para avaliação econômica financeira dos lotes de frangos de corte foram utilizados e adaptados os dados de custos de produção elaborados pela Embrapa Suínos e Aves às condições de criação e resultados obtidos no presente estudo. O tratamento Proposto demonstrou influências positivas no desempenho das aves, na redução da contagem total de microrganismos, na eliminação de *Campylobacter* spp. e viabilidade econômico-financeira.

Palavras-chave: Biossegurança. *Campylobacter jejuni*. Desinfetantes. Produção avícola. Sanidade Avícola.

ABSTRACT

BURBARELLI, M. F. C. **Cleaning and disinfection of poultry houses:** efficiency, productivity and economic valuation against *Campylobacter* spp. [Limpeza e desinfecção em galpões de frango de corte: eficiência, produtividade e avaliação econômico-financeira frente a *Campylobacter* spp.]. 2016. 138 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2016.

The procedures of cleaning and disinfection used in broiler production are necessary to maintaining a high standard of birds' health, decreasing the risk of diseases, optimizing the animal performance, as well as to ensure sanitary quality of meat. There is possibility of contamination in all farming steps, since chicks' arrival until the end of slaughter. *Campylobacter* is a bacteria constantly found at gastrointestinal tract of the birds, and so, a special concern must be given since it can cause human diseases. In order to avoid foodborne illness outbreaks such as campylobacteriosis, to ensure poultry flocks health maintenance and to improve broilers productivity, adopting preventive practices such as cleaning and disinfection is required. Thus, this study aimed to evaluate: the animal performance of broilers challenged with *Campylobacter jejuni*; the reduction of infection pressure in housing plants subjected to different cleaning protocols and disinfection, and its economic and financial viability. Experimental protocol was conducted at the Research Laboratory of Poultry of Nutrition and Animal Production Department, College of Veterinary Medicine and Animal Science, University of São Paulo, *Campus* Pirassununga. Two housings each with 960 day-old chicks of age were performed. In the first housing, all birds were inoculated with a known strain of *Campylobacter jejuni* (ATCC 33560) to contaminate the environment in order to create health challenge. In the second housing were performed two cleaning and disinfection protocols, featuring two experimental treatments (Common and Proposed). In this lot, to evaluate animal performance, the parameters were measured: feasibility, mortality, feed conversion, weight gain and feed intake. For microbiological evaluation of environment and of carcasses, was performed a total count of microorganisms for environmental and identification of *Campylobacter* spp. The positive samples were subjected to a multiplex PCR assay identification of species of *Campylobacter* spp. For economic and financial evaluation of batches, the data of husbandry costs elaborated by Embrapa Swine and Poultry

were adapted to conditions and results obtained in this study. Based on results, the Proposed treatment has shown positive influences on bird performance, reduction of total count of microorganisms, on elimination of *Campylobacter* spp. and on economic and financial viability.

Keywords: Biosecurity. *Campylobacter jejuni*. Disinfectants. Poultry Production. Poultry Sanity.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Composição percentual e valores nutricionais calculados das rações para as diferentes fases	40
Tabela 2 -	Resultados de desempenho obtidos no primeiro alojamento em ambas as metades do galpão lados A e B – ambiente não submetido aos programas de limpeza e desinfecção.....	50
Tabela 3 -	Resultados de desempenho obtidos no segundo alojamento, no qual o ambiente foi submetido aos programas de limpeza e desinfecção	52
Tabela 4 -	Contagem total de microrganismo antes e depois dos procedimentos de limpeza e desinfecção	53
Tabela 5 -	Frequência de <i>Campylobacter</i> spp. nas amostras coletadas nos alojamentos 1 e 2	77
Tabela 6 -	Frequência da ocorrência de <i>Campylobacter</i> spp. nas diferentes fases do abate.....	81
Tabela 7 -	Comparação das porcentagens de similaridade (abaixo da diagonal) e identidade (acima da diagonal) das sequências nucleotídicas para fragmentos de 331pb do gene <i>lpxA</i> de <i>Campylobacter jejuni</i> , entre 6 amostras detectadas por PCR multiplex e posteriormente sequenciadas, e sequências de outros <i>Campylobacter</i> recuperadas do GenBank	85
Tabela 8 -	Dados médios de desempenho aos 42 dias de idade das aves, de cada um dos tratamentos, dados utilizados para realização das análises econômicas	106
Tabela 9 -	Fator multiplicador em relação a diferença entre a conversão esperada e a atingida pelo lote de aves conversão alimentar...	110
Tabela 10 -	Indicadores econômicos: margem bruta de comercialização (MB), receita total (RT), do custo do tratamento (CT), relação CT/RT e relação MB/Pesolotes, do alojamento 2 com total de 960 aves, divididos em lotes de 30 aves	112
Tabela 11 -	Cenário 1 Produtor integrado, aplicando tratamento Proposto - lote de 40.000 aves.....	115

Tabela 12 - Cenário 2 Produtor integrado, aplicando tratamento Comum - lote de 40.000 aves.....	116
Tabela 13 - Cenário 3 Produtos independente, aplicando tratamento Proposto - lote de 40.000 aves.....	117
Tabela 14 - Cenário 4 Produtor independente, aplicando tratamento Comum - lote de 40.000 aves.....	117

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Inoculação oral das aves com <i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 33560	41
Figura 2 -	Lavagem dos equipamentos do tratamento Proposto	44
Figura 3 -	Enxague das instalações do tratamento Proposto	44
Figura 4 -	Lavagem das instalações do tratamento comum	45
Figura 5 -	Material utilizado nas coletas microbiológicas.....	46
Figura 6 -	Realização das análises microbiológicas	47
Figura 7 -	Coleta das aves no momento do abate.....	69
Figura 8 -	Procedimentos de rinsagem das carcaças.....	69
Figura 9 -	Meio de cultivo MCCDA com crescimento de colônias características de <i>Campylobacter</i> spp.	70
Figura 10 -	Seleção de colônias de <i>Campylobacter</i> em meio MCCDA para extração de DNA	72
Figura 11 -	Realização de eletroforese em gel de agarose	73
Figura 12 -	Fotografia de gel de agarose corado com SYBER® Gold, sob luz UV, ilustrando resultado de amplificação de fragmentos de 331pb, 391 pb e 331 pb, relativo ao gene <i>lpxA</i> do genoma de <i>Campylobacter</i> , após a aplicação das técnicas de PCR Multiplex, a partir de cepas padrão. (1) Marcador 100pb, (2) Controle negativo, (3) <i>C. Jejuni</i> Cepa ATCC 33560, (4 e 5) <i>C. Coli</i> isoladas de fezes de primatas, (6) <i>C. Lari</i> NTCC 11352.....	83
Figura 13 -	Fotografia de gel de agarose corado com SYBER® Gold, sob luz UV, ilustrando resultado de amplificação de fragmentos de 331bp, 391 pb e 331 pb, relativo ao gene <i>lpxA</i> do genoma de <i>Campylobacter</i> após a aplicação das técnicas de PCR Multiplex, a partir de amostras ambientais do experimento. (1) Marcador 100pb, (2) Controle negativo, (3) Controle positivo <i>C. Jejuni</i> Cepa ATCC 33560, (4) Amostra 517, (5) Amostra 522, (6) Amostra 527 (7) Amostra 537, (8) Amostra 532, (9) Amostra 542 e (10) Amostra 547	

Figura 14 - Cladograma representando reconstrução filogenética baseada no alinhamento de sequências nucleotídicas referente a amplificação de um fragmento de 340pb do gene *lpxA* de *Campylobacter* 86

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Sequências nucleotídicas de <i>Campilobacter</i> spp. utilizadas para reconstrução filogenética com indicação do genótipo, nome, origem e respectivos números de acesso no GenBank	76
Quadro 2 - Legenda das amostras sequenciadas utilizadas na confecção da árvore filogenética	87

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	21
1 INTRODUÇÃO	22
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	24
2.1 BIOSSEGURIDADE NA AVICULTURA.....	24
2.2 HIGIENIZAÇÃO NA AVICULTURA	25
2.2.1 Procedimentos de Limpeza	26
2.2.2 Procedimentos de Desinfecção.....	27
2.2.3 Monitoramento da limpeza e desinfecção	28
2.3 INFLUÊNCIA DAS MEDIDAS SANITÁRIAS NA QUALIDADE DE PRODUTOS AVÍCOLAS	29
2.4 DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS	30
2.5 CAMPYLOBACTER.....	31
3 OBJETIVOS	34
3.1 OBJETIVOS GERAIS	34
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
4 HIPÓTESE	35
 CAPÍTULO 2	 36
5 INTRODUÇÃO	37
6 MATERIAL E MÉTODOS.....	39
6.1 LOLCAL, INSTALAÇÃO, EQUIPAMENTOS E ANIMAIS	39
6.2 PRIMEIRO ALOJAMENTO – CONTAMINAÇÃO DO AMBIENTE E DESAFIO SANITÁRIO	40
6.3 SEGUNDO ALOJAMENTO – AMBIENTE APÓS LIMPEZA E DESINFECÇÃO.....	41
6.4 PROTOCOLOS DE LIMPEZA E DESINFECÇÃO	42
6.5 AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO.....	45
6.6 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS	46
6.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	47
7 RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
8 CONCLUSÃO.....	56
REFERÊNCIAS	57

CAPÍTULO 3	61
9 INTRODUÇÃO	62
10 MATERIAL E MÉTODOS	65
10.1 PERÍODO EXPERIMENTAL E TRATAMENTOS	65
10.2 COLETA DE AMOSTRAS – AMBIENTE DE CRIAÇÃO	67
10.3 COLETA DE AMOSTRAS – ABATE E CARCAÇAS	68
10.4 CAMPYLOBACTER SPP. - CULTIVO POR ISOLAMENTO DIRETO	69
10.5 CAMPYLOBACTER SPP. - IDENTIFICAÇÃO PRESUNTIVA	70
10.6 CAMPYLOBACTER SPP. ENSAIO DE PCR.	71
10.7 PREPARO DE AMOSTRAS PARA SEQUENCIAMENTO	73
10.8 SEQUENCIAMENTO	74
10.9 ALINHAMENTO DE SEQUÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS	75
10.10 ANÁLISE FILOGENÉTICA	75
10.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA	75
11 RESULTADOS E DISCUSSÃO	77
12 CONCLUSÃO	92
REFERÊNCIAS	93
CAPÍTULO 4	101
13 INTRODUÇÃO	102
14 MATERIAL E MÉTODOS	104
14.1 EXPERIMENTO DE DESEMPENHO	104
14.2 CÁLCULO DA MARGEM BRUTA DE COMERCIALIZAÇÃO	106
14.3 ANÁLISE ECONÔMICA DA VIABILIDADE DOS DOIS SISTEMAS DE TRATAMENTO NA PRODUÇÃO DE FRANGO DE CORTE DE CICLO COMPLETO	107
14.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	111
15 RESULTADOS E DISCUSSÃO	112
16 CONCLUSÃO	122
REFERÊNCIAS	123
CAPÍTULO 5	126
17 IMPLICAÇÕES	127
18 CONCLUSÃO GERAL	129

REFERÊNCIAS.....130
ANEXO.....135

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

No ano de 2015 o Brasil produziu 12,69 milhões de toneladas de carne de frango, registrando leve aumento na produção em relação ao ano anterior, permanecendo como terceiro maior produtor e maior exportador mundial de carne de frango (UBABEF, 2015).

Com o crescimento da produção avícola é necessário obter alta produtividade, aliando genética, nutrição, manejo e sanidade. No âmbito da sanidade, muito tem se evidenciado as práticas de prevenção frente à contaminação por microrganismos patogênicos e a ocorrência de enfermidades. Estas práticas preventivas visam a garantia da saúde do plantel e a saúde do consumidor dos produtos provenientes da criação de frangos de corte. Dentro deste contexto, a biosseguridade tem se tornado o foco de atenção da maioria dos produtores de animais e indústrias de alimentos.

Dentre as práticas de biosseguridade o processo de limpeza e desinfecção detalhado das instalações e equipamentos utilizados na criação de frangos de corte que é indispensável para a manutenção do alto nível de saúde do plantel, pois, através da redução da carga microbiana nas instalações, equipamentos e no ambiente do sistema de produção, o risco de ocorrência de doenças será reduzido assim como o controle de enfermidades presentes será mais eficiente (OUROFINO, 2004).

Burbarelli et al. (2015) demonstraram a influência direta das práticas de limpeza e desinfecção no desempenho produtivo de frangos de corte, obtendo maiores índices para aqueles animais alojados em instalações previamente limpas e desinfetadas.

Além dos relatados benefícios ao desempenho das aves, a qualidade sanitária da carne também está relacionada às boas práticas de produção de frangos de corte, devido à possibilidade de contaminação desde a chegada das aves às instalações de criação até o abate.

As bactérias *Campylobacter* spp. são a principal causa de doença bacteriana intestinal em humanos, sendo a principal fonte de contaminação a carne, especialmente a de frango (BORSOI, 2011).

A incidência de *Campylobacter* spp. em carcaças de frango varia com as condições de manejo durante a criação e com as medidas higiênico-sanitárias nas operações de abate e manipulação (BORSOI, 2011). A contaminação das carcaças

de frango por *Campylobacter* spp. é relacionada à presença da bactéria no conteúdo intestinal das aves, sendo a evisceração um ponto crítico para a contaminação.

Desta maneira, a limpeza e desinfecção juntamente com práticas de biossegurança mostram-se indispensáveis na redução da carga bacteriana no ambiente de criação de frangos de corte, bem como para evitar a contaminação de carcaças.

A adoção de programas de limpeza e desinfecção geralmente é bem aceita pelos criadores de aves. Sua aplicação constante, entretanto, é difícil. Um dos principais motivos dessa dificuldade é o fato de que, comparado com outras medidas, o custo do processo é imediato, enquanto que seus benefícios somente aparecem com o tempo e são difíceis de mensurar (MULLER, 2008).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 BIOSSEGURIDADE NA AVICULTURA

Biosseguridade é um conceito bastante recorrente na avicultura. As publicações conhecidas datam desde 1868, ressaltando a importância da higienização na produção de aves (TE WINKEL, 1997), o que não se diferencia dos conceitos atuais. Sabe-se da necessidade da sua implantação tendo início na elaboração dos procedimentos e ações de controle. Normas específicas devem ser estabelecidas e pode-se observar aplicação prática e rotineira no campo e nas demais atividades de produção de frangos de corte (ALBINO, 2007). Tais medidas visam minimizar riscos e impactos de enfermidades ou presença de resíduos (biológicos, químicos ou físicos) em populações animais ou nos produtos derivados destes (SONCINI, 2007).

A transmissão de doenças na avicultura acontece através da disseminação de microrganismos patogênicos principalmente pela exposição das aves a materiais, equipamentos, vetores e ar contaminados (CUNNINGHAM, 2012).

Erroneamente, em muitos estabelecimentos de produção avícola acredita-se que biosseguridade consiste em controle de acesso e limpeza e desinfecção, deixando de lado outras importantes considerações de todo o programa (BUTCHER; YEGANI, 2008). Para a manutenção de sistemas de produção avícolas livres ou controlados à presença microrganismos responsáveis por doenças de impacto econômico na produtividade ou zoonoses é necessário um programa de biosseguridade que contemple todos níveis da cadeia produtiva de frangos de corte (SESTI, 2004).

De acordo com Butcher e Yegani (2008), pontos fundamentais de um programa de biosseguridade são facilmente apontados dentro do sistema de produção, porém, sua compreensão bem como a necessidade de cada unidade produtora deve ser tratada individualmente, respeitando suas características e limitações, são informações muitas vezes deixadas de lado na busca de uma fórmula padrão da aplicação dos conceitos de biosseguridade.

Um programa de biosseguridade eficiente pode ser baseado em dois conceitos principais: exclusão (manutenção das instalações livres de patógenos) e contenção (uma vez introduzido, prevenir a disseminação para áreas não contaminadas) (SANEI;

INNES, 2005). Da mesma maneira, Sesti (2004), observa que na ocorrência de contaminação do lote por patógenos é necessário que o programa de biosseguridade seja imediatamente reformulado e adaptado à nova situação de saúde do sistema em questão.

Alguns pontos fundamentais de um programa de biosseguridade são: conscientização quanto à importância da implantação de medidas rigorosas para reduzir os riscos de introdução de doenças no plantel, aquisição de pintos de estabelecimentos registrados, localização respeitando distâncias mínimas entre o galpão de frangos de corte e outros estabelecimentos avícolas e manejo sanitário adequado (JEANISCH, 2003). Outros pontos fundamentais de um programa de Biosseguridade são: isolamento, controle de tráfego e limpeza e desinfecção.

2.2 HIGIENIZAÇÃO NA AVICULTURA

O ambiente produtivo para aves de corte possui características como umidade, ausência de incidência de luz solar, temperaturas amenas e presença de matéria orgânica, estes fatores favorecem a permanência de agentes patogênicos por longos períodos, possibilitando a contaminação das aves por diversos lotes subsequentes (RISTOW, 2008). Neste contexto, a pressão de infecção gerada por estes microrganismos necessita ser reduzida (SESTI et al., 1998), para isto a higienização das instalações, associada ao vazão sanitário (JEANISCH, 2003) mostra-se fundamental para a redução deste desafio no ambiente de produção de frangos de corte e ainda para o bloqueio do ciclo de vida de microrganismos patogênicos (COX, 2005).

A higienização começa posteriormente a saída do lote de aves, iniciando-se pela retirada de todos equipamentos e objetos utilizados na produção, retirada da cama, limpeza e desinfecção das instalações, equipamentos e objetos e eliminação dos resíduos (COLDEBELLA, 2004).

No caso de reutilização da cama, esta deverá ser empilhada no centro do galpão, desinfetada e depois levada para a zona de armazenamento, que deve estar localizada longe dos galpões da granja (BORNE; COMTE, 2003).

O planejamento das atividades de higienização dos estabelecimentos avícolas é fundamental para o sucesso de tais práticas. (MEROZ; SAMBERG, 1995; COLDEBELLA, 2004).

2.2.1 Procedimentos de Limpeza

O sistema de criação, onde as aves entram no seu primeiro dia de vida e só saem das instalações ao final do período total de 42 dias, impede a realização de procedimentos frequentes de limpeza e desinfecção durante sua permanência nas instalações, além disto, as instalações e equipamentos utilizados na avicultura facilitam o acúmulo de matéria orgânica durante todo o período de produtivo. Os procedimentos de limpeza visam a remoção deste material pois a matéria orgânica serve de proteção aos microrganismos funcionando como uma barreira à atuação dos desinfetantes ou ainda promovendo a sua inativação (AMASS et al., 2001; UGA, 2005).

O processo de limpeza pode ser dividido em duas partes: limpeza seca e limpeza úmida. A limpeza seca consiste na retirada de toda matéria orgânica, restos de ração e da sujeira impregnada no piso e nas paredes, deve-se realizar a varrição de todo interior e exterior do galpão. A limpeza úmida é constituída de quatro etapas umidificação, lavagem, enxague e secagem (COLDEBELLA, 2004; UGA, 2005).

É importante a utilização de água sob alta pressão no processo de limpeza, tal procedimento auxilia na remoção de matéria orgânica aderida as porosidades das superfícies visto que o tipo de superfície a ser limpa também pode influenciar nos resultados dos processos de limpeza, superfícies ásperas como o concreto são mais difíceis de limpar do que aquelas que são lisas como o plástico (STRINGFELLOW et al., 2009; TOKACH et al., 2012). Os jatos devem ser manejados de modo a realizar movimentos no sentido de cima para baixo nas instalações (MORISHITA; GORDON 2002; COLDEBELLA, 2004).

O uso de sabões ou detergentes é recomendado durante a limpeza úmida, estes produtos, em especial os detergentes auxiliam na remoção da matéria orgânica e gorduras, atuam na redução da tensão superficial e possuem ainda alguma ação na eliminação de microrganismos (GREZZI, 2007).

Durante os procedimentos de limpeza úmida deve-se observar se há acúmulo de água ou detritos no piso, em caso positivo, a limpeza deve ser interrompida e deve ser realizada sua retirada para evitar a recontaminação do ambiente com este material (MEROZ; SAMBERG, 1995).

O enxague e secagem completos das instalações devem ser realizados, a fim de retirar quaisquer resíduos das instalações. Tais procedimentos finalizam as práticas de limpeza, um ambiente eficientemente limpo tem aproximadamente 90% dos seus patógenos removidos (UGA, 2005), tornando o ambiente pronto para a posterior desinfecção (COLDEBELLA, 2004).

2.2.2 Procedimentos de Desinfecção

A desinfecção de ambientes e equipamentos tem por objetivo reduzir a pressão de infecção a partir da destruição das formas vegetativas de microrganismos (UGA, 2005), podem ser utilizados agentes físicos (calor, radiação) e químicos (desinfetantes) (COLDEBELLA, 2004).

Matéria orgânica e a sujeira devem ser removidas a fim de maximizar o contato entre a solução desinfetante e os microrganismos. A correta escolha de um desinfetante deve levar em consideração alguns fatores: agente envolvido, objetivo do procedimento, tipo e material da superfície a ser desinfetada e as condições de limpeza. O produto escolhido deve ter alta eficiência, amplo espectro, boa relação custo x benefício, baixa toxicidade, estabilidade, alto poder residual, elevada penetrabilidade e não causar efeitos nocivos ao meio ambiente (UGA, 2005; GREZZI, 2007; SHELTON; MCCREA, 2012).

Diferenças na ação dos desinfetantes também podem ocorrer quanto às espécies de microrganismos, assim, uma opção é rotacionar o tipo de desinfetante utilizado ou ainda utilizar produtos que possuam mais de um princípio ativo na sua composição com a finalidade de aumentar o espectro de atividade e para evitar a resistência aos desinfetantes por parte dos microrganismos patogênicos (SESTI, 1998).

Os desinfetantes para ter sua máxima ação necessitam de concentração e tempo de ação adequados; poucos produtos oferecem ação instantânea, em geral o tempo de ação fica em torno de 20 a 30 minutos. A concentração do desinfetante deve ser

alta o suficiente para que tenha sua máxima ação com mínimo tempo de contato com a superfície (GREZZI, 2007).

De acordo com Meroz e Samberg(1995), a aplicação do desinfetante deve ser realizada em forma de spray, a baixa pressão, favorecendo a entrada da solução nos poros e frestas das superfícies e equipamentos. Objetos pequenos podem ser imersos em recipiente contendo solução desinfetante a fim de facilitar o contato de todas as suas faces com o produto. A quantidade a ser aplicada para superfícies como pisos e paredes é de 0,4L/m².

2.2.3 Monitoramento da limpeza e desinfecção

O monitoramento é fundamental para a eficiência das medidas tomadas. A primeira ação do monitoramento é a inspeção visual das instalações, sendo esta prática um pré requisito para a posterior avaliação microbiológica. A avaliação visual das instalações é importante pois uma superfície que não possui aparência limpa, dificilmente obtém baixa quantificação microbiológica (MEROZ; SAMBERG, 1995).

A avaliação microbiológica da eficiência do programa de limpeza e desinfecção pode ser realizada através de amostragem para contagem total de bactérias presentes no ambiente (COLDEBELLA, 2004) a partir da coleta de suabes de superfícies e posterior cultivo em meio para contagem total de microrganismos (MEROZ; SAMBERG, 1995).

O tempo decorrido entre o processo de desinfecção e a coleta deve ser de dois a três dias e a superfície amostrada deve estar seca, caso contrário o desinfetante ainda pode estar atuando e seus resíduos podem influenciar o crescimento das bactérias em meio de cultivo (PETERSON et al., 2008).

Vale ressaltar que a avaliação dos protocolos deve ser realizada durante todo o processo (limpeza seca, limpeza úmida e desinfecção) a fim de detectar e corrigir eventuais falhas que possam influenciar negativamente a eficácia de todo o programa de limpeza e desinfecção (GREZZI, 2007).

2.3 INFLUÊNCIA DAS MEDIDAS SANITÁRIAS NA QUALIDADE DE PRODUTOS AVÍCOLAS

A causa mais comum de toxinfecções alimentares tem sido a ingestão de produtos avícolas contaminados crus ou insuficientemente cozidos, relatada em várias partes do mundo, paralelamente os plantéis avícolas precisam de boas práticas sanitárias para que suas características produtivas, potencial genético e aproveitamento nutricional sejam maximizados (CARVALHO; CORTES, 2003; SILVA, 2009), desta maneira observa-se a crescente preocupação com o manejo sanitário adotado na avicultura.

A qualidade e a segurança dos alimentos se tornaram preocupações recorrentes tanto para produtores quanto consumidores, (DUARTE et al., 2010), a alta população de bactérias patogênicas nas instalações destinadas a frangos de corte contribui para a diminuição do bem estar do plantel e aumenta os níveis de patógenos presentes nas carcaças (PAYNE et al., 2005). A contaminação das carcaças de frango pode decorrer da presença de agentes patogênicos no ambiente de criação e se disseminar durante a operação de abate, caso cuidados higiênicos não sejam realizados (CARDOSO; TESSARI, 2008).

A carne de frango possui importante papel na alimentação humana, é um produto saudável e de baixo custo, sua qualidade microbiológica é importante para a saúde pública, deve possuir baixa carga bacteriana, garantindo a saúde de seu consumidor (SILVA et al., 2002). Em busca da redução da contaminação, é necessário controle sanitário na produção e criação de animais, manipulação, transporte, armazenamento e preparação do alimento (VENTURINI et al., 2007).

Produtos de origem avícola são comumente associados à transmissão de doenças como salmoneloses e campilobacterioses, as quais possuem grande impacto econômico na avicultura, ameaçando elevar os custos de produção e processamento (PAYNE et al., 2005).

Para obtenção da redução dos riscos de contaminação dos produtos de origem avícola, o programa de biossegurança é fundamental, normas quanto a localização do aviário, aquisição dos pintos, manejo sanitário, acesso restrito ao aviário e a realização da higienização garantem qualidade sanitária ao produto final (JEANISCH, 2003).

A cama do aviário pode ser considerada fonte de contaminação das aves e consequentemente das carcaças produzidas, considera-se que a cama deveria ser trocada a cada entrada de novo lote, porém em vistas do custo e impacto causado no ambiente, é preciso que se faça a reutilização. Para tal prática poder ser considerada segura, é necessária a realização de análises microbiológicas para garantir que a cama foi tratada e que esteja livre de patógenos como *E.coli*, *Staphylococcus aureus*, *C.perfringens*, *Salmonela spp.* e *Campylobacter jejuni* (SILVA et al., 2002).

A presença de bactérias causadoras de doenças transmitidas por alimentos na cama dos aviários pode ser considerado um sinal de possíveis problemas na saúde dos consumidores (FIORENTINI, 2005).

Heyndrickx et al. (2002) ; Herman et al. (2003) e Franchin et al. (2005), observaram altos índices de contaminação de carne de frango antes do abate, no momento da criação dos frangos de corte, de superfícies e equipamentos, caixas de transporte, alimentos e água. Aves podem se contaminar durante a criação em galpões carregando consigo bactérias patogênicas em suas penas, ingluvío ou intestinos que são fontes potenciais de contaminação das carcaças durante o abate.

2.4 DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS

Doenças transmitidas por alimentos são síndromes resultantes da ingestão de alimentos contaminados por microrganismos patogênicos capazes de causar sintomas como dor de estômago, náusea, vômitos, diarreia e febre. De acordo com o agente etiológico envolvido, o quadro clínico pode ser mais severo e sua duração mais longa. Os indivíduos acometidos podem apresentar desidratação grave, diarreia sanguinolenta, insuficiência renal aguda e insuficiência respiratória (CARMO et al., 2005; BRASIL, 2008).

Os produtos de origem animal estão frequentemente associados a surtos de doenças transmitidas por alimentos, este fato ocorre devido as características favoráveis como à variedade de nutrientes, à alta atividade de água e à baixa acidez (VAN AMSON et al., 2006) e também a facilidade de contaminação durante toda a cadeia produtiva (JEANISCH, 2000).

Os microrganismos encontrados nos produtos de origem animal são provenientes na maioria dos casos de sua microbiota superficial, de suas vias respiratórias e do trato gastrointestinal. A pele, pelos e penas dos animais produtores de carne pode conter microrganismos como *Escherichia coli*, *Pseudomonas sp*, *Staphylococcus sp*, *Klebsiella sp*, *Salmonella sp*, *Citrobacter sp*, *Micrococcus sp*, *Streptococcus sp*, *Bacillus sp* e *Campylobacter sp*, estes mesmos microrganismos têm sido isolados em carnes, com destaque para a de frangos de corte (FREITAS et al., 2004).

Campylobacter sp. e *Salmonella sp.* São responsáveis por cerca de 90% dos casos de doenças transmitidas em todo o mundo, a maioria destes casos está relacionada ao consumo de produtos de origem avícola como a carne e os ovos. O consumo destes produtos crus ou mal cozidos é apontado como a maior causa da ocorrência de salmoneloses e campilobacterioses (SILVA et al., 2002). A contaminação cruzada, a higienização deficiente, más condições de manipulação e armazenamento de produtos de origem avícola também podem ser indicada como causa destas afecções (BRASIL, 1997).

2.5 CAMPYLOBACTER

As bactérias do gênero *Campylobacter* são a principal causa de doença bacteriana intestinal em humanos, identificada em muitos países principalmente nos em desenvolvimento. Mais de 80% dos casos são relacionados ao *Campylobacter jejuni* causando enterite aguda e dor abdominal, com duração de 7 dias ou mais (SALEHA et al., 1998, BORSOI, 2011).

Geralmente esta bactéria não causa sintomas em aves devido a sua relação de comensalismo (BORSOI, 2011), assim, o trato intestinal de frangos de corte é considerado principal reservatório de *Campylobacter jejuni* com incidência de 30 a 100% (MACHADO, 1992).

Campylobacter pode ser considerada uma bactéria sensível pois é facilmente destruída pelo calor, mostra-se incapaz de crescer na presença de ar, seu crescimento ótimo ocorre em microaerofilia com 5% de oxigênio, são sensíveis à dessecação e ao

estresse osmótico. O correto cozimento dos alimentos mostra-se eficiente na eliminação deste patógeno (BORSOI, 2011).

A transmissão de *Campylobacter* nas aves pode ser vertical, principalmente através do contato do ovo fértil com fezes (DOYLE, 1984; NEILL et al., 1985). Pode ocorrer a contaminação do pintinho no momento da eclosão pelo contato oral com a casca contaminada (NEWELL; FEARNLEY, 2003). Apesar da possibilidade de contaminação vertical, a transmissão horizontal mostra-se muito mais efetiva, o contato oral-fecal favorece esta condição.

A sobrevivência do *Campylobacter* na água torna este meio uma fonte possível de contaminação das aves (NEWELL; FEARNLEY, 2003, BORSOI, 2011). Oliveira et al. (2008), descreve os bebedouros utilizados na criação de frangos de corte como eficiente fonte de contaminação às aves.

A cama e rações contaminadas também podem ser consideradas fontes de contaminação de frangos de corte (CARVALHO et al., 2001). A reutilização da cama sem tratamento, bem como o uso subsequente de instalações sem a realização de práticas de limpeza e desinfecção favorecem a contaminação dos lotes por *Campylobacter*.

Para o controle de surtos campylobacterise é necessário atuar na cadeia produtiva de frangos de corte, prevenindo a colonização intestinal das aves (NEWELL; FEARNLEY, 2003). As boas práticas na produção de frangos de corte (KUANA, et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2008; VAZ, 2008) e limpeza e desinfecção entre lotes mostram-se fatores fundamentais na prevenção a contaminação por tal bactéria (NEWELL; FEARNLEY, 2003; OLIVEIRA et al., 2008).

Nas penas e cloaca das aves são encontradas alta frequência de contaminação por *Campylobacter* (FRANCHIN et al., 2005; BORSOI, 2011), o que torna o momento do abate das aves um ponto crítico, a contaminação cruzada pode ocorrer durante todo o processo, principalmente a depenagem e chiller (KUANA et al., 2008).

Na linha de abate industrial, Carvalho et al. (2001) detectaram *Campylobacter* em amostras do tanque de escalda (26%), água de lavagem das carcaças após a evisceração (61%), carcaças após a evisceração (36%), fezes frescas obtidas na plataforma de recebimento dos frangos (42%), e penas provenientes da depenadeira (38%) concluindo que a evisceração e a depenagem merecem atenção especial como pontos de contaminação de carcaças. No momento da depenagem a pressão exercida

pelas hastes emborrachadas na região dorsal e cloaca favorece a saída do conteúdo intestinal e uma consequente contaminação da carcaça (MIWA et al., 2003).

A redução da ocorrência de *Campylobacter* em produtos avícolas tem como desafio aliar a qualidade sanitária dos lotes bem como as medidas de biossegurança adotadas durante a produção, com a adoção de procedimentos de higiene, prevenção e padronização no abate industrial garantindo a inocuidade dos produtos oferecidos ao consumidor (BORSOI, 2011).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

O presente estudo tem por objetivo avaliar o desempenho produtivo em lotes de frangos de corte, a redução da pressão de infecção em instalações submetidas a diferentes protocolos de limpeza e desinfecção, bem como sua viabilidade econômico-financeira.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar viabilidade, mortalidade, conversão alimentar, ganho de peso, consumo de ração e índice de eficiência produtiva para frangos de corte alojados em ambiente previamente limpo e desinfetado com diferentes protocolos de realização.

Avaliar a eficiência do programa de limpeza e desinfecção na diminuição da pressão de infecção, na eliminação e possível persistência de *Campylobacter* spp. das instalações de frangos de corte.

Caracterizar as cepas de *Campylobacter Jejuni* possivelmente presentes no ambiente em questão.

Avaliar a viabilidade econômico-financeira de lotes de frangos de corte submetidos a diferentes protocolos de limpeza e desinfecção com simulações de diferentes.

4 HIPÓTESE

É possível que o programa de limpeza e desinfecção das instalações possua efeito positivo sobre o desempenho dos frangos e sobre a eliminação de *Campylobacter*, refletindo numa melhora do custo de produção.

CAPÍTULO 2

Efeitos da limpeza e desinfecção de instalações na contagem total de microrganismos e sobre o desempenho de frangos de corte desafiados com *Campylobacter jejuni*.

5 INTRODUÇÃO

A criação de frangos de corte é caracterizada pela alta densidade populacional e confinamento, o que favorece uma possível disseminação de patógenos (FORTDODGE, 2008).

As práticas preventivas, as quais incluem a limpeza e a desinfecção, são passos fundamentais de programas de biossegurança e mostram-se fundamentais para a manutenção da alta produtividade dos plantéis avícolas.

O programa de limpeza e desinfecção deve ser adotado assim que há a saída de um lote de aves e antes da entrada do subsequente (MORISHITA; GORDON, 2002), visto que durante o ciclo de crescimento das aves as instalações não são limpas e desinfetadas. Os objetivos primários dos procedimentos de limpeza e desinfecção são reduzir a contagem de patógenos e a transmissão dos mesmos de um lote para o seguinte (TOKACH et al., 2012).

A adoção de práticas eficientes de limpeza e desinfecção é a base para a saúde animal e a prevenção de doenças (SOBESTIANSKY, 2002; SESTI, 2004), uma vez adotadas estas práticas, o monitoramento da eficiência da redução da contaminação bacteriana deverá ser realizado. A inspeção visual do ambiente é uma forma de se monitorar a limpeza e desinfecção, o que não dispensa a coleta de amostras para análises bacteriológicas as quais visam quantificar a redução da contaminação bacteriana a níveis aceitáveis, visto que a esterilidade em condições de campo como as da avicultura são impraticáveis (MORISHITA; GORDON, 2002).

Ambientes produtivos com alto grau de contaminação possuem influências diretas como a alta mortalidade ou indiretas como a desuniformidade e queda de desempenho em lotes de frangos de corte (RISTOW, 2008; RENAUDEAU, 2009). A limpeza e desinfecção por sua vez possuem influências positivas no aumento do desempenho produtivo de frangos de corte (BURBARELLI et al., 2015).

A ocorrência de doenças em humanos transmitidas por produtos avícolas pode estar relacionada com a contaminação das aves durante sua vida nas instalações de produção. O *Campylobacter* é um dos agentes causadores deste tipo de doenças,

apesar de não causar sintomas de enfermidades em frangos de corte (SHANE et al., 1986; STERN, 1992; SMITH et al., 2008), a contaminação das aves e consequentemente das carcaças é motivo de atenção na cadeia produtiva avícola. Para a garantia da qualidade sanitária dos produtos os cuidados devem se iniciar desde o período de criação das aves até o abate (NEWELL; FEARNLEY, 2003). Neste sentido, as práticas preventivas a contaminação das aves, dentre elas a limpeza e desinfecção das instalações, mostram-se fundamentais para a prevenção da ocorrência das campilobacterioses (NEWELL et al., 2011).

Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar o desempenho produtivo e a contaminação ambiental em lotes de frangos de corte alojados em instalações experimentalmente contaminadas por *Campylobacter jejuni* e posteriormente submetidas a diferentes protocolos de limpeza e desinfecção.

6 MATERIAL E MÉTODOS

6.1 LOLCAL, INSTALAÇÃO, EQUIPAMENTOS E ANIMAIS

O presente estudo foi conduzido no aviário experimental do Departamento de Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Campus Pirassununga, Estado de São Paulo.

Para o experimento de desempenho, foram utilizados 1.920 pintos de corte, divididos em dois lotes subsequentes de 960 aves cada. As aves foram distribuídas em 32 boxes, contendo 30 aves em cada. A densidade de alojamento foi de 10 aves por metro quadrado. O intervalo entre os lotes foi de 8 dias.

Os pintos eram da linhagem Cobb 500, recebidos e alojados com um dia de idade, exclusivamente machos, criados até 42 dias de idade. A média de pesos obtida após a pesagem no primeiro dia de vida foi de 45,5g.

Foram distribuídos em um galpão de alvenaria, dividido em 32 boxes (1,70m x 2,50m), com piso forrado com casca de arroz nova e providos de comedouros tubulares e bebedouros pendulares.

O galpão apresentava metragem média utilizada para análise e execução dos cálculos para o programa de limpeza e desinfecção de 500m² (metragem da estrutura, forro, cortinas – parte interna e externa, calçamento, piso e muretas). O volume de cama utilizado nos aviários, também foi interpretado com valores médios (40 m de comprimento X 10 m de largura e 8 cm de altura) totalizando 3,2 m³.

O galpão utilizado possui uma antessala interna que o divide em duas metades, impedindo o acesso de uma parte para outra, tanto de aves quanto de pessoas, garantindo o isolamento de cada grupo experimental.

A dieta utilizada foi a base de milho e farelo de soja sendo ofertada para todas as aves de todos os boxes, atendendo as exigências propostas por Rostagno et al., (2011) (Tabela 1). As rações foram formuladas para as fases 1 a 7, 8 a 21, 22 a 35 e 36 a 42 dias de idade. Nos premixes utilizados não houve a adição de antibióticos promotores de crescimento.

Tabela 1 - **Composição percentual e valores nutricionais calculados das rações para as diferentes fases**

Ingredientes %	Fases de Criação			
	1-7 dias	8-21 dias	22-35 dias	36-42 dias
Milho	55,08	59,26	61,88	66,58
Soja Farelo 45%	38,31	34,79	31,58	27,37
Óleo de soja	2,20	2,14	3,13	2,96
Calcário	0,922	0,912	0,824	0,769
Fosfato Bicalcico	1,892	1,525	1,334	1,069
Sal Comum	0,350	0,350	0,350	0,350
DL-Metionina	0,354	0,283	0,252	0,236
L-Lisina HCl	0,282	0,26	0,190	0,230
Treonina	0,103	0,057	0,038	0,474
Cloreto de colina	0,072	0,063	0,057	0,043
*Suplemento Vit.	0,100	0,100	0,100	0,100
**Suplemento Min.	0,100	0,100	0,100	0,100
Composição calculada				
Energia Metabolizável (kcal/kg)	2.950	3.000	3.100	3.150
Proteína Bruta %	22,20	20,80	19,50	18,00
Met+Cis Digestível%	0,94	0,84	0,78	0,73
Lisina Digestível %	1,31	1,17	1,07	1,01
Treonina Digestível %	0,85	0,76	0,70	0,65
Cálcio %	0,92	0,81	0,73	0,63
Fosforo Disponível %	0,39	0,34	0,31	0,27
*Composição Suplemento Vitamínico:Vitamina A 7.000 U.I; Vitamina D3 2.200U.I; Vitamina E (mínimo) 11 U.I; Vitamina K3 1,6 mg; Vitamina B1 2,0 mg; Vitamina B2 5,0 mg; Vitamina B6 3,0 mg; Vitamina B12 (mínimo) 12 mcg; Niacina 35mg; Ácido Pantotênico 13 mg; Ácido Fólico 800 mg/kg				
**Composição Suplemento Mineral: Cobre 8 mg; Ferro 50 mg; Iodo 1,2 mg; Manganês 70 mg; Selênio 0,2 mg; Zinco 50 mg.				

6.2 PRIMEIRO ALOJAMENTO – CONTAMINAÇÃO DO AMBIENTE E DESAFIO SANITÁRIO

Após a distribuição inicial das aves em ambas as metades do galpão Lado A e Lado B, no 11º dia de idade das aves, todas foram inoculadas com cepa padrão de *Campylobacter jejuni* (atcc 33560) a fim de contaminar o ambiente, criando desafio sanitário.

A inoculação foi realizada através de sonda oral com a deposição de 1ml de inóculo composto por meio de cultivo líquido BHI e 10^5 ufc/ml de *Campylobacter Jejuni*

(Figura 1) determinada como alta dose por Chaveerach et al. (2004), a fim de realizar a colonização do trato gastrointestinal das aves e posterior eliminação do agente para o ambiente experimental.

O desempenho das aves alojadas foi avaliado durante todo o período experimental, sendo pesadas semanalmente as aves e as sobras de ração ofertada. A finalidade desta avaliação foi demonstrar a igualdade de condições ambientais de cada uma das metades (lados A e B) do galpão no desempenho das aves.

Aos 42 dias de idade as aves foram retiradas das instalações para ser dada continuidade ao experimento e o segundo alojamento.

A cama foi retirada neste mesmo dia e foi realizada avaliação microbiológica ambiental para quantificação de microrganismos totais presentes nas instalações.

Figura 1 - Inoculação oral das aves com *Campylobacter jejuni* ATCC 33560

Fonte: acervo pessoal

6.3 SEGUNDO ALOJAMENTO – AMBIENTE APÓS LIMPEZA E DESINFECÇÃO

O segundo alojamento pode ser considerado um estudo observacional de caráter comparativo entre dois tratamentos Comum e Proposto de limpeza e desinfecção.

Foram retirados todos os equipamentos e objetos presentes no galpão, deixando a instalação pronta para receber os dois protocolos testados.

Foi realizada a limpeza e desinfecção Comum e Proposta em cada uma das metades do galpão, nos 8 dias que antecederam a chegadas das aves, de acordo com os protocolos que serão especificados no item 7.4.

Em ambos os protocolos foram utilizados 0,4 litros de solução diluída por m² tanto para detergentes quanto para desinfetantes.

Avaliou-se ainda a eficiência dos protocolos através da avaliação microbiológica assim como será especificado no item 7.6.

Após o término da realização dos protocolos as aves foram distribuídas nos boxes de criação, providos de comedouros tubulares, bebedouros pendulares e cama nova. O desempenho das aves alojadas foi avaliado durante todo o período de criação.

6.4 PROTOCOLOS DE LIMPEZA E DESINFECÇÃO

Os protocolos de limpeza e desinfecção foram:

Proposto

1. Limpeza e desinfecção do sistema de fornecimento de água: lavagem da caixa d'água e posterior aplicação de desinfetante ácido composto por ácido peracético 100g / kg e Benzil-(C12-C16) cloro-alkyl dimetilamonio 80g/ kg na concentração 0.5%. O produto foi adicionado à água da caixa d'água e permaneceu durante 12 horas. Posteriormente foi escoado pelo sistema de encanamento, através dos gatilhos dos bebedouros.
2. Limpeza seca: retirada de todos os equipamentos do galpão, retirada da cama e varrição das instalações.
3. Limpeza úmida: foi realizada umidificação do galpão e posterior lavagem com água sob alta pressão (Figura 2).

4. Lavagem de todos os equipamentos utilizados no galpão (bebedouros, comedouros, baldes, botas, bandejas, e demais utensílios) com água sob alta pressão.
5. Aplicar o detergente alcalino em solução de 4% sobre todas as superfícies (teto, paredes, piso, cortinas) internas e externas, objetos e equipamentos (bebedouros, comedouros, baldes, botas, bandejas, e demais utensílios). Enxague com água sob alta pressão (Figura 3).
6. Aplicação do detergente ácido em solução a 4% sobre todas as superfícies (teto, paredes, piso, cortinas) internas e externas objetos e equipamentos (bebedouros, comedouros, baldes, botas, bandejas, e demais utensílios). Enxague com água sob alta pressão.
7. Secagem do ambiente – parcialmente seco, sem poças d'água.
8. Aplicação do desinfetante composto de glutaraldeído 250g/L e formaldeído 185g/L na concentração 0,5% com bomba costal.
9. Aplicação do desinfetante composto de paraclorometacresol 210 g/L na concentração 4% apenas no piso e paredes até 0,5m de altura.
10. Os equipamentos (bebedouros, comedouros, baldes, botas, bandejas, etc) foram desinfetados após a secagem, da mesma maneira que as demais superfícies como descrito a partir do item 8.

Comum

1. Retirada de todos os equipamentos do galpão, retirada da cama e varrição das instalações.
2. Lavagem de equipamentos (comedouros, bebedouros, baldes, botas etc.) com detergente neutro (Figura 4).
3. Umidificação e lavagem do ambiente com água e detergente neutro.
4. Secagem do ambiente.

Figura 2 - Lavagem dos equipamentos do tratamento Proposto

Fonte: acervo pessoal

Figura 3 - Enxague das instalações do tratamento Proposto

Fonte: acervo pessoal

Figura 4 - Lavagem das instalações do tratamento comum

Fonte: acervo pessoal

6.5 AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO

As aves foram pesadas no 1º, 7º, 14º, 21º, 28º, 35º e 42º dias do experimento. As variáveis respostas mensuradas em cada box foram o ganho de peso médio no período avaliado, consumo de ração, conversão alimentar, índice de eficiência produtiva e viabilidade.

- Ganho de peso médio: peso final do período experimental menos o peso inicial do período experimental;

- Consumo de ração no período: total de ração fornecida menos o peso da sobra de ração;

- Conversão alimentar do período: total de ração consumida no período experimental dividida pelo ganho de peso total dividido pelo número de aves. Para este cálculo será somado o peso das aves mortas e sacrificadas;

- Viabilidade: a mortalidade foi anotada e, posteriormente, foi contabilizada por período experimental, este número foi transformado em porcentagem e subtraído de 100% para obtenção da viabilidade.

- Índice de eficiência produtiva: Calculado a partir do peso vivo, viabilidade, idade e conversão alimentar de acordo com a seguinte fórmula:

$$IEP = \frac{PV_{Kg} \times \%Viabilidade}{Idade \times CA} \times 100$$

6.6 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

As análises microbiológicas foram realizadas 24 horas antes da realização dos procedimentos de limpeza e desinfecção e 48 horas após a limpeza e desinfecção.

Tais análises foram feitas a partir de amostras das superfícies do piso, paredes, bebedouros, comedouros e água de bebida das aves. Para tal amostragem foi realizado suabe dessas superfícies em 5 boxes de cada tratamento. Cada ponto das superfícies avaliadas tinha 2cm x 5cm totalizando a área de 10cm². Foram coletadas amostras de 200mL de água provenientes dos bebedouros de 5 boxes de cada tratamento (Figura 5).

Para a análise quantitativa foi utilizada a técnica de contagem total de microrganismos mesófilos aeróbios em placas de petri, com semeadura em superfície, descrita por Evancho et al. (2001) (Figura 6).

Figura 5 - Material utilizado nas coletas microbiológicas

Fonte: acervo pessoal

Figura 6 - Realização das análises microbiológicas

Fonte: acervo pessoal

Foi retirado 1mL de solução dos tubos onde foram acondicionados os suabes e colocados em um tubo contendo 9ml de água peptonada 0,5% sendo realizadas as diluições seriadas de 10-1 a 10-5.

A semeadura foi realizada em duplicatas, em cada uma das placas foi distribuído homogeneamente 0,1 ml das diluições seriadas com alça de Drigalsky em placas contendo 15ml de ágar para contagem em placas (PCA) previamente solidificado. As placas foram levadas a estufa a 37°C por 24h para posterior contagem de colônias.

6.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados de desempenho obtidos foram analisados através do programa computacional Statistical Analysis System (SAS, 2008), sendo anteriormente verificada a normalidade dos resíduos estudentizados pelo Teste de Shapiro-Wilk (PROC UNIVARIATE) e as variâncias comparadas pelo Teste de Levene. Os dados que não atenderam a estas premissas foram submetidos à transformação logarítmica.

Os dados originais ou transformados, quando este último procedimento foi necessário, foram submetidos à análise de variância para verificar se houve efeito de tratamento, utilizando-se o procedimento Mixed (PROC MIXED) O nível de significância utilizados para estas análises foi de 5%.

7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não foram encontradas diferenças no desempenho das aves durante o primeiro experimento (Tabela 2).

A ausência de diferença estatística para o desempenho das aves no primeiro experimento pode ser explicada pelo fato de que ambas as metades do galpão estiveram submetidas às mesmas condições ambientais, sem diferenças quanto a temperatura, umidade e às práticas de manejo adotado.

Quanto a inoculação das aves, não foi observado nenhum sinal clínico de doença aparente neste primeiro lote, assim como Shane et al. (1986) e Stern (1992) também que não observaram a ocorrência de doença em aves colonizadas por *Campylobacter*. Smith et al. (2008), encontraram resposta polinflamatória na colonização intestinal de frangos de corte infectados por *Campylobacter*, esta resposta porém, foi incapaz de causar doenças nas aves.

Na tabela 3 podem ser observados os resultados de desempenho zootécnico avaliados no segundo alojamento do presente estudo.

No período de 1 a 14 dias para conversão alimentar houve efeito de tratamento, as aves alojadas em ambiente submetido ao tratamento Proposto obtiveram melhor conversão alimentar do que aqueles alojados em instalações com um programa de limpeza e desinfecção comum.

No período total de alojamento (1 a 42), dias houve efeito do tratamento proposto para instalações avícolas sobre o desempenho produtivo das aves. Aquelas alojadas em ambiente submetido a rígidos protocolos de limpeza e desinfecção ou seja, o tratamento proposto, obtiveram maiores peso vivo, ganho de peso, consumo de ração e melhor conversão alimentar.

Tabela 2 - Resultados de desempenho obtidos no primeiro alojamento em ambas as metades do galpão lados A e B – ambiente não submetido aos programas de limpeza e desinfecção

Experimento 1				
Variável	Lado A	Lado B	CV	P
1-7 dias				
PV(g)	163	165	4,4430	0,4476
GP(g)	114	117	6,1463	0,3674
CR(g)	124	123	3,3322	0,4018
CA	1,08	1,05	4,9106	0,0808
Viab(%)	99,58	100	0,8132	0,1536
1-14 dias				
PV(g)	434	425	4,6390	0,1941
GP(g)	383	378	5,0545	0,3152
CR(g)	509	505	4,3038	0,6406
CA	1,32	1,34	3,2344	0,3340
Viab(%)	99,38	100,00	0,9803	0,0726
1-21 dias				
PV(g)	903	898	4,1628	0,6786
GP(g)	849	850	4,1266	0,9178
CR(g)	1212	1207	3,1347	0,7055
CA	1,42	1,42	2,59	0,5123
Viab(%)	99,34	100	0,9994	0,0626
1-28 dias				
PV(g)	1551	1550	3,77	0,9694
GP(g)	1499	1499	3,66	0,7503
CR(g)	2172	2183	4,600	0,7617
CA	1,45	1,45	2,295	0,9588
Viab(%)	99,17	99,79	1,493	0,2423
1-35 dias				
PV(g)	2257	2268	2,4866	0,5930
GP(g)	2208	2225	2,8391	0,4523
CR(g)	3435	3434	3,2880	0,9769
CA	1,52	1,51	2,2179	0,4710
Viab(%)	98,75	98,76	2,0439	0,9932
1-42 dias				
PV (g)	2994	2952	3,5779	0,2704
GP (g)	2900	2889	3,4256	0,7594
CR (g)	4845	4864	2,4956	0,6637
CA	1,67	1,68	3,0813	0,4610
Viab(%)	96,48	98,55	3,3496	0,0715
IEP	410,94	412,31	7.0510	0,8964

^{a-b}letras sobrescritas diferentes na mesma linha indicam valores diferentes estatisticamente pelo teste F ($p < 0,05$)* Valor de P significativo ($p > 0,05$) CV = Coeficiente de Variação Peso Vivo(PV), Ganho de Peso (GP), Consumo de Ração (CR), Conversão Alimentar(CA), Viabilidade(Viab), Índice de Eficiência Produtiva (IEP)

Observando os demais resultados obtidos neste estudo nota-se que em todos os períodos os tratamento proposto foi numericamente superior ao tratamento comum, diferença esta não suficiente para ser demonstrada estatisticamente, porém esta diferença acumulada durante os períodos manifestou-se estatisticamente ao final do período experimental, 1 a 42 dias, demonstrando superioridade do desempenho de aves alojadas em ambientes previamente limpos e desinfetados.

Antes dos procedimentos de limpeza e desinfecção, a contagem total de microrganismos mostrou-se semelhante para todos os pontos do ambiente avaliado: pisos, paredes, bebedouros, comedouros e água. Tais resultados demonstram a homogeneidade das condições de criação anteriores a realização do segundo experimento (Tabela 4).

Após a realização dos procedimentos, observou-se diferença entre os tratamentos, sendo que as menores contagens foram encontradas na água, comedouros, paredes e pisos submetidos ao protocolo proposto. Os bebedouros dos diferentes tratamentos não apresentaram diferenças estatísticas em suas contagens (Tabela 4).

Bebedouros do tipo pendular, assim como os utilizados no presente estudo, são equipamentos com grande capacidade de acumular restos alimentares e matéria orgânica em suas partes, principalmente na bacia coletora de água, esta propriedade é responsável pela alta contagem de microrganismos (VALIAS; SILVA, 2011). O acúmulo de matéria orgânica neste equipamento pode ser um dos motivos pelo qual os bebedouros do presente estudo mesmo quando submetidos a um protocolo de limpeza e desinfecção rígido, protocolo proposto, não obtiveram resultados diferentes daqueles submetidos ao protocolo comum.

A partir da dificuldade da manutenção destes equipamentos com baixas contagens microbiológicas podemos considera-los como um ponto crítico para procedimentos de limpeza e desinfecção, assim como Luyckx et al. (2015) os consideraram em seus estudos.

Tabela 3 - Resultados de desempenho obtidos no segundo alojamento, no qual o ambiente foi submetido aos programas de limpeza e desinfecção

Experimento 2				
Variável	Trat Proposto	Trat Comum	CV	P
1-7 dias				
PV(g)	174	166	6,478	0,375
GP(g)	128	120	8,952	0,054
CR(g)	136	131	7,384	0,202
CA	1,08	1,09	3,497	0,344
Viab(%)	99,38	99,79	1,113	0,300
1-14 dias				
PV(g)	446	427	9,095	0,163
GP(g)	402	382	10,179	0,160
CR(g)	524	504	8,209	0,176
CA	1,28	1,31	2,830	0,028
Viab(%)	98,962	98,962	2,16	0,993
1-21 dias				
PV(g)	845	842	4,152	0,861
GP(g)	802	800	4,436	0,865
CR(g)	1504	1493	3,387	0,546
CA	1,85	1,86	3,040	0,517
Viab(%)	98,90	99,120	1,553	0,702
1-28 dias				
PV(kg)	1483	1464	5,206	0,495
GP(kg)	1444	1422	5,567	0,429
CR(kg)	2578	2533	4,380	0,263
CA	1,78	1,78	2,91	0,785
Viab(%)	97,93	98,55	2,716	0,520
1-35 dias				
PV(kg)	2179	2126	5,248	0,187
GP(kg)	2141	2126	5,288	0,196
CR(kg)	3836	3746	4,173	0,106
CA	1,784	1,809	3,432	0,270
Viab(%)	97,931	98,137	2,704	0,830
1-42 dias				
PV (kg)	2,717	2532	5,595	<0,0001
GP (kg)	2,610	2447	6,361	0,002
CR (g)	4,903	4760	3,908	0,035
CA	1,880	1952	5,460	0,050
Viab(%)	95,681	96,265	4,216	0,691
IEP	346,51	312,01	9,718	0,001

^{a-b)}letras sobrescritas diferentes na mesma linha indicam valores diferentes estatisticamente pelo teste F ($p < 0,05$) * Valor de P significativo ($p > 0,05$) CV = Coeficiente de Variação Peso Vivo(PV), Ganho de Peso (GP), Consumo de Ração (CR), Conversão Alimentar(CA), Viabilidade(Viab), Índice de Eficiência Produtiva (IEP) Proposto: limpeza e desinfecção seguindo rígidos passos e execução Comum: Limpeza e desinfecção simplificada

Tabela 4 - Contagem total de microrganismo antes e depois dos procedimentos de limpeza e desinfecção

Antes				
	Proposto	Comum	CV	p*
Água	4,340	5,061	19,526	0,234
Bebedouro	5,562	6,285	12,217	0,118
Comedouro	4,680	4,364	12,690	0,451
Parede	5,201	4,645	19,120	0,381
Piso	4,859	4,941	15,066	0,881
Depois				
Água	2,319	5,755	52,059	0,014
Bebedouro	0,702	1,565	106,249	0,282
Comedouro	0,679	3,420	86,891	0,004
Parede	0,975	3,100	70,314	0,008
Piso	0,144	3,866	92,480	<,0001

Dados expressos em ufc log₁₀/10 cm² para todos os parâmetros exceto água (ufc log₁₀/ml)

*Significância P<0,05

Os resultados positivos quanto a redução da contagem total de microrganismos nos equipamentos e instalações submetidos ao tratamento proposto do presente estudo mostram-se alinhados a alguns estudos como o de Luyckx et al. (2015) que ao avaliar programas de limpeza e desinfecção em instalações avícolas observou maior redução da contagem total de microrganismos quando os programas adotados incluíam uma etapa de umidificação do ambiente, assim como o tratamento proposto do presente estudo. Tal fato parece estar relacionado com a facilidade em remover a matéria orgânica e expor os microrganismos (GREZZI, 2007) do ambiente para a etapa posterior, a lavagem sob alta pressão, passo este também presente no presente estudo e no de Luyckx et al. (2015).

A remoção eficiente da matéria orgânica mostra-se fundamental a um programa de limpeza e desinfecção, pois seus resíduos são capazes de reduzir a ação dos desinfetantes (STRINGFELLOW et al., 2009, CHIMA et al., 2012) resultando em maiores contagens de microrganismos mesmo após a realização da desinfecção.

As maiores contagens totais de microrganismos nos equipamentos e instalações submetidos ao tratamento comum estão associados a ausência de uma etapa eficaz de desinfecção neste tratamento. A utilização dos detergentes atua com ação desengordurante, no desprendimento da matéria orgânica e na remoção de biofilmes (HURNIK, 2005), porém a realização de práticas de limpeza não isentam os programas da realização de procedimentos de desinfecção (OUROFINO, 2004). Não é incomum a prática de procedimentos de limpeza apenas com a aplicação de água

e detergentes em instalações avícolas, sem que em seguida sejam adotados procedimentos de desinfecção.

A ausência de procedimentos de desinfecção pós limpeza ou ainda a utilização incorreta dos desinfetantes, assim como outras falhas na biossegurança (GIFFORD et al., 1987) em lotes de frangos de corte acarretam resultados indesejáveis a produção, como queda de desempenho e ocorrência de doenças.

É de conhecimento que altas populações bacterianas são responsáveis pela queda de desempenho de aves de corte (PAYNE et al., 2002,2005), ainda que medidas de biossegurança, dentre estas as práticas de limpeza e desinfecção, possuem influências positivas sobre o desempenho de frangos de corte (SHARMA, 2011) e na prevenção da ocorrências de doenças (COZAD; JONES, 2003; NEWEL et al., 2011), porém são poucos estudos que fazem esta relação direta entre limpeza e desinfecção e desempenho de frangos de corte. Neste sentido, o presente estudo ao relacionar estes conceitos demonstrou influência positiva dos procedimentos de limpeza e desinfecção nos parâmetros produtivos de frangos de corte, criados em ambientes previamente expostos a presença de *Campylobacter jejuni*. Burbarelli et al. (2015), também observaram melhora no desempenho produtivo de frangos de corte quando utilizado protocolo detalhado de limpeza e desinfecção, assim como a redução da contagem de microrganismos nas instalações. Ka-Oud (2008) encontrou mortalidade mais baixa e maior peso final para aves alojadas em galpões submetidos a limpeza e desinfecção. Ali et al. (2011) encontraram resultados semelhantes aos do presente estudo, avaliando medidas de biossegurança, e não apenas programas de limpeza e desinfecção. Da mesma maneira, Bragg e Plumstead (2003) encontraram efeitos benéficos da limpeza e desinfecção para lotes de frangos de corte como a redução da mortalidade decorrente de agentes infecciosos.

Experimentos avaliando as influências da limpeza e desinfecção no desempenho de suínos são mais recorrentes na literatura, maiores consumo de ração, ganho de peso (HURNIK, 2005; RENAUDEAU, 2009) e ganho de peso diário (ICE et al., 1997; CARGILL; BANHAZI, 1998) foram encontrados para suínos criados em instalações limpas e desinfetadas. Em ambas as espécies, aves e suínos, a expressão de um desempenho satisfatório está relacionado com a saúde intestinal, (BOLELI et al., 2002), desta maneira o equilíbrio da microbiota é importante fator para a produtividade.

Fatores que promovam o desequilíbrio desta microbiota podem afetar diretamente o desempenho das aves visto que aproximadamente 20% da energia bruta consumida seja gasta na manutenção do epitélio intestinal, ainda, a redução na absorção de nutrientes possui influências negativas na conversão alimentar, no rendimento de carcaça e custo de produção (HOERR, 2001). As práticas de limpeza e desinfecção são responsáveis pela redução da pressão de infecção do ambiente (SESTI et al., 1998), favorecendo o equilíbrio da microbiota intestinal, aumentando a absorção dos nutrientes e consequentemente a melhor expressão do potencial genético dos frangos de corte.

Apesar da utilização do *Campylobacter jejuni* no presente estudo como desafio sanitário, o desempenho de frangos de corte não demonstra ser influenciado pela infecção por *Campylobacter* (SHANE et al., 1986; STERN, 1992) porém, a capacidade deste microrganismo em causar campilobacteriose em humanos é ponto de atenção na produção de frangos de corte (NEWELL et al., 2011), neste sentido, além das práticas de limpeza e desinfecção possuírem objetivo de maximizar o desempenho das aves, é indispensável que estas também sejam adotadas a fim de minimizar a possibilidade de contaminação dos lotes, culminando com a contaminação das carcaças no momento do abate (NEWELL et al., 2011).

Gibbens et al. (2011) observaram uma redução da contaminação de carcaças de frango de 80% para 40% quando adotadas medidas de limpeza e desinfecção e biossegurança na criação, o que ressalta a necessidade de práticas preventivas na produção de frangos de corte para a melhor qualidade sanitária da carne.

8 CONCLUSÃO

O desempenho produtivo das aves alojadas em instalações submetidas a ao tratamento Proposto de limpeza mostra-se superior aquelas alojadas em instalações onde foram adotados os procedimentos Comuns de limpeza e desinfecção.

O tratamento Proposto demonstra maior eficiência na redução da contagem total de microrganismos do ambiente.

REFERÊNCIAS

- ALI, M. Y.; JAHAN, S. S.; BEGUM, M. I. A.; ISLAM, A. Impact of bio-security management intervention on growth performance and profitability of broiler farming in Bangladesh. **Livestock Research for Rural Development**, v. 26, p.195-202, 2014.
- BOLELI, I. C.; MAYORKA, A.; MACARI, M. Desenvolvimento e Reparo da mucosa intestinal. In: MACARI, M.; FURLAN, R. L.; GONZÁLES, E. **Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte**. Jaboticabal: Funep, 2002. p. 185-220.
- BRAGG, R. R.; PLUMSTEAD, P. Continuous disinfection as a means to control infectious diseases in poultry. Evaluation of a continuous disinfection programme for broilers. **The Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 70 n. 3, p. 219, 2003.
- BURBARELLI, M. F. C.; MERSEGUEL, C. E. B.; RIBEIRO, P. A. P.; LELIS, K. D.; POLYCARPO, G. V.; CARÃO, A. C. P.; BORDIN, R. A.; FERNANDES, A. M.; SOUZA, R. L. M.; MORO, M. E. G.; ALBUQUERQUE, R. The Effects of Two Different Cleaning and Disinfection Programs on Broiler Performance and Microbiological Status of Broiler Houses **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 17, n. 3, p. 405-500, 2015.
- CARGILL, C.; BANHAZI, T. The importance of cleaning in all-in/all-out management systems. In: IPVS CONGRESS, 15., 1998, Birmingham, England. **Proceedings...** Birmingham: IPVS, 1998. p. 15-20.
- CHAVEERACH, P.; KEUZENKAMP, D. A.; LIPMAN, L. J. A.; VAN KNAPEN, F.. Effect of organic acids in drinking water for young broilers on Campylobacter infection, volatile fatty acid production, gut microflora and histological cell changes. **Poultry Science**, v. 83, p. 330–334, 2004.
- CHIMA, I. U.; UNAMBA-OPARA, I. C.; UGWU, C.; UDEBUANI, A. C.; OKOLI, C. G.; OPARA, M. N.; UCHEGBU, M. C.; OKOLI I.C. Biosecurity and disinfection controls of poultry microbial pathogen infections in Nigeria. **Journal World's Poultry Research**, v. 2, n. 1, p. 05-17, 2012.
- COZAD, A.; JONES, R. D. Disinfection and the prevention of infectious disease. **American Journal of Infection Control**, v. 31, p. 243-254, 2003.
- EVANCHO, G. M.; SVEUM, W. H.; MOBERG, L. J.; FRANK, J. F. **Compendium methods for the microbiological examination of foods**. Iowa: American Public Health Association, 2001. 275 p.
- FORTDODGE. **Biosseguridade em aves**. Curso de Sanidade Avícola, 2008. Disponível em: <<http://www.fortdodge.com.br/15cursodesanidadeavicola/>>. Acesso em: 5 out. 2015.
- GIBBENS J. C.; PASCOE S.J.S.; EVANS S.J.; DAVIES R.H.; SAYERS A.R. A trial of biosecurity as a means to control Campylobacter infection of broiler chickens, **Preventive Veterinary Medicine** v.48 p. 85-99, 2001.

GIFFORD, D. H.; SHANE, S. M.; HUGH, J. M.; WEIGLER, B. J. Evaluation of biosecurity in broiler breeder. **Avian Disease**. v.31, p.339-344,1987.

GREZZI, G. Limpeza e desinfecção na avicultura. In: CONFERÊNCIA APINCO, 2007, Santos. **Anais...** Santos: FACTA, 2007. p. 161.

HOERR, F.J. Intestinal integrity and the impact of losing it . **Word Poultry** v.17, n.7, 2001.

HURNIK, D.. Investigations into optimal washing and disinfection techniques for pig pens. In: LONDON SWINE CONFERENCE - PRODUCTION AT THE LEADING EDGE, 2005, London. **Proceedings...** London: PLSC, 2005. p. 135-138.

ICE, A. D.; GRANT, A. L.; CLARK, L. K.; CLINE, T. R.; EINSTEIN, M. E.; DIEKMAN, M. A. Health and lean growth performance of barrow reared in all-in, all-out or continuous flow facilities with or without antibiotic,1997. Disponível em: <<http://www.ansc.purdue.edu/swine/swineday/sday97/psd12-97.htm>> Acesso em : 20 abr. 2016.

KA-LOUD, H. A.; ZAKIA, M. A.; KAMEL, M.M. Evaluation of the immune response in AI vaccinated broiler chickens: effect of biosecurity faults on immune response. **International Journal of Poultry Science**, v.7, p.390-396, 2008.

LUYCKX, K. Y.; VAN WEYENBERG, S.; DEWULF, J.; HERMAN, L.; ZOONS, J.; VERVAET E.; HEYNDRIKX, M.; DE REU, K. On-farm comparisons of different cleaning protocols in broiler houses **Poultry Science**, v. 94, n. 8, P. 1986-1993, 2015.

MORISHITA, T. Y.; GORDON, J. C. **Cleaning and disinfection of poultry facilities**. [S.l.]: Extension Fact Sheet Ohio State University, 2002. Disponível em: <https://www.aphis.usda.gov/emergency_response/tools/cleaning/htdocs/images/Annex09_Cleaning.pdf>. Acesso em: 21 abr. 2015

NEWELL, D. G.; ELVERS, K. T.; DOPFER, D.; HANSSON, I.; JONES, P.; JAMES, S.; GITTINS, J.; STERN, N. J.; DAVIES, R.; CONNERTON, I.; PEARSON, D.; SALVAT, G.; ALLEN, V. M. Biosecurity-based interventions and strategies to reduce *Campylobacter* spp. on poultry farms. **Applied Environmental Microbiology**, v. 77, p. 8605–8614, 2011.

NEWELL, D. G.; FEARNLEY, D. G. C. Sources of *Campylobacter* Colonization in broiler chicken **Applied and Environmental Microbiology** v. 69, n. 8, p. 4343–4351, 2003.

OUROFINO SAÚDE ANIMAL. **Programa de limpeza e desinfecção para a indústria de suínos e aves**. [S.l.]: Ourofino, 2004. Disponível em: <http://www.ourofino.com/portal/files/programas/programa_limpeza_e_desinfeccao_.pdf>. Acesso em: 18 set. 2014.

PAYNE, J. B.; KROGER, E. C.; WATKINS, S. E. Evaluation of disinfectant efficacy when applied to the floor of poultry grow-out facilities. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 14, p. 322-329, 2005.

RENAUDEAU, D. Effect of housing conditions (clean vs. dirty) on growth performance and feeding behavior in growing pigs in a tropical climate. **Tropical Animal Health and Production**, v. 41, p. 559–563, 2009.

RISTOW, L. E. Desinfetantes e desinfecção em avicultura. **Aveworld**, v. 10, n. 29, p. 22-30, 2008.

ROSTAGNO, H. S. **Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais**. 3. ed. Viçosa, MG: Editora UFV, 2011. 252 p.

STATISTICAL ANALISYS SYSTEM (SAS). **User's guide**. Version 9.2 edition. Cary: SAS Institute, Inc., 2008.

SESTI, L. A. C.; SOBESTIANSKY, J.; DE BARCELLOS, D. E. S. N. Limpeza e desinfecção em suinocultura. **Suinocultura Dinâmica**, v. 6, n. 20, p. 1-15, 1998.

SESTI, L. A. C. Biosseguridade em avicultura: controle integrado de doenças. In: SIMPÓSIO GOIANO DE AVICULTURA, 2004, Goiânia. **Anais...** Goiânia: SGA, 2004. p. 98.

SHANE, S. M.; GIFFORD, D. H.; YOGASUNDRAM, K. Campylobacter jejuni contamination of eggs. **Veterinary Research Communication**, v. 10, p. 487-492, 1986.

SHARMA, B Poultry production, management and bio-security measures **Journal of Agriculture and Environment**, v. 11, p. 120-125, 2010

SMITH, C. K.; ABUOUN, M.; CAWTHRAW, S. A.; HUMPRHREY, T. J.; ROTHWELL, L.; KAISER, P.; BARROW, P. A.; JONES, M. A. Campylobacter colonization of the chicken induces a proinflammatory response in mucosal tissues. **Immunology Medical Microbiology**, v. 54, p. 114-121, 2008.

SOBESTIANSKY, J. **Sistema Intensivo de produção de suínos**: programa de biossegurança. Goiania: Embrapa, 2002. 108 p.

STERN, N. J. Reservoirs of C. jejuni and approaches for intervention in poultry. In: NACHAMKIN, M.; BLASER J.; TOMPKINS, L. S. **Campylobacter jejuni**: current status and future trends. Washington: American Society for Microbiology, 1992. p. 49-60.

STRINGFELLOW, K.; ANDERSON, P.; CALDWELL, D.; LEE, J.; BYRD, J.; MCREYNOLDS, J.; CAREY, J.; NISBET, D.; FARNELL, M. Evaluation of disinfectants commonly used by commercial poultry industry under simulated field conditions. **Poultry Science**, v 12, n. 88, p.1151-1155, 2009.

TOKACH, M. D.; GOODBAND, R. D.; DEROUCHÉY, J. M.; DRITZ, S. S.; NELSEN, J. L. Feeding and barn management strategies that maximize feed efficiency. **Feed Efficiency in Swine**, v. 1, p. 41-59, 2012.

UNIÃO BRASILEIRA DE AVICULTURA (UBABEF). **Relatório Anual 2014**. [S.l.]: União brasileira de avicultura, 2014. Disponível em: <<http://www.uba.org.br/>>. Acesso em: 4 set. 2015.

VALIAS, A. P. G. S.; SILVA, E. N. Estudo comparativo de sistemas de bebedouros na qualidade microbiológica da água consumida por frangos de corte. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 3, n. 1, p. 83-89, 2001 .

CAPÍTULO 3

Avaliação dos efeitos da limpeza e desinfecção de instalações de frangos de corte e caracterização molecular de *Campylobacter jejuni* após infecção experimental

9 INTRODUÇÃO

A evolução dos parâmetros sanitários, assim como as práticas preventivas à ocorrência de enfermidades foram passos fundamentais para desenvolver a avicultura industrial brasileira e sua ampliação do mercado externo, porém o controle de patógenos no ambiente produtivo é desafio permanente no setor avícola.

Além de garantir a alta produtividade do setor, as práticas preventivas são fundamentais para assegurar a qualidade sanitária dos produtos avícolas, tornando-os apropriados para o consumo humano.

Mais de 250 diferentes tipos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) têm sido descritas e as mais conhecidas são: Salmonelose, cólera, febre tifoide, botulismo, estafilococose e campilobacteriose. Esta última pode ser considerada uma DTA emergente (BRASIL, 2010).

A campilobacteriose é uma zoonose, cuja ocorrência é relatada em todo o mundo, causando gastroenterite em humanos e animais e podendo ser adquirida por contaminação cruzada ou cocção inadequada de produtos de origem animal, com destaque para a carne de aves (FSA, 2005).

Apesar de diversas espécies de *Campylobacter* estarem envolvidos em surtos, *Campylobacter jejuni* é responsável por aproximadamente 80 a 90% dos surtos de campilobacteriose (ALTER; SCHERER, 2006; DEBRUYNE et al., 2008; OIE, 2011). Entretanto, no Brasil as informações são limitadas sobre esta bactéria na cadeia de produção de aves (EVANS; SAYERS, 2000).

As bactérias do gênero *Campylobacter* spp. são adaptadas ao trato intestinal dos animais e não se multiplicam fora hospedeiro, mas sobrevivem no solo, água e nos diversos materiais das instalações avícolas, (cama, pisos, bebedouros, comedouros, rações, caixas de transporte), desde que haja contaminação fecal dos mesmos (MOORE et al., 2005).

A infecção por *Campylobacter* em frangos gera alto nível de colonização do trato intestinal e sua relação com as demais bactérias intestinais é aparentemente comensal, com pouca ou nenhuma patologia (SMITH et al., 2008). A relação de

comensalismo do *Campylobacter* em frangos gera dúvidas em virtude do aparecimento de resposta imune e da capacidade de invadir e persistir em órgãos internos da ave. Porém, Line et al. (2008) relatam que, para colonização em frangos de corte a quantidade de unidades formadoras de colônia (UFC) está aproximadamente entre 35 e 104 UFC e, mesmo para níveis maiores de UFC, é possível um pequeno nível de invasão das células do trato intestinal sem ocorrência de patologias para a ave.

A partir da colonização intestinal das aves bem como a excreção de *Campylobacter* para o ambiente, a disseminação é rápida, podendo atingir o lote em sua totalidade em um curto período de tempo antecedendo o abate, sendo mais frequente a partir da segunda semana de vida das aves (GREGORY et al., 1997; BULL et al., 2006).

A alta capacidade de *Campylobacter* spp. sobreviver por períodos extensos no ambiente e nas aves é responsável pela facilidade de disseminação de tal patógeno para lotes subsequentes (EVANS; SAYERS, 2000).

O controle do *Campylobacter* na avicultura envolve medidas em toda cadeia produtiva de aves de corte a fim de reduzir a ocorrência de surtos de campilobacteriose. Na indústria, as práticas adotadas buscam a redução da contaminação das carcaças por conteúdo intestinal durante a evisceração. Kuana (2004) coletou carcaças em frigorífico após a depenadeira e chiller, sendo que estas apresentaram altas frequências de *Campylobacter* spp., identificando estes procedimentos como pontos críticos para a contaminação das carcaças.

Também são necessárias boas práticas de manuseio e preparo da carne de aves pelos consumidores para a prevenção da campilobacteriose (VAZ, 2008).

À campo, busca-se a redução da colonização do trato intestinal das aves, visto que a transmissão horizontal do patógeno mostra-se como a mais eficiente (NEWELL; FEARLEY, 2003). A água de bebida das aves é local de sobrevivência de *Campylobacter* spp., tornando esta uma fonte de contaminação das aves. O ambiente produtivo bem como seus equipamentos dotados de padrões higiênicos deficientes podem permitir a disseminação, podendo ser introduzido em lotes ou persistir em ciclos de produção sucessivos (EVANS; SAYERS, 2000).

A atividade humana, veículos, animais domésticos e silvestres também podem carregar *Campylobacter* spp. para instalações avícolas (NEWELL; FEARLEY, 2003),

além das práticas de limpeza e desinfecção entre lotes, medidas de biossegurança devem ser adotadas na prevenção da contaminação de lotes de frangos de corte (PATTISON, 2001).

As considerações expostas conduzem aos objetivos do presente estudo: avaliar a eficiência do programa de limpeza e desinfecção na eliminação e possível persistência de *Campylobacter Jejuni* das instalações de frangos de corte, em lotes previamente inoculados com *Campylobacter Jejuni* cepa atcc 33560 e caracterizar as cepas de *Campylobacter Jejuni* possivelmente presentes no ambiente em questão.

10 MATERIAL E MÉTODOS

10.1 PERÍODO EXPERIMENTAL E TRATAMENTOS

O período experimental foi composto de dois lotes subsequentes de frangos de corte, com intervalo entre lotes de 8 dias. Em ambos, foram utilizados 960 pintos de um dia de idade distribuídos em 32 boxes providos de cama nova, criados de 1 a 42 dias de idade.

No primeiro alojamento todos os animais foram inoculados oralmente, no décimo primeiro dia de vida, com 10^5 ufc/mL de *Campylobacter jejuni* cepa (atcc 33560), determinada como alta dose por Chaveerach et al. (2004), a fim de realizar a colonização do trato gastrointestinal das aves e posterior eliminação do agente para o ambiente experimental, contaminando-o e criando o desafio sanitário.

Aos 42 dias as aves e a cama foram retiradas e foram iniciados os procedimentos de limpeza e desinfecção.

O galpão recebeu dois tratamentos de limpeza e desinfecção, sendo que cada tratamento foi realizado em 16 boxes, fisicamente separados por uma antessala que isolou cada um dos tratamentos.

Os tratamentos experimentais foram:

Proposto

1. Limpeza e desinfecção do sistema de fornecimento de água: lavagem da caixa d'água e posterior aplicação de desinfetante ácido composto por ácido peracético 100g / kg e Benzil-(C12-C16) cloro-alkyl dimetilamonio 80g/ kg na concentração 0.5%. O produto foi adicionado à água da caixa d'água e permaneceu durante 12 horas. Posteriormente, foi escoado pelo sistema de encanamento, através dos gatilhos dos bebedouros.
2. Limpeza seca: retirada de todos os equipamentos do galpão, retirada da cama e varrição das instalações.
3. Limpeza úmida: foi realizada umidificação do galpão e posterior lavagem com água sob alta pressão.

4. Lavagem de todos os equipamentos utilizados no galpão (bebedouros, comedouros, baldes, botas, bandejas, etc) com água sob alta pressão.
5. Aplicação do detergente alcalino em solução de 4% sobre todas as superfícies (teto, paredes, piso, cortinas) internas e externas, objetos e equipamentos (bebedouros, comedouros, baldes, botas, bandejas, e demais utensílios). Enxaguar com água sob alta pressão.
6. Aplicação do detergente ácido em solução a 4% sobre todas as superfícies (teto, paredes, piso, cortinas) internas e externas, objetos e equipamentos (bebedouros, comedouros, baldes, botas, bandejas, e demais utensílios). Enxague com água sob alta pressão.
7. Secagem do ambiente – parcialmente seco, sem poças d'água.
8. Aplicação do desinfetante composto de glutaraldeído 250g/L e formaldeído 185g/L na concentração 0,5% com bomba costal.
9. Aplicação do desinfetante composto de paraclorometacresol 210 g/L na concentração 4% apenas no piso e paredes até 0,5m de altura.
10. Os equipamentos (bebedouros, comedouros, baldes, botas, bandejas, etc) foram desinfetados após sua secagem, da mesma maneira que as demais superfícies como descrito a partir do item 8.

Comum

1. Varredura e retirada de matéria orgânica do ambiente.
2. Lavagem de equipamentos (comedouros, bebedouros, baldes, botas etc.) com detergente neutro.
3. Umidificação e lavagem do ambiente com água e detergente neutro.
4. Secagem do ambiente.

No segundo alojamento, 960 aves foram divididas em 32 boxes, 16 boxes para cada um dos tratamentos, isolados, com 30 aves cada com densidade populacional de 30 aves/m²

Durante o período experimental foram realizadas análises microbiológicas a partir de amostras de suabe de cloaca das aves, das superfícies do piso, paredes, bebedouros, comedouros e água de bebida das aves. O cultivo microbiológico foi feito a fim avaliar a presença de *Campylobacter* spp. nas amostras.

10.2 COLETA DE AMOSTRAS – AMBIENTE DE CRIAÇÃO

No primeiro alojamento:

Foram coletadas amostras por suabe de cloaca, pisos, paredes, bebedouros e água, antes da inoculação (10º dia de vida), 3 dias após a inoculação (14º dia de vida), 28º e 42º dias de vida das aves.

As coletas foram feitas a fim de se detectar a presença de *Campylobacter jejuni* (cepa previamente inoculada) no ambiente e a contaminação do mesmo.

A partir das amostras coletadas foi realizada a identificação de *Campylobacter* spp.

No segundo alojamento:

Foram realizadas coletas antes e depois dos procedimentos de limpeza e desinfecção em pisos, paredes, bebedouros e água. Foi realizada identificação de *Campylobacter* spp. para todas as amostras coletadas.

Após a chegada das aves, foi feito monitoramento das mesmas através de suabe de cloaca para a presença de *Campylobacter* spp. Foram coletadas amostras no dia seguinte ao recebimento, aos 11 dias de vida e aos 42 dias de vida. Nestes mesmos dias foram feitas coletas de pisos, paredes, bebedouros e da água para avaliação da presença de *Campylobacter* spp.

Pontos de coletas:

Foram coletadas amostras por suabe de pisos, paredes, comedouros e bebedouros. Cada ponto avaliado tinha 2cm x 5cm totalizando 10cm².

A água foi amostrada coletando-se 200mL provenientes da bacia coletora dos bebedouros pendulares. Em todos pontos avaliados foram coletadas amostras de 5 boxes de cada tratamento.

Foi realizado suabe de cloaca de .5 aves por tratamento.

10.3 COLETA DE AMOSTRAS – ABATE E CARÇAÇAS

Ao 42º segundo dia de vida das aves foi realizada coleta de suabe de cloaca e identificação de 40 aves para avaliação microbiológica quanto a presença de *Campylobacter* spp. em carcaças de frangos de corte criados nos ambientes com diferentes programas de limpeza e desinfecção.

Após a realização dos suabes, as aves foram submetidas ao processo de abate no Abatedouro Experimental da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo no Campus de Pirassununga, de maneira convencional com insensibilização, sangria, escalda, depenagem e evisceração e resfriamento das carcaças.

Para avaliação da presença de *Campylobacter* spp. nas carcaças de frango provenientes do experimento foram abatidas 20 aves de cada tratamento. As coletas foram realizadas em duas fases do abate: após a depenagem e após o chiller. Em cada uma destas fases foram coletadas 10 carcaças de cada tratamento. Foi ainda coletada água do chiller antes do início dos abates a fim de se avaliar a qualidade microbiológica desta, a água foi coletada em frasco estéril diretamente do chiller.

O abate foi realizado em 2 dias diferentes, no primeiro dia foram abatidas as aves provenientes do tratamento Proposto; no segundo, foram abatidas as aves do tratamento Comum. Este procedimento visou evitar contaminação cruzada entre os tratamentos.

As coletas realizadas em 2 diferentes fases do procedimento do abate visaram avaliar a influência destes procedimentos na qualidade microbiológica da carcaça.

As carcaças coletadas foram colocadas em sacos plásticos estéreis, acondicionadas em caixas isotérmicas providas de gelo e posteriormente levadas ao Laboratório Multiusuário de Microbiologia da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da USP, Campus Pirassununga, para análise microbiológica (Figura 7).

As carcaças coletadas foram submetidas a rinsagem (Figura 8) com água peptonada a 1% em sacos plásticos estéreis e agitação manual com cuidado para homogeneizar toda a superfície da carcaça. A metodologia proposta obedeceu a Kuana (2004).

A água peptonada foi transferida para frascos estéreis e, posteriormente, foi realizada a cultura em meio de cultivo específico e identificação como descrito no item 12.4.4.

Figura 7 - Coleta das aves no momento do abate

Fonte: acervo pessoal

Figura 8 - Procedimentos de rinsagem das carcaças

Fonte: acervo pessoal

10.4 CAMPYLOBACTER SPP. - CULTIVO POR ISOLAMENTO DIRETO

O isolamento direto demonstrou ser um método prático e eficaz no isolamento de *Campylobacter* spp. de acordo com Kuana (2004). Desta maneira, a metodologia das análises a seguir citadas foi adaptada do mesmo autor.

Para o isolamento direto de *Campylobacter* spp. foi utilizado o meio de cultivo mCCDA (CM739, Oxoid) juntamente com o suplemento seletivo (SR155, Oxoid).

Foi realizada a inoculação de 0,1mL das soluções obtidas das amostras coletadas em placas de Petri contendo o meio mCCDA (CM739, Oxoid). Posteriormente, foram incubados em ambiente com atmosfera modificada de microaerofilia com 5% de O₂ 10% CO₂ e 85% N₂, a 42°C por 48h em jarras para atmosferas especiais (Probac do Brasil). O ambiente de microaerofilia foi criado com o uso do gerador atmosférico Microarobac (Probac do Brasil) (Figura 7).

Figura 9 - Meio de cultivo MCCDA com crescimento de colônias características de *Campylobacter* spp.

Fonte: acervo pessoal

10.5 CAMPYLOBACTER SPP. - IDENTIFICAÇÃO PRESUNTIVA

Foram selecionadas aleatoriamente 1 a 3 colônias suspeitas de *Campylobacter* spp., as quais foram submetidas à coloração de Gram a fim de diferenciar bacilos em forma de S ou espiral. Também foram realizadas a prova da oxidase e catalase. As colônias com características compatíveis com a morfologia de *Campylobacter* spp. foram coletadas para posterior ensaio de PCR.

10.6 CAMPYLOBACTER SPP. ENSAIO DE PCR.

A finalidade do teste de PCR foi distinguir a espécie de *Campylobacter* nas amostras positivas provenientes do cultivo microbiológico.

Para o ensaio foram retiradas cinco colônias típicas das amostras positivas para *Campylobacter* spp. de um mesmo ponto amostral. As colônias foram submetidas à extração de DNA bacteriano, através da técnica de choque térmico adaptada de Fang e Hedin (2003). Foi transferida uma alçada da colônia de interesse para microtubos com 1 mL de água MiliQ, homogeneizado e uma alíquota de 100 µL foi centrifugada a $12000 \times g$ por 10 min, descartado-se o sobrenadante e ressuspendendo o sedimento em 100 µL de água MilliQ que foi vortexado vigorosamente, incubado a 95°C por 10 min, novamente vortexado vigorosamente, centrifugado por 5 minutos a $14000 \times g$ e aliquoteado o sobrenadante (Figura 8). Os substratos foram congeladas à -20°C para serem utilizados nas reações de PCR.

A técnica de PCR utilizada foi multiplex, baseada na técnica proposta por Klena et al. (2005). Foram utilizados pares de primers para *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter lari* e *Campylobacter Upsaliensis* para amplificação dos segmentos de DNA presentes em cada uma das espécies citadas. Os primers específicos apresentaram como gene-alvo o *lpxA*. Para *Campylobacter coli* foram utilizados os primers *lpxAColi* e *lpxARKK2m*; para *Campylobacter jejuni* os primers *lpxAJej* e *lpxARKK2m*; para *Campylobacter lari* foram utilizados os primers *lpxALari* e *lpxARKK2m* e para *Campylobacter upsaliensis* foram utilizados os primers *lpxAUps* e *lpxARKK2m*.

As amplificações foram conduzidas em um volume de 25 µL contendo 1,25 µL de tampão de reação 5x Collorless GoTaq Flexi Buffer, 2 µL de MgCl₂, 0,5 µL de dNTP, 1 µL de cada primer (*lpxAColi*, *lpxAJej*, *lpxALari*, *lpxAUps*), 3 µL do primer *lpxARKK2m*, 0,25 U de GoTaq DNA Polymerase (Promega, Madison, WI, USA), 11 µL de água livre de nucleases e 3 µL de DNA.

As amplificações foram efetuadas em termociclador, programado para um ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 2 min., seguido de 40 ciclos com desnaturação a 94°C, 1 min; anelamento a 52°C, 1 min; extensão a 72°C, 1 min., e com extensão final a 72°C, 5 min. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de

agarose a 3% (Figura 9), coloração com SybrGold (Invitrogen ®) (0,1 µL/ml) e visualizados em transiluminador UV (BioAgency). Os tamanhos dos produtos foram determinados pela comparação ao padrão de migração eletroforética de um marcador de tamanho molecular de 100 pb (GE Healthcare, EUA).

O DNA utilizado nos ensaios de PCR foi proveniente de um pool de 3 colônias provenientes do mesmo ponto amostral. Quando este pool demonstrou resultado negativo ou presença de bandas com tamanho incompatível com *Campylobacter* spp, o ponto amostral era novamente avaliado com um pool das outras duas colônias previamente coletadas.

Como controle negativo foi utilizada água livre de nucleases, e como controle positivo a cepa de *Campylobacter jejuni* (ATCC 33560), a mesma utilizada na contaminação do ambiente.

As amostras com padrão de migração eletroforética compatível com o controle positivo foram encaminhadas para sequenciamento genômico.

Figura 10 - Seleção de colônias de *Campylobacter* em meio MCCDA para extração de DNA

Fonte: acervo pessoal

Figura 11 - Realização de eletroforese em gel de agarose

Fonte: acervo pessoal

10.7 PREPARO DE AMOSTRAS PARA SEQUENCIAMENTO

Para as amostras com tamanho de banda compatível com *Campylobacter jejuni* foi realizada a extração dos fragmentos de DNA dos géis de agarose, após reamplificação do produto de PCR, como descrito no item 12.6. Foi utilizado o Kit QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, USA), segundo as recomendações do fabricante. O procedimento de extração de DNA envolveu o excisão do fragmento do gel de agarose, com lamínula de vidro estéril e acondicionamento em microtubo estéril. Posteriormente, o fragmento foi pesado em balança analítica, para determinação da quantidade do reagente Buffer TE a ser adicionada ao microtubo com fragmento de DNA. Os microtubos contendo o fragmento e o reagente foram incubados a 95°C por 10 minutos, sendo homogeneizadas a cada 2 a 3 minutos. Após a incubação foi adicionado álcool isopropílico em volume equivalente (μ l) ao peso do fragmento. Posteriormente, a amostra foi aplicada em coluna com membrana de sílica, apoiada em tubo coletor. As colunas e os tubos coletores foram centrifugados por 1 minuto a 11.000 x g, em temperatura ambiente. Descartou-se o que passou pela membrana, repetindo-se esta operação até que todo o conteúdo proveniente da amostra passasse pela membrana.

Foram adicionados 500µl do tampão Buffer TE nas colunas e novamente centrifugados, para extração de possíveis impurezas. Posteriormente, foi utilizado o tampão Buffer PE Wash Buffer para lavagem da coluna e centrifugação da mesma por 1 minuto a $11.000 \times g$, em temperatura ambiente. O eluato foi descartado e a coluna com a membrana foi submetida a uma nova centrifugação a por 1 minuto a $11.000 \times g$, em temperatura ambiente para secagem. Finalizando o processo, o DNA foi eluído com 20µl de Elution Buffer em microtubo estéril, deixando-se a coluna em repouso por 2 minutos sendo na sequência submetido a centrifugação por 1 minuto a $11.000 \times g$, em temperatura ambiente.

Após este procedimento o DNA obtido foi quantificado nanogramas/microlitros (ng/µl) por espectrofotometria (DeNovix), com objetivo de determinar a quantidade de DNA em cada amostra, pois as amostras para sequenciamento precisam apresentar a concentração mínima de 20ng/µL.

10.8 SEQUENCIAMENTO

As reações de sequenciamento foram realizadas com a utilização do BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems, Life Technologies, USA) contendo AmpliTaq DNA Polymerase, de acordo com as especificações do fabricante, e dos primers senso e antissenso. As reações foram preparadas em microplacas de 96 cavidades (MicroAmp® Optical 96 wells, Applied Biosystems, Life Technologies, USA) e o sequenciamento foi realizado em sequenciador automático Applied Biosystems, 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems, Life Technologies, USA) pelo Setor de Sequenciamento de DNA do Centro de Estudos do Genoma Humano do Instituto de Biologia da Universidade de São Paulo (IB-USP).

10.9 ALINHAMENTO DE SEQUÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS

A busca das sequências-consenso geradas com o programa CAP 3 Contig (HUANG; MADAN, 1999) e editadas com o programa BioEdit 7.0.9 (HALL et al., 1999) foi realizada pelo programa BLAST versão 2.0 (ALTSCHUL et al., 1997). A edição e alinhamento múltiplo das sequências nucleotídicas obtidas, juntamente com outras depositadas no GeneBank (Quadro 1), foram realizadas com o programa ClustalW versão 1.4 (THOMPSON et al., 1994), implementado no programa BioEdit Sequence Alignment Editor versão 7.0.9 (HALL et al., 1999), utilizando-se para tanto dos parâmetros “default”. Matrizes de distâncias, dadas em porcentagens de similaridade/identidade, entre as sequências nucleotídicas foram calculadas através do programa MatGAT versão 2.0 (CAMPANELLA et al., 2003), utilizando algoritmo de alinhamento global.

10.10 ANÁLISE FILOGENÉTICA

Reconstruções filogenéticas para sequências de 213 nucleotídeos, relativas ao gene *lpxA* foram realizadas através do algoritmo de máxima verossimilhança e modelo de substituição Jukes e Cantor (JC) com suporte nodal de *bootstrap* para 1000 pseudo-réplicas, utilizando-se o programa MEGA 5.0 (TAMURA et al., 2013). Para as reconstruções foram utilizadas outras sequências de *Campilobacter* spp. depositadas no GenBank, conforme indicado na tabela.

10.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados das análises microbiológicas foram submetidos a testes não paramétricos devido aos dados não atenderem às premissas de homogeneidade das variâncias e normalidades dos resíduos estudentizados. Foi utilizado o PROC FREQ

(SAS, 2008) para avaliar diferentes frequências de ocorrência de *Campylobacter* nas amostras.

Quadro 1 - Sequências nucleotídicas de *Campylobacter* spp. utilizadas para reconstrução filogenética com indicação do genótipo, nome, origem e respectivos números de acesso no GenBank

Especie	Isolado	Origem	Nº acesso Genbank
<i>Campylobacter jejuni</i>	NCTC 11168	Reino Unido	AL111168
	RM 3668	Califórnia	AY531515
	F 38011	Arizona	AY531520
	KLC2851	N. Zelândia	AY531522
	RM 3664	Califórnia	AY531519
<i>Campylobacter coli</i>	RM 1878		AY531493
	RM 1858		AY531495
	RM 1865		AY531494
	RM 1857		AY531496
	WA 27	N. Zelândia	AY531510
	RM 3232		AY531504
	RM 1896	USA	AY531492
<i>Campylobacter Lari</i>	RM 3659	Reino Unido	AY531477
	RM 2825	Canadá	AY531479
	RM 2824	Reino Unido	AY598984
	RM 2819	Canadá	AY531485
	RM 2822		AY531482
	RM 2100	Estados Unidos	AY531474
	RM 2823	Canadá	AY531481
	RM 1890		AY531476
<i>Campylobacter Upsaliensis</i>	RM 3195	África do Sul	AY531473
	RM 2093		AY598987
	RM 2089		AY531472
	RM 1488	Canadá	AY531471
<i>Helicobacter hepaticus</i>	ATCC 51449	Estados Unidos	DN202995

11 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 5 estão apresentadas as frequências de ocorrência de *Campylobacter* spp. nas amostras coletadas.

Tabela 5 - Frequência de *Campylobacter* spp. nas amostras coletadas nos alojamentos 1 e 2

	Comum	Proposto	P*
Antes Inoculação			
Bebedouro	30% (3/10)	50% (5/10)	0,1138
Água	30% (3/10)	30% (3/10)	1,000
Ave	40% (4/10)	30% (3/10)	0,4902
Piso	20% (2/10)	10% (1/10)	0,4902
Após Inoculação			
Bebedouro	30% (3/10)	50% (5/10)	0,1138
Água	30% (3/10)	40% (4/10)	0,1138
Ave	20% 92/10)	40% (4/10)	0,1967
Piso	10% (1/10)	0% (0/10)	0,2918
Parede	10% (1/10)	0% (0/10)	0,2918
Comedouro	10% (1/10)	0% (0/10)	0,2918
Após Limpeza e Desinfecção			
Bebedouro	30% (3/10)	0% (0/10)	0,0384
Água	10% (1/10)	10% (1/10)	1,000
Ave	30% (3/10)	0% (0/10)	0,0384
Piso	30% (3/10)	0% (0/10)	0,0384
42 dias			
Bebedouro	40% (4/10)	30% (3/10)	0,4902
Água	40% (4/10)	20% 92/10)	0,5257
Ave	30% (3/10)	50% (5/10)	0,2918
Piso	10% (1/10)	10% (1/10)	1,000
Parede	10% (1/10)	10% (1/10)	1,000

*Teste do Qui-Quadrado com nível de significância de 5% ($P < 0,05$)

Antes e após a inoculação não houve diferença significativa para a frequência de *Campylobacter* spp. em nenhum dos pontos amostrados.

Após a limpeza e desinfecção houve maior ocorrência de *Campylobacter* spp. nos bebedouros e nos pisos para aqueles submetidos ao tratamento Comum. As aves alojadas nas instalações após a realização do tratamento Comum também demonstraram maior frequência de ocorrência de *Campylobacter* spp. a partir dos suabes de cloaca 7 dias após o alojamento.

Aos 42 dias de idade das aves não foram encontradas diferenças na frequência de ocorrência de *Campylobacter* spp. em nenhum dos pontos amostrados entre os tratamentos.

A redução da ocorrência de amostras positivas provenientes do ambiente (bebedouros e piso) para *Campylobacter* spp. após a realização do protocolo de limpeza e desinfecção Proposto corrobora com os achados de Van de Gissen et al. (1998) e Newell e Fearnley (2003) quanto a capacidade de redução e eliminação de *Campylobacter* spp. do ambiente, desde que as práticas de higienização sejam corretamente realizadas. Porém, discorda de Bouwknegt et al. (2004) que não encontrou influências deste tipo de protocolo na ocorrência de *Campylobacter* spp. em instalações destinadas a frangos de corte.

Apesar de não diferir entre os grupos de tratamento, a ocorrência de *Campylobacter* spp. na água de bebida das aves mesmo após a realização do tratamento proposto merece atenção. As peças do sistema de água de galpões de frangos de corte demonstram ser locais de formação de biofilme e a água em constante contato com a tubulação fornece condições ideais para sua formação (ARAÚJO et al., 2011).

Bactérias como o *Campylobacter* frequentemente estão associadas com o biofilme (SHI; SZU, 2009). Para eliminar o biofilme, diversos princípios ativos podem ser utilizados como os fenóis, cresóis, aldeídos e agentes oxidantes (SIMÕES et al., 2010), mas as bactérias envolvidas podem ser resistentes, ou ainda a remoção ser incompleta e a bactéria permanecer na superfícies das tubulações

Por ser uma bactéria Gram negativa, *Campylobacter* possui uma maior resistência a ação de desinfetantes (DAHL et al., 1989); ainda, possui um complexo sistema enzimático de resistência ao estresse oxidativo, dentre estas enzimas superoxidimutase, catalase e Citocromo C peroxidase (ATAACK; KELLY, 2009). No presente estudo para a desinfecção do sistema de água foram utilizados ácido peracético e cloreto de benzalcônio, o primeiro um agente oxidante e o segundo um composto de amônia quaternária.

Além da resistência já descrita da bactéria ao princípio ativo utilizado, o biofilme representa resistência adicional às bactérias (CHAPMAN, 2003), pois é capaz de formar uma proteção através de seus componentes, fazendo com que os compostos oxidantes sejam consumidos antes mesmo de entrar em contato com os microrganismos (CHEN; STEWART, 1996). A redução da eficácia do ácido peracético, um agente oxidante, foi também observada por Trachoo e Frank (2002) frente a *Campylobacter* na presença de biofilmes, os mesmos autores ainda observaram que

compostos de amônia quaternária como o cloreto de benzalcônio também tem sua eficácia afetada.

Desta maneira, pode-se possivelmente relacionar a recuperação de *Campylobacter* spp. da água de bebida das aves com as características de resistência desta bactéria. Ainda, tais fatores podem estar relacionados a re-colonização das instalações submetidas ao tratamento Proposto por *Campylobacter* notada aos 42 dias de idade das aves.

De acordo com Newell e Fearnley (2003), a água pode ser considerada uma fonte de contaminação para lotes de frangos, apesar do baixo risco, devido à baixa sobrevivência destas bactérias em água clorada.

Provavelmente, a ausência de *Campylobacter* spp. nas demais amostras após a realização do protocolo Proposto de limpeza e desinfecção está relacionada a baixa resistência de *Campylobacter* spp. a glutaraldeído e formaldeído. Estudos como o de Wang et al. (1983) e Gutiérrez-Martín et al. (2011) também encontraram resultados positivos de sua utilização.

Neste sentido, é importante salientar que a utilização dos desinfetantes deve ser realizada respeitando sempre a diluição e tempo de ação adequados, pois já foram encontradas relações entre a utilização de concentrações sub-inibitórias de desinfetantes e a ocorrência da redução da susceptibilidade ou ainda resistência a antibióticos por bactérias Gram negativas (KARATZAS et al., 2007) como *Campylobacter*, em testes realizados *in vitro*.

Aos 42 dias de idade das aves, não se observou diferença entre a frequência de contaminação por *Campylobacter* para ambos os tratamentos. Esta observação pode estar relacionada a elevada capacidade de disseminação destas bactérias em lotes de aves, da mesma maneira que Knudsen, et al. (2006) observou em seus estudos. Após o contato com a bactéria, as aves tornam-se positivas em 4 a 7 dias.

Além disto, foi encontrada contaminação por *Campylobacter* em amostras provenientes do ambiente, em lotes previamente limpos e desinfetados, considerados negativos para *Campylobacter* spp. Van de Gissen et al. (1998) encontraram amostras positivas para *Campylobacter*. Da mesma maneira, no presente estudo, as instalações submetidas ao tratamento Proposto, aos 42 dias de criação das aves também apresentaram resultados positivos, não diferindo inclusive das instalações do tratamento comum. Ao investigar a origem da contaminação destes lotes, os mesmos

autores encontraram a bactéria em insetos e calçados dos funcionários, sugerindo que mesmo instalações previamente livres de *Campylobacter* spp. podem ser contaminadas durante a permanência das aves devido a fontes de contaminação externas ao galpão. Newell e Fearnley (2003) e Newell et al. (2011) também alertam para a possibilidade de aerossóis, animais silvestres e domésticos como fonte de contaminação.

Estes resultados apontam para a importância das práticas de biossegurança, além da limpeza e desinfecção, na prevenção da ocorrência de *Campylobacter* spp. em lotes de frangos de corte.

Uma possível causa da contaminação das instalações do tratamento Proposto após os procedimentos de limpeza e desinfecção, seria a possibilidade dos pintos de 1 dia através da transmissão vertical já estarem portando *Campylobacter* spp. e com a sua chegada no galpão ocorrer a disseminação da bactéria; porém estudos como o de Jacobs-Reitsma et al. (1995); Petersen et al., (2001); Herman et al. (2003) e Callicott et al. (2006), demonstram que a contribuição deste tipo de transmissão da bactéria é pequena.

Outra possível causa seria a existência de outras aves nos arredores das instalações. O local onde foi conduzido o presente estudo foi o Aviário Experimental da Universidade de São Paulo Campus Pirassununga onde além do galpão usado no presente estudo, existem outros destinados a aves, os quais estavam ocupados no momento da investigação. Esta possibilidade se alinha aos estudos de Berntson et al. (1996) que observaram que a não realização dos procedimentos de todos dentro/todos fora favorece a contaminação dos lotes por *Campylobacter* spp.

De maneira geral, a não realização de procedimentos de higienização pode ser considerado um fator de risco a contaminação de lotes de frangos de corte com *Campylobacter* spp. (EVANS; SAYERS, 2000; BOUWKNEGT et al., 2003; NEWELL et al., 2003; MCDOWELL et al., 2008; NEWELL et al., 2011), porém mesmo com uma eficiente realização de rígidos protocolos limpeza, desinfecção e biossegurança é possível a entrada desta bactéria nas instalações bem como a colonização das aves (VAN de GISSSEN et al., 1998), assim como foi demonstrado no presente estudo.

A Tabela 6 apresenta a frequência da ocorrência de *Campylobacter* spp. nas diferentes fases do abate.

Não foram encontradas diferenças na ocorrência de *Campylobacter* spp. nas aves vivas, após a depenadeira e após o chiller para ambos os tratamentos.

Tabela 6 - Frequência da ocorrência de *Campylobacter* spp. nas diferentes fases do abate

	Comum	Proposto	P*
		Abate	
Aves Vivas	7,5% (3/40)	20% (8/40)	0,0766
Depenadeira	20% (4/20)	5% (1/20)	0,121
Chiller	10% (2/20)	10% (2/20)	1,000

*Teste do Qui-Quadrado com nível de significância de 5% ($P < 0,05$)

Nas diferentes fases de abate, o presente estudo não demonstrou influências dos tratamentos quanto a contaminação das aves carcaças por *Campylobacter* spp., diferentemente de Gibbens et al. (2001) que observaram uma redução significativa na contaminação de carcaças de aves provenientes de ambientes limpos e desinfetados quando comparados aquelas de ambientes sem adoção de tais medidas.

Existe uma notável relação entre a contaminação do ambiente de criação com a presença de *Campylobacter* spp. em carcaças de frangos de corte, sendo que instalações que possuem aves positivas geram carcaças positivas (HERMAN et al., 2003), assim como pode ser observado no presente estudo.

Diferentemente, Kuana et al. (2005) não encontraram correlação positiva entre a contagem de UFC de *Campylobacter* em conteúdo cecal e em carcaças após a depenadeira. Porém, também há a possibilidade da contaminação das aves durante o transporte e práticas do abate (NEWELL et al., 2011).

A evisceração mostra-se um importante fator para a contaminação das carcaças durante o abate (ROSENQUIST et al., 2006; HUE et al., 2010), assim como o uso de água durante todo o processo (PERYAT et al., 2008) que pode carrear as bactérias de uma superfície a outra. Práticas que auxiliem na redução da contaminação pós evisceração podem ainda ser adotadas como a lavagem das carcaças antes do chiller (HERMAN et al., 2003).

Elvers et al. (2006) encontraram pouca modificação do perfil das cepas encontradas em carcaças provenientes de lotes positivos para *Campylobacter*, indicando que se o lote já chegou a planta de abate contaminado, pouca ou nenhuma influência haverá sobre a melhoria da qualidade sanitária destas carcaças; os resultados do presente estudo corroboram com este achado pois aos 42 dias de vida das aves, em ambos os tratamentos foi possível encontrar aves positivas,

consequentemente nas diferentes fases do abate também foram encontradas amostras positivas para os tratamentos Comum e Proposto.

Os procedimentos de depenagem e chiller podem ser considerados pontos críticos para a contaminação de carcaças por *Campylobacter*. Apesar de não ser observada diferença entre os tratamentos Comum e Proposto do presente estudo, é importante ressaltar que de acordo com Kuana et al. (2005) existe uma correlação positiva entre a depena e o chiller, sendo que altas contagens de *Campylobacter* encontradas antes do chiller também serão verificadas após a depena.

Apesar de não ter sido encontrada diferenças significativa na frequência de contaminação de aves de 42 dias e carcaças nos diferentes pontos do abate, entre os tratamentos avaliados no presente estudo, é importante ressaltar que a limpeza e desinfecção e as práticas de biossegurança devem ser adotadas com a finalidade de reduzir o risco da ocorrência de campylobacterioses nos consumidores dos produtos de origem avícola (VAN de GISSEN et al., 1998; GIBBENS et al., 2001; VANDEPLAS et al., 2008; MEUNIER et al., 2016).

Após a realização da análise da frequência de contaminação, as amostras positivas foram submetidas a técnica de PCR sendo que as amostras com padrão de migração eletroforética compatível com o controle positivo foram encaminhadas para sequenciamento genômico, totalizando 54 amostras. Após o sequenciamento foram identificadas apenas 23 amostras como das espécie *Campylobacter* Jejuni. Destas, foram selecionadas 6 amostras e a cepa padrão para a confecção da tabela de similaridade / identidade e árvore filogenética, devido a semelhanças entre as cepas encontradas e qualidade de resultado de sequenciamento.

Figura 12 - Fotografia de gel de agarose corado com SYBER® Gold, sob luz UV, ilustrando resultado de amplificação de fragmentos de 331pb, 391 pb e 331 pb, relativo ao gene *lpxA* do genoma de *Campylobacter*, após a aplicação das técnicas de PCR Multiplex, a partir de cepas padrão. (1) Marcador 100pb, (2) Controle negativo, (3) *C. Jejuni* Cepa ATCC 33560, (4 e 5) *C. Coli* isoladas de fezes de primatas, (6) *C. Lari* NTCC 11352

Fonte: acervo pessoal

Figura 13 - Fotografia de gel de agarose corado com SYBER® Gold, sob luz UV, ilustrando resultado de amplificação de fragmentos de 331bp, 391 pb e 331 pb, relativo ao gene *lpxA* do genoma de *Campylobacter* após a aplicação das técnicas de PCR Multiplex, a partir de amostras ambientais do experimento. (1) Marcador 100pb, (2) Controle negativo, (3) Controle positivo *C. Jejuni* Cepa ATCC 33560, (4) Amostra 517, (5) Amostra 522, (6) Amostra 527 (7) Amostra 537, (8) Amostra 532, (9) Amostra 542 e (10) Amostra 547

Fonte: acervo pessoal

Tabela 7 - Comparação das porcentagens de similaridade (abaixo da diagonal) e identidade (acima da diagonal) das sequências nucleotídicas para fragmentos de 331pb do gene *lpxA* de *Campylobacter jejuni*, entre 6 amostras detectadas por PCR multiplex e posteriormente sequenciadas, e sequências de outros *Campylobacter* recuperadas do GenBank

Isolados	Similarity/Identity (%)																		
	BR597 Cjej	BR212 Cjej	BR1241 Cjej	BR1236 Cjej	BR1206 Cjej	BR1037 Cjej	RM3668 Cjej	RM3664 Cjej	NCTC1116 8Cjej	KLC2851 Cjej	F38011 Cjej	ATCC33560 Cjej	RM3659C lari	RM2825C lari	RM1878C coli	RM1865C coli	RM3195C ups	RM2093C ups	ATCC51449Hhep aticus
BR597Cjej	--	100.0	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	98.6	99.1	99.1	99.5	98.6	74.6	76.1	86.4	86.4	77.0	77.0	52.8
BR212Cjej	100.0	--	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	98.6	99.1	99.1	99.5	98.6	74.6	76.1	86.4	86.4	77.0	77.0	52.8
BR1241Cjej	99.1	99.1	--	100.0	100.0	100.0	100.0	98.6	99.1	99.1	99.5	98.6	75.1	76.5	86.4	86.4	77.0	77.0	52.8
BR1236Cjej	99.1	99.1	100.0	--	100.0	100.0	100.0	98.6	99.1	99.1	99.5	98.6	75.1	76.5	86.4	86.4	77.0	77.0	52.8
BR1206Cjej	99.1	99.1	100.0	100.0	--	100.0	100.0	98.6	99.1	99.1	99.5	98.6	75.1	76.5	86.4	86.4	77.0	77.0	52.8
BR1037Cjej	99.1	99.1	100.0	100.0	100.0	--	100.0	98.6	99.1	99.1	99.5	98.6	75.1	76.5	86.4	86.4	77.0	77.0	52.8
RM3668Cjej	99.1	99.1	100.0	100.0	100.0	100.0	--	98.6	99.1	99.1	99.5	98.6	75.1	76.5	86.4	86.4	77.0	77.0	52.8
RM3664Cjej	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	--	99.5	99.5	99.1	100.0	75.1	76.5	86.9	86.9	77.0	77.9	54.2
NCTC11168 Cjej	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.5	--	100.0	99.5	99.5	75.6	77.0	86.4	86.4	77.5	77.5	53.7
KLC2851Cjej	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.5	100.0	--	99.5	99.5	75.6	77.0	86.4	86.4	77.5	77.5	53.7
F38011Cjej	99.5	99.5	99.5	99.5	99.5	99.5	99.5	99.1	99.5	99.5	--	99.1	75.1	76.5	86.9	86.9	77.5	77.5	53.2
ATCC33560 Cjej	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	100.0	99.5	99.5	99.1	--	75.1	76.5	86.9	86.9	77.0	77.9	54.2
RM3659Clar i	74.6	74.6	75.1	75.1	75.1	75.1	75.1	75.1	75.6	75.6	75.1	75.1	--	94.8	69.0	69.5	72.6	72.6	51.9
RM2825Clar i	76.1	76.1	76.5	76.5	76.5	76.5	76.5	76.5	77.0	77.0	76.5	76.5	94.8	--	71.4	71.4	71.2	72.4	53.7
RM1878Ccol i	86.4	86.4	86.4	86.4	86.4	86.4	86.4	86.9	86.4	86.4	86.9	86.9	69.0	71.4	--	98.1	76.5	77.5	50.7
RM1865Ccol i	86.4	86.4	86.4	86.4	86.4	86.4	86.4	86.9	86.4	86.4	86.9	86.9	69.5	71.4	98.1	--	75.6	76.5	50.7
RM3195Cup s	77.0	77.0	77.0	77.0	77.0	77.0	77.0	77.0	77.5	77.5	77.5	77.0	73.2	71.8	76.5	75.6	--	98.1	54.6
RM2093Cup s	77.0	77.0	77.0	77.0	77.0	77.0	77.0	77.9	77.5	77.5	77.5	77.9	73.2	73.7	77.5	76.5	98.1	--	53.5
ATCC51449 Hhep	53.5	53.5	53.5	53.5	53.5	53.5	53.5	54.9	54.5	54.5	54.0	54.9	52.6	54.5	51.2	51.2	55.4	54.0	--

Figura 14 - Cladograma representando reconstrução filogenética baseada no alinhamento de sequências nucleotídicas referente a amplificação de um fragmento de 340pb do gene *lpxA* de *Campylobacter*

Fonte: acervo pessoal

As sequências obtidas no presente estudo estão em destaque. A barra de escala estima a distância filogenética das sequências de nucleotídeos. A história evolutiva foi inferida utilizando o método da Máxima Verossimilhança baseado no modelo Jukes-Cantor (1969). A árvore inicial para a busca heurística foi obtida por aplicação do método de *Neighbor-Joining* utilizando a abordagem de *Maximum*

Composite Likelihood (MCL). A análise envolveu 35 sequências de nucleótidos. Todas as posições contendo lacunas e dados ausentes foram eliminados. Houve um total de 210 posições no conjunto de dados final. As análises foram realizadas no MEGA6. Os valores de bootstrap para 1000 pseudo-réplicas estão indicados juntos aos nós (Quadro 2).

Quadro 2 - Legenda das amostras sequenciadas utilizadas na confecção da árvore filogenética

Identificação	Local da Amostragem
BR212Cjej	ave 12 - ambiente inicial
BR597 Cjej	ave 3 - após receber o inóculo
BR1241Cjej	ave 3 - 42 dias trat proposto
BR1236Cjej	ave 30 - 42 dias trat comum
BR1037Cjej	ave 1 depena trat proposto
BR1206Cjej	ave 2 chiller - trat proposto

Os resultados do sequenciamento indicaram resultado confirmatório para *Campylobacter Jejuni* para aproximadamente 43%(23/54) das amostras. Tais resultados de detecção estão abaixo do esperado pelo meio de cultivo mCCDA (CM739, Oxoid) juntamente com o suplemento seletivo (SR155, Oxoid), sendo que o fabricante indica cerca de 91% de sensibilidade do meio.

Foram encontradas outras enterobactérias após o sequenciamento como: *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter asburiae* e *E.Coli*, as quais deveriam ter seu crescimento inibido pelo uso do suplemento seletivo. Assim como no presente estudo, Chon et al. (2011) observou baixa sensibilidade e seletividade deste meio, principalmente quando a microflora da amostra era abundante.

Estas observações discordam de numerosos estudos os quais apontam que o meio mCCDA é o mais eficiente na detecção de *Campylobacter* (BOLTON et al., 1983; BOLTON et al., 1986; MERINO et al., 1986; ONU et al., 1995; PIERSIMONI et al., 1995). Aspinall et al. (1993) relataram boa eficiência deste meio, porém em cerca de 1% das amostras observou alta contaminação. Bolton et al. (1996) encontraram 13% de contaminação quando avaliaram amostras de fezes humanas. Line et al. (2001) alertaram que a coloração escura do meio mCCDA pode dificultar na seleção de colônias translúcidas, características de *Campylobacter* spp., induzindo a seleção incorreta das mesmas para posterior análise.

A técnica de PCR multiplex utilizada no presente estudo foi baseada na metodologia proposta por Klena et al. (2004), a qual utiliza o gene *lpxA* na

diferenciação das espécies de *Campylobacter* spp. (*C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* e *C. upsaliensis*). O gene *lpxA* codifica a enzima *LpxA*, passo inicial da produção do lipídio A, molécula essencial do sistema LPS, presente nas bactérias do gênero *Campylobacter*. Este gene está presente em diversas bactérias Gram negativas (WECKESSER; MAYER, 1988) como *E. coli*, *Salmonella* spp., sendo estas duas bastante estudadas para elucidação dos mecanismos biológicos do sistema LPS.

Além destas bactérias, o gene *lpxA* também foi encontrado em *Neisseria meningitidis* (ODEGAARD et al., 1997), *Pseudomonas aeruginosa* (DOTSON et al., 1998), *Enterobacter asburiae* (OSEI SEKYERE et al., 2016), *Enterobacter cloacae* (MCGANN et al., 2015) *Escherichia fergusonii* (TOUCHON et al., 2009).

No presente estudo algumas amostras submetidas a eletroforese e obtiveram padrões de bandas com tamanho de fragmentos compatíveis com *Campylobacter* spp., Tais amostras foram enviadas para sequenciamento e foram indicadas como *E. Coli* e *Enterobacter ssp.*

Tais resultados podem estar relacionados com a presença do gene *lpxA* nestas bactérias. Klena et al. (2004) relatam alta sensibilidade (97%) e especificidade (100%) da técnica frente a *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* e *Campylobacter upsaliensis* e a diversas espécies de bactérias testadas, porém aquelas que foram encontradas no presente estudo não fazem parte das espécies detectadas por Klena et al. (2004).

No entanto, Debruyne et al. (2008) em seus estudos encontraram cerca de 77% de especificidade do mesmo teste frente a cepas não alvo, resultados estes mais próximos ao que foram encontrados no presente estudo.

Um outro fato a ser considerado para os resultados do presente estudo é a possibilidade da troca de informação genética entre as bactérias da microbiota ambiental através de plasmídios, transposons e ainda sequências de inserção gênica. Fouts et al. (2005) ao estudar o genoma de algumas cepas de *Campylobacter* encontrou nestas bactérias plasmídios envolvidos na transferência e secreção de fatores de virulência e sequências de inserção no DNA cromossomal e plasmideal.

Sendo o gene utilizado, o *lpxA* pertencente ao fator de virulência LOS de *Campylobacter*, é possível que tenha ocorrido algum tipo de transferência genética lateral, tornando possível que os primers utilizados na reação de PCR multiplex, específicos para as espécies de *Campylobacter* (*Jejuni*, *Coli*, *Lari* e *Upsaliensis*),

tenham interagido com sequências similares, porém em outras bactérias como *E. Coli* e *Enterobacter* spp. também identificados após o sequenciamento no presente estudo.

Moffat et al. (2011) ao estudar *Acinetobacter baumannii*, bactéria que possui o gene *lpxA*, encontraram um elemento de inserção gênica neste mesmo gene, demonstrando que bactérias que possuem este gene podem realizar transferências genéticas laterais. Neste mesmo estudo, a sequência de inserção estudada estava relacionada a resistência a antibióticos de *Acinetobacter baumannii*, o que pode significar um grave problema a saúde pública.

Em *Campylobacter* a composição do LPS, codificado por diversos genes incluindo o *lpxA*, também está relacionado com a resistência a antibióticos (VAN MOURIK et al., 2010). Desta maneira é importante ressaltar que assim como relatado por (POTRON et al., 2015) para *A. Baumannii*, *Campylobacter* ao possuir a possibilidade de transferência lateral de genes pode exercer um importante papel na disseminação de genes de resistência a antibióticos para outros microrganismos Gram negativos.

A Tabela 7 demonstra as porcentagens de similaridade (abaixo da diagonal) e identidade (acima da diagonal) das sequências de nucleotídeos entre as 6 amostras sequenciadas e selecionadas e as sequências de referência para *Campylobacter* depositadas no GenBank. Nesta tabela pode ser observado o alto grau de similaridade entre as amostras obtidas no presente estudo, variando entre 99,1 a 100%. Além disso todas as amostras possuem um alto grau de similaridade 98,6% com a cepa padrão ATCC 33560. O mesmo ocorre com a identidade entre as amostras, 99,1 a 100% entre amostras e 98,6 com a cepa padrão.

Quando as amostras foram comparadas com as outras espécies de *Campylobacter*, há uma menor similaridade e identidade, que variou de 69 a 86,9% para ambos. Quando comparado ao *Helicobacter hepaticus* os valores foram de 53,5% para similaridade e 52,8% para identidade.

O presente estudo corrobora com Lucien (2012) que também encontrou alto grau de similaridade e identidade de suas amostras identificadas como *Campylobacter jejuni* com a cepa padrão ATCC 33560, variando entre 98 e 99%, ao avaliar o gene *tuf* destas bactérias. Ao comparar as cepas das demais espécies de *Campylobacter* (*Coli*, *Lari* e *Upsliensis*) com as cepas encontradas de *Campylobacter jejuni*, nota-se

uma redução da destes parâmetros entre elas, variando entre 83% e 93% de identidade, também alinhando-se aos resultados do presente estudo.

A figura 14 ilustra o cladograma obtido da reconstrução filogenética de nucleotídeos para as sequências de *Campylobacter*. As amostras sequenciadas no presente estudo puderam ser agrupadas em 2 subclados de *Campylobacter jejuni*. As amostras e a cepa padrão ATCC 33560 fazem parte de um mesmo clado monofilético. O número de *bootstrap* das amostras variou entre 62 e 72%.

Em linhas gerais as cepas das amostras são bastante semelhantes entre si, pois estão bastante próximas umas das outras no cladograma para o gene *lpxA*; da mesma maneira os altos índices de similaridade e identidade obtidos na respectiva tabela demonstram tal semelhança. Já as amostras em relação a cepa padrão há um discreto distanciamento no cladograma, e menores índices de similaridade e especificidade, indicando que apesar haver diferenças entre estas cepas, ela é muito pequena.

No presente estudo foi possível a observação de quatro clados distintos, sendo um para cada uma das espécies de *Campylobacter* estudadas, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter lari*, e *Campylobacter upsiliensis*, da mesma maneira que Kaarenlampi et al. (2004) ao estudarem o gene *groEL*, Klena et al. (2004) ao estudarem o gene *lpxa*, Hill et al. (2006) ao estudarem o gene *cpn60*, e Lucien (2012) ao estudarem o gene *tuf*, todos estes para a reconstrução filogenética de *Campylobacter* spp.

Porém, os presentes resultados divergem de Clark et al. (2007) ao estudar o gene *PoorA* agrupa as espécies *C. Coli* e *C. Jejuni* em um mesmo clado, obtendo apenas três clados no total.

Os resultados obtidos demonstram que as cepas de *Campylobacter jejuni* circulantes no ambiente experimental avaliado possuem grande semelhança àquelas que puderam ser encontradas em diferentes países e tipos de amostras, possibilitando-se observar que mesmo com uma grande diversidade de cepas de *Campylobacter jejuni*, estes possuem similaridade genética entre si, conferindo robustez as metodologias utilizadas na sua identificação e reconstrução filogenética.

Embora esperada a recuperação da cepa padrão ATCC 33560 nas amostras provenientes do presente experimento, visto que foi utilizada para a inoculação das aves, não se obteve nenhuma amostra assim identificada após o sequenciamento. Tal

resultado pode estar relacionado a uma reduzida adaptação ao ambiente, ou ainda a competição com as demais *Campylobacter Jejuni*, comprovadamente presentes no ambiente do presente estudo, inibindo um possível crescimento da cepa padrão ATCC 33560.

Cawthraw et al. (1996) relata a fragilidade das bactérias provenientes de culturas *in vitro*, as condições laboratoriais as quais estão submetidas diferem do ambiente *in vivo*, podendo reduzir sua resistência, fatores de adesão, motilidade e virulência (RINGOIR; KOROLIK, 2002). Ainda há a possibilidade da ocorrência de rearranjo genômico, inserções, deleções ou mutações no DNA de *Campylobacter jejuni*, assim como descrito por Wassenaar et al. (1998); Hänninen et al. (1999) e de Boer et al. (2002), incorrendo em modificações nestes mesmos fatores.

12 CONCLUSÃO

O tratamento Proposto mostra-se capaz de eliminar *Campylobacter* do ambiente produtivo em pisos e bebedouros, sendo que o mesmo não foi verificado para a água. Já o tratamento comum não demonstra eficiência na eliminação da bactéria.

Os tratamentos Proposto e Comum não influencia a frequência de ocorrência de *Campylobacter* aos 42 dias de idade das aves e no momento do abate.

Foi possível a identificação de seis diferentes cepas de *Campylobacter jejuni*, as quais ocupam um mesmo clado filogenético, sendo efetivamente diferenciadas com altos valores de suporte nodal associados das demais espécies de *Campylobacter* com às quais foram comparadas.

REFERÊNCIAS

- ALTER, T.; SCHERER, K. Stress response of *Campylobacter* spp. and its role in food processing. **Journal of Veterinary Medicine**, n. 53, p. 351-357, 2006.
- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, n. 25, p. 3389-3402, 1997.
- ARAÚJO, P.; LEMOS, M.; MERGULHÃO, F.; MELO, L.; SIMÕES, M. Antimicrobial resistance to disinfectants in biofilms. In: MENDEZ-VILLA, A. **Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances**. Badajoz, Spain: Formatex Research Centre, 2011. v. 1, p. 826-834.
- ASPINALL, S. T.; WAREING, D. R.; HAYWARD, P. G.; HUTCHINSON, D. N. Selective medium for thermophilic campylobacters including *Campylobacter upsaliensis*. **Journal of Clinical Pathology**, v. 9, n. 46, p. 829-831, 1993.
- ATAK, J. M.; KELLY, D. J. Oxidative stress in *Campylobacter jejuni*: responses, resistance and regulation. **Future Microbiology**, v. 4, n. 6, p. 677-690, 2009.
- BERNDTSON, E.; DANIELSSON-THAM, M. L.; ENGVALL, A. *Campylobacter* incidence on a chicken farm and the spread of *Campylobacter* during the slaughter process. **International Journal of Food Microbiology**, v. 32, n. 1, p. 35-47, 1996.
- BOLTON, F. J.; COATES, D.; HINCHLIFFE, P. M.; ROBERTSON, L. Comparison of selective media for isolation of *Campylobacter jejuni/coli*. **Journal Of Clinical Pathology**, n. 36, v.1, p.78-83, 1983.
- BOLTON, F. J.; HUTCHINSON, D. N.; COATES, D. Comparison of three selective agars for isolation of campylobacters. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 4, n. 5, p. 466-468, 1986.
- BOUWKNEGT, M.; VAN DE GIESSEN, A. W.; DAM-DEISZ, W. D. C.; HAVELAAR, A. H.; NAGELKERKE, N. J. D.; HENKEN, A. M. Risk factors for the presence of *Campylobacter* spp. in Dutch broiler flocks. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 1, n. 62, p. 35-49, 2004.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual integrado de vigilância, prevenção e controle de doenças transmitidas por alimentos**. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2010. 158 p. (Série A. Normas e manuais técnicos).
- BULL, S. A.; ALLEN, V. M.; DOMINGUE, G.; JØRGENSEN, F.; FROST, J. A.; URE, R.; HUMPHREY, T. J. Sources of *Campylobacter* spp. colonizing housed broiler flocks during rearing. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 1, p. 645-652, 2006.

CALLICOTT, K. A.; FRIÐRIKSDÓTTIR, V.; REIERSEN, J.; LOWMAN, R.; BISAILLON, J. R.; GUNNARSSON, E.; STERN, N. J. Lack of evidence for vertical transmission of *Campylobacter* spp. in chickens. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 9, p. 5794-5798, 2006.

CAMPANELLA, J. J.; BITINCKA, L.; SMALLEY, J. Mat GAT: an application that generates similarity/identity matrices using protein or DNA sequences. **BMC Bioinformatics**, v. 4, p. 29, 2003.

CAWTHRAW, S. A.; WASSENAAR, T. M.; AYLING, R.; NEWELL, D. G. Increased colonization potential of *Campylobacter jejuni* strain 81116 after passage through chickens and its implication on the rate of transmission within flocks. **Epidemiology and Infection**, v. 1, n. 117, p. 213-216, 1996.

CHAPMAN, J. S. Disinfectant resistance mechanisms, cross-resistance, and co-resistance. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 51, n. 4, p. 271-276, 2003.

CHAVEERACH, P.; KEUZENKAMP, D. A.; LIPMAN, L. J. A.; VAN KNAPEN, F. Effect of organic acids in drinking water for young broilers on *Campylobacter* infection, volatile fatty acid production, gut microflora and histological cell changes. **Poultry Science**, v. 83, p.330–334, 2004.

CHEN, X.; STEWART, P.S. Chlorine penetration into artificial biofilm is limited by a reaction-diffusion interaction. **Environmental Science and Technology** v.30, p. 2078–2083, 1996.

CHON, J. W.; HYEON, J. Y.; CHOI, I. S.; PARK, C. K.; KIM, S. K.; HEO, S.; SEO, K. H. Comparison of three selective media and validation of the VIDAS *Campylobacter* assay for the detection of *Campylobacter jejuni* in ground beef and fresh-cut vegetables. **Journal of Food Protection®**, v. 74, n. 3, p. 456-460, 2011.

CLARK, C. G.; BEESTON, A.; BRYDEN, L.; WANG, G.; BARTON, C.; CUFF, W.; NG, L. K. Phylogenetic relationships of *Campylobacter jejuni* based on *porA* sequences. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 53, n. 1, p. 27-38, 2007.

DAHL, T. A.; MIDDEN, W. R.; HARTMAN, P. E. Comparison of killing of gram-negative and gram-positive bacteria by pure singlet oxygen. **Journal of Bacteriology**, v. 171, n. 4, p. 2188-94, 1989.

DE BOER, P.; WAGENAAR, J. A.; ACHTERBERG, R. P.; VAN PUTTEN, J. P. M.; SCHOOLS, L. M.; DUIM, B. Generation of *Campylobacter jejuni* genetic diversity in vivo. **Molecular Microbiology**, v. 44, p. 351–359, 2002.

DEBRUYNE, L.; GEVERS, D.; VANDAMME, P. Taxonomy of the family *Campylobacteriaceae*. In I. NACHAMKIN, I.; SZYMANSKI, C.; BLASER, M. **Campylobacter**. Washington: ASM Press, 2008. p. 3-25.

DOTSON, G. D.; KALTASHOV, I. A.; COTTER, R. J.; RAETZ, C. R. Expression cloning of a *Pseudomonas* gene encoding a hydroxydecanoyl-acyl carrier protein-

dependent UDP-GlcNAc acyltransferase. **Journal of Bacteriology**, v. 180, n. 2, p. 455-456, 1998.

ELVERS, K. T.; MORRIS, V. K.; NEWELL, D. G.; ALLEN, V. M. Molecular tracking, through processing, of *Campylobacter* strains colonizing broiler flocks. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 16, p. 5722-5729, 2011.

EVANS, S. J.; SAYERS, A. R. A longitudinal study of campylobacter infection of broiler flocks in Great Britain. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 46, p. 209–223, 2000.

FANG, H.; HEDIN, G. Rapid screening and identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from clinical samples by selective-broth and real-time PCR assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 7, p. 2894-2899, 2003.

FOUTS, D. E.; MONGODIN, E. F.; MANDRELL, R. E.; MILLER, W. G.; RASKO, D. A.; RAVEL, J.; DODSON, R. J. Major structural differences and novel potential virulence mechanisms from the genomes of multiple *Campylobacter* species. **PLoS Biology**, v. 1, n. 3, p. e15, 2005.

FOOD STANDARDS AGENCY. (FSA). **Advisory committee on the microbiological safety of food**: second report on *Campylobacter* advises the food standards agency on the microbiological safety of food. [S.l.]: Food Standards Agency March 2005 FSA, 2005. p. 185.

GIBBENS, J. C.; PASCOE, S. J. S.; EVANS, S. J.; DAVIES, R. H.; SAYERS, A. R. A trial of biosecurity as a means to control *Campylobacter* infection of broiler chickens, **Preventive Veterinary Medicine**, v. 48, p. 85-99, 2001.

GREGORY, E.; BARNHART, H.; DREESEN, D. W.; STERN, N. J.; CORN, J. L. Epidemiological study of *Campylobacter* spp. in broilers: source, time of colonization, and prevalence. **Avian Diseases**, v. 41, n. 4, p. 890-898, 1997.

GUTIÉRREZ-MARTÍN, C. B.; YUBERO, S.; MARTÍNEZ, S.; FRANDOLOSO, R.; RODRÍGUEZ-FERRI, E. F. Evaluation of efficacy of several disinfectants against *Campylobacter jejuni* strains by a suspension test. **Research in Veterinary Science**, v. 91, n. 3, p. 44-47, 2011.

HALL, T. A Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. **Nucleotides Acids Symposium**, v. 41, p.95-98, 1999.

HAANNINEN, M.-L.; HAKKINEN, M.; RAUTELIN, H. Stability of related human and chicken *Campylobacter jejuni* genotypes after passage through chick intestine studied by pulsed-field gel electrophoresis. **Applied Environmental Microbiology** v. 65, p. 2272–2275, 1999.

HERMAN, L.; HEYNDRICKX, M.; GRIJSPEERDT, K.; VANDEKERCHOVE, D.; ROLLIÉ, I.; DE ZUTTER, L. Routes for *Campylobacter* contamination of poultry meat:epidemiological study from hatchery to slaughterhouse. **Epidemiology. Infectious**, v. 131, p. 1169–1180, 2003.

HILL, J. E.; PACCAGNELLA, A.; LAW, K.; MELITO, P. L.; WOODWARD, D. L.; PRICE, L. ; GOH, S. H. Identification of *Campylobacter* spp. and discrimination from *Helicobacter* and *Arcobacter* spp. by direct sequencing of PCR-amplified *cpn60* sequences and comparison to *cpnDB*, a chaperonin reference sequence database. **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, n. 4, p. 393-399, 2006.

HUANG, X.; MADAN, A. CAP3: A DNA Sequence Assembly Program. **Genome Research**, v. 9, p. 868-877, 1999.

HUE, O.; LE BOUQUIN, S.; LAISNEY, M. J.; ALLAIN, V.; LALANDE, F.; PETETIN, I.; SANTOLINI, J. Prevalence of and risk factors for *Campylobacter* spp. contamination of broiler chicken carcasses at the slaughterhouse. **Food Microbiology**, v. 27, n. 8, p. 992-999, 2010.

JACOBS-REITSMA, W. F.; VAN DE GIESSEN, A. W.; BOLDER, N. M.; MULDER, R. W. Epidemiology of *Campylobacter* spp. at two Dutch broiler farms. **Epidemiology Infection**, v. 114, n. 3, p. 413–421, 1995.

JUKES, T. H.; CANTOR, C. R. Evolution of protein molecules. In: MUNRO, H. N. **Mammalian protein metabolism**. New York: Academic Press, 1969. p. 21-132.

KARATZAS, K. A.; WEBBER, M. A.; JORGENSEN, F.; WOODWARD, M. J.; PIDDOCK, L. J.; HUMPHREY, T. J. Prolonged treatment of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium with commercial disinfectants selects for multiple antibiotic resistance, increased efflux and reduced invasiveness. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 60, n. 5, p. 947-955, 2007.

KÄRENLAMPI, R. I.; TOLVANEN, T. P.; HÄNNINEN, M. L. Phylogenetic analysis and PCR-restriction fragment length polymorphism identification of *Campylobacter* species based on partial *groEL* gene sequences. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 12, p. 5731-5738, 2004.

KLENA, J. D.; PARKER, C. T.; KNIBB, K.; IBBITT, J. C.; DEVANE, P. M. L.; HORN, S. T.; MILLER, W. G.; KONKEL, M. E. Differentiation of *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter lari* and *Campylobacter upsaliensis* by a multiplex PCR developed from the nucleotide sequence of the lipid A gene *lpxA*. **Journal of Clinical Microbiology**, n. 42, p. 5549–5557, 2004.

KNUDSEN, K. N.; BANG, D. D.; ANDRESEN, L. O.; MADSEN, M. *Campylobacter jejuni* strains of human and chicken origin are invasive in chickens after oral challenge. **Avian Diseases**, v. 50, n. 1, p. 10-14, 2006.

KUANA, S. L. **Campylobacter na produção e processamento de frangos de corte: prevalência, contagem, fatores de risco e perfil de resistência**, 2004. 107 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

KUANA, S. L.; SANTOS, L. R.; BEATRIZ, L.; SALLE, C. T. P.; MORAES, H. L. S.; NASCIMENTO, V. P. Ocorrência de *Campylobacter* em lotes de frangos de corte e nas carcaças correspondentes. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 2, p. 480-486, 2008.

LINE, J. E.; STERN, N. J.; LATTUADA, C. P.; BENSON, S. T. Comparison of methods for recovery and enumeration of *Campylobacter* from freshly processed broilers. **Journal of Food Protection®**, v. 64, n. 7, p. 982-986, 2001.

LUCIEN, M. A. B. **Développement d'un essai PCR pour l'identification des espèces de campylobacter**. 2012. 97 f. Tese (Doutorado em Microbiologia e Imunologia) - Université Laval, Québec, 2012.

MCDOWELL, S. W. J.; MENZIES, F. D.; MCBRIDE, S. H.; OZA, A. N.; MCKENNA, J. P.; GORDON, A. W.; NEILL, S. D. *Campylobacter* spp. in conventional broiler flocks in Northern Ireland: epidemiology and risk factors. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 84, n. 3, p. 261-276, 2008.

MCGANN, P.; SNESRUD, E.; ONG, A. C.; CLIFFORD, R.; KWAK, Y. I.; STEELE, E. D.; RABINOWITZ, R.; WATERMAN, P. E.; LESH, E. **Allelic Variants of bla_{VIM} Reside on diverse mobile genetic elements in gram-negative clinical isolates from the USA**. Nucleotide Sequence GenBank, 2015 Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sviewer/viewer.fcgi?db=nucleotide&list_uids=KP975074&from=94400&to=91527> Acesso em: 02 mar. 2016

MERINO, F. J.; AGULLA, A. N. D. R. E. S.; VILLASANTE, P. A.; DÍAZ, A. U. R. O. R. A.; SAZ, J. V.; VELASCO, A. C. Comparative efficacy of seven selective media for isolating *Campylobacter jejuni*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 24, n. 3, p. 451-452, 1986.

MEUNIER, M.; GUYARD-NICODÈME, M.; DORY, D.; CHEMALY, M. Control Strategies against *Campylobacter* at the Poultry Production Level: Biosecurity Measures, Feed Additives and Vaccination. **Journal of applied microbiology**, v. 120, n. 5, p. 1139–1173, 2015

MOFFATT, J. H.; HARPER, M.; ADLER, B.; NATION, R. L.; LI, J.; BOYCE, J. D. (). Insertion sequence IS_{Aba11} is involved in colistin resistance and loss of lipopolysaccharide in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 6, p. 3022-3024, 2011.

MOORE, J. E.; CORCORAN, D.; DOOLEY, J. S.; FANNING, S.; LUCEY, B.; MATSUDA, M.; O'RIORDAN, L. *Campylobacter*. **Veterinary Research**, v. 36, p. 351-382, 2005

NEWELL, D. G.; ELVERS, K. T.; DOPFER, D.; HANSSON, I.; JONES, P.; JAMES, S.; GITTINS, J.; STERN, N. J.; DAVIES, R.; CONNERTON, I.; PEARSON, D.; SALVAT, G.; ALLEN, V. M. Biosecurity-based interventions and strategies to reduce *Campylobacter* spp. on poultry farms. **Applied Environmental Microbiology** v. 77, p. 8605–8614, 2011.

NEWELL, D. G.; FEARNLEY, D. G. C Sources of *Campylobacter* Colonization in broiler chicken **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 8, p. 4343–4351, 2003

ODEGAARD, T. J.; KALTASHOV, I. A.; COTTER, R. J.; STEEGHS, L.; VAN DER LEY, P.; KHAN, S.; MASKELL, D. J.; RAETZ, C. R. Shortened hydroxyacyl chains on

lipid A of *Escherichia coli* cells expressing a foreign UDP-N-acetylglucosamine O-acetyltransferase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 32, p. 19688-19696, 1997.

WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE). *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* In: _____ **Terrestrial animal health code**. Washington: World Trade Organization, 2011. 563 p.

ONU, K.; MASAKI, H.; TOKUMARU Y. Isolation of *Campylobacter* spp. from slaughtered cattle and swine on blood-free selective medium. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 57, n.6, p. 1085-1087, 1995.

OSEI SEKYERE J.; GOVINDEN U.; ESSACK S.; HALDORSEN B.; SAMUELSEN O.; AASNAES B.; SUNDSFJORD A. **Prevalence of NDMs in South Africa**, NUCLEOTIDE SEQUENCE GenBank/DBJ databases, 2016. Disponível em: <http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?tr:A0A0M1T5K2_KLEPN> Acesso em: 3 mar. 2016.

PATTISON, M. Practical intervention strategies for campylobacter. **Applied Microbiology**, n. 30, p.121–125, 2001.

PETERSEN, L.; NIELSEN, E. M.; ON, S. L. Serotype and genotype diversity and hatchery transmission of *Campylobacter jejuni* in commercial poultry flocks. **Veterinary Microbiology**, v. 82, p.141–154, 2001.

PEYRAT, M. B.; SOUMET, C.; MARIS, P.; SANDERS, P. Phenotypes and genotypes of *Campylobacter* strains isolated after cleaning and disinfection in poultry slaughterhouses. **Veterinary Microbiology**, v. 128, n. 3, p. 313-326, 2008.

PIERSIMONI, C.; BORNIGIA, S.; CURZI, L.; DE SIO, G. Comparison of two selective media and a membrane filter technique for isolation of *Campylobacter* species from diarrhoeal stools. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 14, n. 6, p. 539-542, 1995.

POTRON, A.; POIREL, L.; NORDMANN, P. Emerging broad-spectrum resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 45, n. 6, p. 568-585, 2015.

RINGOIR, D. D.; KOROLIK, V. Colonisation phenotype and colonisation potential differences in *Campylobacter jejuni* strains in chickens before and after passage in vivo. **Veterinary Microbiology**, v. 92 n. 3, p. 225-235, 2003.

ROSENQUIST, H.; SOMMER, H. M.; NIELSEN, N. L.; CHRISTENSEN, B. B. The effect of slaughter operations on the contamination of chicken carcasses with thermotolerant *Campylobacter*. **International Journal of Food Microbiology**, v.108, n. 2, p. 226-232, 2006.

STATISTICAL ANALISYS SYSTEM (SAS). **User's guide**. Version 9.2 edition. Cary: SAS Institute, Inc., 2008.

SHI, X.; ZHU, X. Biofilm formation and food safety in food industries. **Trends in Food Science & Technology**, v. 20, n. 9, p. 407-413, 2009.

SIMÕES, M.; SIMÕES, L. C.; VIEIRA, M. J. A review of current and emergent biofilm control strategies. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, n. 4, p. 573-583, 2010.

SMITH, C. K.; ABUOUN, M.; CAWTHRAW, S. A.; HUMPRHREY, T. J.; ROTHWELL, L.; KAISER, P.; BARROW, P. A.; JONES, M. A. Campylobacter colonization of the chicken induces a proinflammatory response in mucosal tissues. **FEMS Immunology Medical Microbiology**, v. 54, p. 114-121, 2008.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, p. 2725-2729, 2013.

THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; PLEWNIK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D. G. The CLUSTAL_X windows interface: strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools flexible. **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 4876-4882, 1994.

TOUCHON, M.; HOEDE, C.; TENAILLON, O.; BARBE, V.; BAERISWYL, S.; BIDET, P.; CALTEAU, A. Organised genome dynamics in the Escherichia coli species results in highly diverse adaptive paths. **PLoS Genetics**, v. 1, n. 5, p. , falta número de página, 2009.

TRACHOO, N.; FRANK, J. F. Effectiveness of chemical sanitizers against Campylobacter jejuni-containing biofilms. **Journal of Food Protection®**, v. 65, n. 7, p. 1117-1121, 2002.

VANDEPLAS, S.; MARCQ, C.; DUBOIS DAUPHIN, R.; BECKERS, Y.; THONART, P.; THÉWIS, A. Contamination of poultry flocks by the human pathogen Campylobacter spp. and strategies to reduce its prevalence at the farm level. **Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement**, v. 12, n. 3, p. 317-334, 2008.

VAN DE GIESSEN, A. W.; TILBURG, J. J. H. C.; RITMEESTER, W. S.; VAN DER PLAS, J. Reduction of Campylobacter infections in broiler flocks by application of hygiene measures. **Epidemiology and Infection**, v. 121, n. 1, p. 57-66, 1998.

VAN MOURIK, A.; STEEGHS, L.; VAN LAAR, J.; MEIRING, H. D.; HAMSTRA, H. J.; VAN PUTTEN, J. P.; WÖSTEN, M. M. Altered linkage of hydroxyacyl chains in lipid A of Campylobacter jejuni reduces TLR4 activation and antimicrobial resistance. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 21, p. 15828-15836, 2010.

VAZ, C. S. L. Campylobacter na segurança dos alimentos e na avicultura. **Avicultura Industrial**, v. 99, n. 1165, p. 15-19, 2008.

WANG, W. L.; POWERS, B. W.; LEUCHTEFELD, N. W.; BLASER, M. J. Effects of disinfectants on Campylobacter jejuni. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 45, n. 4, p. 1202-1205, 1983.

WASSENAAR, T. M.; GEILHAUSEN, B.; NEWELL, D. G. Evidence of genomic instability in *Campylobacter jejuni* isolated from poultry, **Applied Environmental Microbiology**, v. 64, p. 1816–1821, 1998.

WECKESSER, J.; MAYER, H. Different lipid A types in lipopolysaccharides of phototrophic and related non-phototrophic bacteria. **FEMS Microbiological Reviews**, v. 54, p. 143-154, 1988.

CAPÍTULO 4

Avaliação econômico-produtiva da limpeza e desinfecção de instalações de frangos de corte desafiados com *Campylobacter jejuni*.

13 INTRODUÇÃO

Nos programas de biossegurança, os protocolos de limpeza e desinfecção, são relatados como uma via econômica de reduzir a pressão de infecção, quando corretamente adotados, isto ocorre pois é mais fácil e menos dispendioso a prevenção de doenças do que a ocorrência de surtos.

O impacto econômico das doenças para a avicultura pode ser crucial para a manutenção do negócio, em função das perdas por mortalidade, redução dos resultados de desempenho, aviários vazios durante quarentena, comprometimento da evolução da atividade, imposição de barreiras sanitárias (BONATTI; MONTEIRO, 2008) e redução de vendas de produtos.

Os programas de limpeza e desinfecção demandam a utilização de água, energia elétrica, produtos adequados e mão de obra treinada. Devem ser realizados no mínimo tempo possível, e do modo mais eficiente possível, minimizando os dias em que os galpões permanecem sem a presença de aves, reduzindo intervalo entre lotes. Tais observações demonstram que os programas adotados necessitam de investimento para sua realização, e sua eficiente aplicação pode evitar gastos excessivos de tempo e dinheiro.

No momento da escolha dos produtos deve-se levar em consideração alguns fatores como eficácia, adaptação a determinado status da granja (desinfecção de rotina, surtos) e ainda o custo do produto dentro da produção. O cálculo dos custos não deve ser realizado em função dos produtos concentrados, e sim diluídos em água e conseqüentemente calculadas as quantidades necessárias destas soluções para a aplicação do produto em todas as superfícies e objetos da granja (GREZZI, 2008).

A necessidade da adoção de programas de biossegurança já é uma realidade nas criações de aves (SESTI, 2004), conseqüentemente a realização de programas de limpeza e desinfecção é vista como parte fundamental do programa e geralmente é aceita pelos criadores de aves, integrados ou independentes.

O sistema de produção no modelo integradora/integrado é bastante utilizado no Brasil, onde o integrador é responsável pelas decisões operacionais e o integrado

realiza as atividades de acordo com o que foi estabelecido em contrato entre as duas partes. A remuneração neste sistema é dada por itens como: o índice de mortalidade, a taxa de conversão, a ocorrência de doenças e a inspeção após o abate (CARNEIRO et al., 2004), garantindo uma renda mínima para o produtor (LAZIA, 2012). No sistema independente de produção produtor é responsável por todo o processo de produção decisões, assumindo os riscos envolvidos na atividade, as vendas ocorrem no mercado spot, portanto sua remuneração é bastante variável, dependendo da sua produtividade e das oscilações do mercado (FGV, 2012; LAZIA, 2012).

Vale ressaltar, para que os programas de limpeza e desinfecção mostrem seus efeitos, é necessário que haja continuidade de sua realização, mas em ambos os sistemas de produção encontra-se resistência a continuidade da aplicação, principalmente porque o custo do processo é imediato, enquanto que seus benefícios são difíceis de mensurar e dependem do tempo para serem evidenciados (MULLER, 2008).

Com base na necessidade de provar a eficiência econômica de programas de limpeza e desinfecção, levando em consideração melhoria nos resultados de desempenho, demonstra-se a necessidade da realização de um estudo econômico-financeiro da aplicação de programas de limpeza e desinfecção específicos, desta maneira, os objetivos do presente estudo foram calcular as margens de comercialização para dois protocolos de limpeza e desinfecção e avaliar o efeito econômico destes protocolos em diferentes cenários, simulando a sua utilização em dois sistemas de produção comumente encontradas no Brasil.

14 MATERIAL E MÉTODOS

14.1 EXPERIMENTO DE DESEMPENHO

Foram utilizados 1.920 pintos de corte, com um dia de idade, machos, criados até 42 dias de idade, em um galpão provido de 32 boxes experimentais com comedouros tubulares e bebedouros pendulares. As dietas experimentais oferecidas para todas as aves do experimento foram formuladas de acordo com Rostagno et al. (2011) e estão descritas no capítulo 2.

Foram realizados neste galpão, dois alojamentos, sendo que o primeiro utilizou 960 pintos de corte, os quais receberam ao 11º dia de idade a inoculação de uma cepa padrão de *Campylobacter jejuni* (ATCC 33560) a fim de contaminar o ambiente criando desafio sanitário. No segundo alojamento, utilizou-se a mesma quantidade de aves do primeiro, sendo que antes da entrada dos animais foram realizados 2 protocolos de limpeza e desinfecção, cada um deles em metade do galpão, 16 boxes experimentais.

O galpão experimental apresentava metragem média utilizada para análise e execução dos cálculos para o programa de limpeza e desinfecção de 500m² (metragem da estrutura, forro, cortinas – parte interna e externa, calçamento, piso e muretas).

Os protocolos de limpeza e desinfecção utilizados foram:

Proposto

1. Limpeza e desinfecção do sistema de fornecimento de água: lavagem da caixa d'água e posterior aplicação de desinfetante ácido composto por ácido peracético 100g / kg e Benzil-(C12-C16) cloro-alkyl dimetilamonio 80g/ kg na concentração 0.5%. O produto foi adicionado à água da caixa d'água e permaneceu durante 12 horas. Posteriormente foi escoado pelo sistema de encanamento, através dos gatilhos dos bebedouros.
2. Limpeza seca: retirada de todos os equipamentos do galpão, retirada da cama e varrição das instalações.

3. Limpeza úmida: foi realizada umidificação do galpão e posterior lavagem com água sob alta pressão.
4. Lavagem de todos os equipamentos utilizados no galpão (bebedouros, comedouros, baldes, botas, bandejas, etc) com água sob alta pressão.
5. Aplicação do detergente alcalino em solução de 4% sobre todas as superfícies (teto, paredes, piso, cortinas) internas e externas, objetos e equipamentos (bebedouros, comedouros, baldes, botas, bandejas, e demais utensílios). Enxaguar com água sob alta pressão.
6. Aplicação do detergente ácido em solução a 4% sobre todas as superfícies (teto, paredes, piso, cortinas) internas e externas, objetos e equipamentos (bebedouros, comedouros, baldes, botas, bandejas, e demais utensílios). Enxague com água sob alta pressão.
7. Secagem do ambiente – parcialmente seco, sem poças d'água.
8. Aplicação do desinfetante composto de glutaraldeído 250g/L e formaldeído 185g/L na concentração 0,5% com bomba costal.
9. Aplicação do desinfetante composto de paraclorometacresol 210 g/L na concentração 4% apenas no piso e paredes até 0,5m de altura.
10. Os equipamentos (bebedouros, comedouros, baldes, botas, bandejas, etc) foram desinfetados após usa secagem, da mesma maneira que as demais superfícies como descrito a partir do item 8.

Simples

1. Varredura e retirada de matéria orgânica do ambiente.
2. Lavagem de equipamentos (comedouros, bebedouros, baldes, botas e demais objetos utilizados no dia-a-dia) com detergente neutro.
3. Umidificação e lavagem do ambiente com água e detergente neutro.
4. Secagem do ambiente.

Para a obtenção dos dados de desempenho, as aves foram pesadas no 1º, 7º, 21º, 28º, 35º e 42º dias assim como as sobras de ração de cada um dos períodos, desta maneira foram calculados o ganho de peso médio no período avaliado, consumo de ração, conversão alimentar e mortalidade.

Os dados experimentais de desempenho produtivo do período total de vida das aves foram utilizados para a realização das análises econômicas e estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 - Dados médios de desempenho aos 42 dias de idade das aves, de cada um dos tratamentos, dados utilizados para realização das análises econômicas

Variável	Trat Proposto	Trat Comum
PV (g)	2717	2532
GP (g)	2610	2447
CR (g)	4903	4760
CA	1,880	1,952
Viab(%)	95,681	96,265

Peso Vivo(PV), Ganho de Peso (GP), Consumo de Ração (CR), Conversão Alimentar(CA), Viabilidade(Viab)

Os dados de desempenho descritos acima foram utilizados para a realização das análises econômicas, que serão descritas nos itens abaixo.

14.2 CÁLCULO DA MARGEM BRUTA DE COMERCIALIZAÇÃO

A análise econômica da margem bruta de comercialização foi baseada nos custos de cada um dos tratamentos de limpeza e desinfecção e na receita estimada com as vendas das carcaças dos animais.

Não houve variação de alocação de trabalho e capital entre os tratamentos, uma vez que o manejo, arraçãoamento, equipamentos e as instalações foram idênticos, por isto esses fatores não foram considerados nos cálculos.

Para o cálculo dos custos dos protocolos de limpeza e desinfecção foram considerados os preços médios mensais históricos – para um período de 10 anos – dos produtos de limpeza e desinfecção utilizados em cada um dos tratamentos. Os preços históricos foram obtidos junto aos fornecedores dos referidos produtos.

Os preços mensais dos produtos foram deflacionados pelo índice Nacional de Preços ao Consumidor (INPC, 2014), para o período de dezembro de 2014. A justificativa para se trabalhar com dados históricos de preços se baseia no fato de que a maioria dos produtos destinados a produção animal apresentam significativa variação sazonal. Portanto, preços históricos tendem a representar mais satisfatoriamente a realidade.

Para obtenção do preço pago por kg de frango vivo, foram consultadas fontes confiáveis, bases de dados públicos como Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada (CEPEA/ESALQ/USP). Na data de realização do experimento o preço pago ao produtor por kg de frango vivo era de R\$2,70/kg.

O método proposto para calculo das margens brutas foi descrito por Vidal et al., 2014. As fórmulas utilizadas para os cálculos da margem bruta de comercialização (MB_i), da receita total (RT_i), do custo do tratamento (CT_i) de cada tratamento são apresentadas a seguir:

$$MB_i = RT_i - CT_i \quad (1)$$

$$RT_i = (Pvm_i \times Na_i) \times P_i \quad (2)$$

$$CT_i = Cp_i + Ce_i \quad (3)$$

Onde, Pvm_i é o peso vivo médio do tratamento i , Na_i é o numero de animais no tratamento i , P_i é o preço do quilo da carcaça obtida no tratamento i , Cp_i é o custo dos produtos aplicados nas instalações do tratamento i , e Ce_i é o custo da energia elétrica gasta com a operação.

Para apresentação dos resultados foram definidos lotes de aves correspondendo aos boxes de criação, em cada um deles foram alocadas 30 aves inicialmente, foi descontada a mortalidade e os cálculos de RT_i , CT_i e MB_i foram calculados para o número de aves restantes no 42º dia.

14.3 ANALISE ECONÔMICA DA VIABILIDADE DOS DOIS SISTEMAS DE TRATAMENTO NA PRODUÇÃO DE FRANGO DE CORTE DE CICLO COMPLETO

Esta análise simulou a produção de frangos de ciclo completo frente ao uso dos dois diferentes de programas de desinfecção do galpão e utilizou dados provenientes do experimento de desempenho do Capítulo 2.

Para a análise econômica da viabilidade dos dois sistemas de tratamento foi o utilizado o método do fluxo de caixa (BORDEAUX-RÊGO et al., 2006). O método do fluxo de caixa é baseado no conceito contábil sendo as entradas e saídas de caixa no momento no qual elas ocorrem. A unidade utilizada no fluxo de caixa é denominada

de período, que pode ser expresso em dia, mês e ano, dependendo do projeto em questão. No presente estudo foram utilizados meses.

Os indicadores financeiros utilizados foram a Taxa Interna de Retorno, o período de recuperação de capital (payback) e o Valor Presente Líquido (VPL).

Com todos os itens que compõem o custo de produção e o custo da desinfecção, os mesmos foram organizados segundo a metodologia proposta pela CONAB (2010) em: custo variável (CV_i), custo fixo (CF_i), custo operacional total (COT) e custo total de produção (CT_i).

Sendo:

$$COT_i = CV_i + CF_i \quad (4)$$

$$CT_i = COT_i + CO_i \quad (5)$$

Onde CV_i é a soma das despesas diretas no tratamento i , CF_i é a depreciação e mão de obra permanente no tratamento i , COT_i é o custo operacional total no tratamento i e CO_i é o custo de oportunidade do capital imobilizado no tratamento i .

A parcela de custo fixo inclui: custo de manutenção, lubrificação e lavagem, custo da hora/máquina. A parcela de custo variável inclui: mão de obra, custos administrativos, análises de garantia.

Para aos coeficientes econômicos de longo prazo será elaborado um fluxo de caixa líquido (FCL) para 1 ano (12 meses). No mês 12 soma-se à receita o valor residual de todo o patrimônio líquido. Os indicadores de rentabilidade de longo prazo (VPL e TIR), calculados sobre o FCL, serão contabilizados segundo o método proposto por Noronha (1987).

O VPL é a técnica que desconta os fluxos de caixa a uma taxa específica, chamada de custo de oportunidade.

$$VPL = Fco_i + \sum_{t=1}^n \frac{Fct_i}{(1+k)^T} \quad (6)$$

Onde Fco_i o fluxo de caixa total no tempo 0 do tratamento i , Fct_i é o fluxo de caixa total no período t do tratamento i ; k é taxa de desconto que iguala o VPL a 0, portanto sendo a própria TIR; t é o número de períodos a que se reflete o fluxo de caixa.

A TIR é a taxa de retorno que iguala o valor presente das entradas dos fluxos de caixa ao investimento inicial.

$$0 = Fco_i + \sum_{t=1}^n \frac{Fct_i}{(1+k)^T} \quad (7)$$

Sendo Fco_i o fluxo de caixa total no tempo 0 do tratamento i ; Fct_i é o fluxo de caixa total no período t do tratamento i ; k é a taxa de desconto que iguala o VPL a 0, portanto, a própria TIR; t é o número de períodos a que se refere o fluxo de caixa.

O PR representa o número de períodos necessários para que a soma dos benefícios econômicos se iguale a soma dos gastos.

$$PR = T \text{ quando } \sum_{t=0}^T Fct_i = I0_i \quad (8)$$

Onde o Fct_i é o fluxo de caixa total no período t do tratamento i ; o fluxo de caixa inicial do investimento do tratamento i .

Dois cenários foram elaborados para avaliar as possibilidades de aplicação do método de desinfecção: 1) produtor integrado: aquisição de equipamentos e realização da desinfecção, programa comum e europeu, são por conta do proprietário 2) produtor independente: aquisição de equipamentos e realização da desinfecção, programa comum e europeu, são por conta do proprietário. Em ambos os cenários foram estipulados lotes de 40.000 aves.

Para o cenário de produtores integrados, para o cálculo da remuneração paga ao produtor foi utilizado como fonte um modelo de contrato integradora-integrado (Anexo A), de acordo com os seguintes cálculos:

$$Machos = 0,2906 \times Q \times M \quad (9)$$

Onde Q é a quantidade final de aves e M é o fator multiplicador. O fator M multiplicador é obtido através da diferença de conversão esperada (CE) e corrigida (CC) de acordo com os cálculos:

$$M = CE - CC \quad (10)$$

A conversão corrigida é calculada:

$$CC = CR + \left(\frac{2,400 - PM}{3,5} \right) \quad (11)$$

Onde *PM* é o peeso médio das aves e *CR* é a conversão alimentar real. A conversão esperada considerada foi a do manual da linhagem Cobb 500, sendo o valor de referência para machos de 42 dias de 1,70. A *CR* utilizada foi a obtida por cada um dos tratamentos, comum e porposto. O valor *Q* foi obtido descontando-se a mortalidade de cada um dos tratamentos.

Tendo a diferença entre a conversão, consulta-se a tabela 9 para obtenção do valor *M*.

Tabela 9 - Fator multiplicador em relação a diferença entre a conversão esperada e a atingida pelo lote de aves conversão alimentar

Dif. CAC	Multip.	Dif. CAC	Multip.	Dif. CAC	Multip.
0,241 a 0,250	1,745	0,101 a 0,110	1,286	-0,071 a 0,080	0,783
0,231 a 0,240	1,715	0,091 a 0,100	1,271	-0,061 a -0,070	0,810
0,221 a 0,230	1,685	0,081 a 0,090	1,244	-0,051 a -0,060	0,838
0,211 a 0,220	1,655	0,071 a 0,080	1,217	-0,041 a -0,050	0,865
0,201 a 0,210	1,626	0,061 a 0,070	1,190	-0,031 a -0,040	0,892
0,191 a 0,200	1,596	0,051 a 0,060	1,63	-0,021 a -0,030	0,919
0,181 a 0,190	1,566	0,041 a 0,050	1,135	-0,081 a -0,090	0,756
0,171 a 0,180	1,536	0,031 a 0,040	1,108	-0,091 a -0,100	0,729
0,161 a 1,70	1,506	0,021 a 0,030	1,081	-0,101 a -0,110	0,702
0,151 a 0,160	1,477	0,011 a 0,020	1,054	-0,111 a -0,120	0,675
0,141 a 0,150	1,390	0,001 a 0,010	1,027	-0,121 a -0,130	0,648
0,131 a 0,140	1,364	0,000	1,00	-0,131 a -0,140	0,621
0,121 a 0,130	1,338	-0,001 a -0,010	0,973	-0,141 a -0,150	0,594
0,111 a 0,120	1,312	-0,011 a -0,020	0,946	-0,151 acima	0,594

Foram utilizados e adaptados os dados de custos de produção elaborados pela Embrapa Suínos e Aves como custo base de uma granja em sistema convencional.

No cenário de produtores independentes a ração utilizada é paga pelo próprio produtor, desta maneira a mesma foi considerada uma das saídas, sendo levado em consideração o custo de cada um de seus ingredientes. Para o cálculo dos custos de produção da ração foram considerados os preços médios mensais históricos – para um período de 10 anos 2004 a 2014 – dos ingredientes que as compõem. Os preços históricos foram obtidos junto a bases de dados públicas e confiáveis, tais como o

Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada (CEPEA/ESALQ/USP), o Instituto de Economia Agrícola (IEA, da Secretaria da Agricultura do Estado de São Paulo), a Companhia Nacional de Abastecimento (Conab), a Fundação Getúlio Vargas (FGV), dentre outras bases. Outros ingredientes que não estiveram contemplados nas bases de dados, tiveram seus valores obtidos diretamente dos fornecedores.

A justificativa para se trabalhar com dados históricos de preços se baseia no fato de que a maioria dos produtos apresenta significativa variação sazonal e entre safras. Portanto, preços históricos tendem a representar mais satisfatoriamente a realidade. Os valores apresentados estão apresentados em Dólares, a conversão de Reais para dólares foi realizada de acordo com a série histórica de dez anos (Outubro de 2004 a Outubro de 2014) da moeda americana, sendo o valor médio obtido de US\$1,00 igual a R\$ 2,33.

Nos cenários 1 (produtor integrado usando protocolo proposto), 2 (produtor integrado usando protocolo comum), 3 (produtor independente usando protocolo proposto) e 4 (produtor independente usando protocolo comum), para a elaboração dos custos do processo de desinfecção foi elaborado inventário das benfeitorias e dos insumos necessários.

14.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados das análises econômicas foram verificados através do programa computacional Statistical Analysis System (SAS, 2008), sendo anteriormente testada a normalidade dos resíduos estudatizados pelo Teste de Shapiro-Wilk (PROC GLM) e as variâncias comparadas pelo Teste de Levene. Os dados (variável dependente) que não atenderam a estas premissas foram submetidos à transformação. Os dados originais ou transformados, quando este último procedimento foi necessário, foram submetidos à análise de variância para verificar se houve efeito de tratamento, utilizando-se o procedimento Mixed (PROC MIXED do SAS).

15 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na tabela 10 estão demonstrados os resultados das variáveis Margem Bruta de Comercialização (MB), da Receita Total (RT), do Custo do Tratamento (CT), Relação MB/RT e Relação MB/Plotes de cada um dos tratamentos. Os resultados estão expressos em função dos lotes de aves (boxes de tratamento com 30 aves cada).

A receita total para os lotes do tratamento proposto foi significativamente maior do que a do tratamento comum, refletindo os maiores índices de desempenho obtidos por este tratamento.

Tabela 10 - Indicadores econômicos: margem bruta de comercialização (MB), receita total (RT), do custo do tratamento (CT), relação CT/RT e relação MB/Pesolotes, do alojamento 2 com total de 960 aves, divididos em lotes de 30 aves

Variável	Alojamento 2 – 960 aves		CV	P
	Proposto	Comum		
RT(US\$)	90,42	84,77	7,2711	0,0096
CT(US\$)	8,74	0,49	90,8702	<0,001
MB(US\$)	81,68	84,27	6,86	0,2021
CT/RT(%)	9,0	0,6	89,9152	<0,001
MB/PLote(US\$/kg)	2,44	2,68	4,8215	<0,001

Valores expressos em US Dólar onde US\$ 1,00 = R\$2,33 valor médio de acordo com a série histórica do dólar no ano de 2014. * Valor de P significativo ($p < 0,05$) CV = Coeficiente de Variação

Para a variável custo total, os lotes do tratamento comum obtiveram valor significativamente menor do que o tratamento proposto, resultado já esperado devido ao tratamento proposto possuir maior quantidade de passos para realização e utilização de detergentes e desinfetantes, enquanto o tratamento comum apenas utilizou um único produto detergente.

A margem bruta de comercialização das aves não diferiu entre os programas de limpeza e desinfecção adotados. As variáveis relação custo/receita e margem bruta/peso foram significativamente maiores para os lotes do tratamento Comum.

Devido ao tratamento Comum tratar-se de um protocolo bastante simplificado, com a aplicação de apenas um detergente nas instalações, as variáveis que levaram em consideração o custo do tratamento foram favoráveis a este tratamento, porém quando observada a variável RT, onde o valor é composto a partir do desempenho obtido pelos lotes evidencia-se que o maior desenvolvimento e peso das aves do tratamento Proposto proporcionou maior receita.

Quando observada a margem bruta, os tratamentos não diferiram entre si, o que pode demonstrar que o tratamento Proposto mesmo com custo maior para sua realização, pode ter uma margem bruta semelhante ao tratamento Comum, no qual os custos para sua realização são significativamente menores, porém o desempenho obtido pelas aves é menor.

Os gastos com produtos são facilmente contabilizados, entretanto dependendo dos produtos utilizados pode-se aumentar ou reduzir o trabalho laborioso dispendido, fato este que dificulta na estimativa real dos custos dos protocolos de limpeza e desinfecção.

Ramirez (2009) alerta que alguns detergentes devido ao seu modo de ação e aplicação podem facilitar a atuação dos funcionários na remoção das sujidades, tornando seu trabalho mais eficiente e consequentemente obtendo melhores resultados finais da posterior desinfecção. O protocolo Proposto de presente estudo possui um maior custo com produtos, porém a ação combinada de 2 desinfetantes pode facilitar a retirada de matéria orgânica aderida as superfícies dos equipamentos e instalações, reduzindo o tempo e trabalho gastos nesta operação. Já o uso de um único detergente no protocolo Comum pode demandar a prática de esfregar as superfícies para remoção da matéria orgânica, o que torna o trabalho mais laborioso.

Tal fato pode ter implicações negativas no protocolo de limpeza e desinfecção: maior custo com mão de obra, desmotivação de funcionários (RAMIRES, 2009) remoção deficiente da matéria orgânica e menor eficiência na ação dos desinfetantes.

Lagatta e Gameiro (2015), ao estudarem os custos da implementação de programas de biosseguridade em granjas de postura comercial observaram que custos adicionais são gerados com sua adoção, mas estes são relativamente baixos quando comparados aos riscos de enfermidades e prejuízos econômicos que doenças podem causar. Da mesma maneira, o presente estudo demonstra custo mais elevado com protocolo de limpeza e desinfecção rigoroso na produção de frangos, que é fundamental em um programa de biosseguridade, porém o maior desempenho apresentado por estas aves pode ser utilizado como justificativa a adoção de tais procedimentos.

Lake et al. (2013) ao estudarem a implementação de medidas para a redução da ocorrência de *Campylobacter* na cadeia produtiva de frangos encontraram a melhor relação de custo/benefício para as medidas adotadas durante a criação das aves,

sendo este ponto da cadeia aquele que menos aumentaria o valor final dos produtos avícolas para o consumidor, resultados estes com os quais o presente estudo corrobora visto que mesmo com o aumento do custo da produção inerente a uma das práticas de biossegurança, é possível obter maiores receitas com a comercialização das aves.

Além disso, os resultados no presente estudo apresentados são provenientes de uma criação de aves experimental, onde o número de aves é bastante reduzido. Siekkinen et al. (2012) ao avaliar a relação custo/benefício de medidas de biossegurança para frangos de corte conseguiu relacionar os custos da biossegurança com o tamanho dos lotes, quanto maior o lote de aves mais diluído estará o custo das medidas por ave alojada. No caso do presente estudo, a condição experimental de alojamento eleva o custo por ave alojada, em um alojamento em condições comerciais de criação provavelmente a diferença entre o custo dos tratamentos por ave alojada seria menos discrepante.

Simulando a produção de frangos de corte de ciclo completo realizou-se a análise econômica da viabilidade dos sistemas considerando-se 4 cenários: 1 - Produtor Integrado utilizando o tratamento Proposto; 2 - Produtor Integrado utilizando o tratamento Comum; 3 - Produtor Independente utilizando o tratamento Proposto; 4 - Produtor Independente utilizando o tratamento Comum e todos os cenários consideraram o número de 40.000 aves.

O presente estudo caracteriza-se como descritivo e de natureza aplicada sendo de suma importância para a análise de problemas de investigação na área contábil, para esclarecer determinadas características e aspectos inerentes a ela (LONGRAY; BEUREN, 2003). Neste caso, identificaram-se os reflexos no resultado financeiro pela implantação dos diferentes métodos de limpeza e desinfecção Proposto e Comum.

O Valor Presente Líquido (VPL) é um índice de rentabilidade que torna possível a avaliação da viabilidade financeira de um projeto de longo prazo. O VPL é a diferença entre o valor presente das entradas e saídas de caixa, assumindo-se determinada taxa de desconto para as avaliações. Essa taxa é o retorno mínimo que deve ser obtido em um projeto para que o valor de mercado da empresa fique inalterado (GITMAN, 2004). Neste método, comparando dois ou mais projetos, a escolha mais apropriada é aquela que apresente o maior VPL. Quando VPL é igual a zero isto significa que realizar o investimento com o tratamento ou não é indiferente.

A Taxa interna de Retorno (TIR) é a taxa exigida de retorno que quando utilizada resulta em VPL igual a zero. Neste caso é interessante que para que um investimento seja atrativo, a TIR deve ser superior a taxa de rentabilidade que o montante investido obteria se fosse utilizado em outra aplicação financeira.

O Payback é o período de recuperação do capital investido, o número de períodos necessários para que o empreendimento necessita para recuperar o capital investido (GITMAN, 2004).

Nas Tabelas de 4 a 7 estão representados os fluxos de caixa de cada um dos quatro cenários.

A tabela 11 apresenta os resultados obtidos na análise econômica do Cenário 1 no qual o sistema de produção é o de integração, utilizando tratamento Proposto em um galpão de 40.000 aves. O VPL do investimento obtido foi de R\$ 4.787,58. O payback ocorreu no 4º mês e a TIR obtida foi de 29% ao ano.

Tabela 11 -Cenário 1 Produtor integrado, aplicando tratamento Proposto - lote de 40.000 aves

Meses	Entradas	Saídas		FCL	FCL A	VPL	TIR	Payback
	P. Aves	Máquina	C. Prod/ Trat					
0		3.775,84	701,71*	-4.477,55	-4.477,55	4.787,58	29%	4 meses
1					-4.477,55			
2	4.169,82		642,06	3.527,76	-949,79			
3					-949,79			
4	4.169,82		1.343,77	2.826,05	1.876,26			
5					1.876,26			
6	4.169,82		1.343,77	2.826,05	4.702,31			
7					4.702,31			
8	4.169,82		1.343,77	2.826,05	7.528,36			
9					7.528,36			
10	4.169,82		1.343,77	2.826,05	10.354,41			
11					10.354,41			
12	4.169,82		1.343,77	2.826,05	13.180,46			

P. Aves – Valor pago referente ao peso das aves

C. Prod/Trat – Custo de Produção e Investimento inicial com tratamento

* Valor investido para iniciar o tratamento antes da entrada das aves nas instalações.

VPL – Valor presente líquido FCL – Fluxo de Caixa FCL A – Fluxo de Caixa Acumulado TIR – Taxa interna de retorno

Valores expressos em US Dolar onde US\$ 1,00 = R\$2,33 valor médio de acordo com a série histórica do dólar no ano de 2014.

A tabela 12 apresenta os resultados obtidos na análise econômica do Cenário 2 no qual o sistema de produção é o de integração, utilizando tratamento Comum em um galpão de 40.000 aves. O VPL do investimento obtido foi de R\$ 6.494,24. O payback ocorreu no 2º mês e a TIR obtida foi de 651% ao ano.

Tabela 12 -Cenário 2 Produtor integrado, aplicando tratamento Comum - lote de 40.000 aves

Meses	Entradas P Aves	Saídas Custo Produção	FCL	FCL A	VPL	TIR	Payback
0		38,84	-38,84	-38,84	6.494,24	651%	2 meses
1				-38,84			
2	2.793,89	649,82	2.151,83	2.112,99			
3				2.112,99			
4	2.793,89	649,82	2.112,99	4.225,98			
5				4.225,98			
6	2.793,89	649,82	2.112,99	6.338,97			
7				6.338,97			
8	2.793,89	649,82	2.112,99	8.451,96			
9				8.451,96			
10	2.793,89	649,82	2.112,99	10.564,95			
11				10.564,95			
12	2.793,89	649,82	2.112,99	12.677,94			

P. Aves – Valor pago referente ao peso das aves

C. Prod/Trat – Custo de Produção e Investimento inicial com tratamento

* Valor investido para iniciar o tratamento antes da entrada das aves nas instalações.

VPL – Valor presente líquido FCL – Fluxo de Caixa FCL A – Fluxo de Caixa Acumulado TIR – Taxa interna de retorno

Valores expressos em US Dolar onde US\$ 1,00 = R\$2,33 valor médio de acordo com a série histórica do dólar no ano de 2014.

A tabela 13 apresenta os resultados obtidos na análise econômica do Cenário 3 no qual o sistema de produção é o independente, utilizando tratamento Proposto em um galpão de 40.000 aves. O VPL do investimento obtido foi de R\$ 86.455,88. O payback ocorreu no 2º mês e a TIR obtida foi de 177% ao ano.

Tabela 13 -Cenário 3 Produtos independente, aplicando tratamento Proposto - lote de 40.000 aves

Meses	Entradas	Saídas		FCL	FCL A	VPL	TIR	Payback
	P Aves	Maquina	C. Prod/Tart					
0		3.775,84	701,71	-4.477,55	-4.477,55	86.455,88	177%	2 meses
1					-4.477,55			
2	120.541,86		90.472,10	30.069,76	25.592,21			
3					25.592,21			
4	120.541,86		91.173,81	29.368,05	54.960,26			
5					54.960,26			
6	120.541,86		91.173,81	29.368,05	84.328,31			
7					84.328,31			
8	120.541,86		91.173,81	29.368,05	113.696,36			
9					113.696,36			
10	120.541,86		91.173,81	29.368,05	143.064,41			
11					143.064,41			
12	120.541,86		91.173,81	29.368,05	172.432,46			

P. Aves – Valor pago referente ao peso das aves

C. Prod/Trat – Custo de Produção e Investimento inicial com tratamento

* Valor investido para iniciar o tratamento antes da entrada das aves nas instalações.

VPL – Valor presente líquido FCL – Fluxo de Caixa FCL A – Fluxo de Caixa Acumulado TIR – Taxa interna de retorno

Valores expressos em US Dolar onde US\$ 1,00 = R\$2,33 valor médio de acordo com a série histórica do dólar no ano de 2014.

A tabela 14 apresenta os resultados obtidos na análise econômica do Cenário 4 no qual o sistema de produção é o independente, utilizando tratamento Comum em um galpão de 40.000 aves. O VPL do investimento obtido foi de R\$ 74.129,33. O payback ocorreu no 2º mês e a TIR obtida foi de 2395% ao ano.

Tabela 14 -Cenário 4 Produtor independente, aplicando tratamento Comum - lote de 40.000 aves

Meses	Entradas	Saídas		FCL	FCL A	VPL	TIR	Payback
	P Aves	C. Prod/Trat						
0		38,84		-38,84	-38,84	74.129,33	2395%	2 meses
1					-38,84			
2	113.021,26	88.888,19		24.094,23	24.133,07			
3					24.133,07			
4	113.021,26	88.927,03		24.094,23	48.188,46			
5					48.188,46			
6	113.021,26	88.927,03		24.094,23	72.282,69			
7					72.282,69			
8	113.021,26	88.927,03		24.094,23	96.376,92			
9					96.376,92			
10	113.021,26	88.927,03		24.094,23	120.471,15			
11					120.471,15			
12	113.021,26	88.927,03		24.094,23	144.565,38			

P. Aves – Valor pago referente ao peso das aves

C. Prod/Trat – Custo de Produção e Investimento inicial com tratamento

* Valor investido para iniciar o tratamento antes da entrada das aves nas instalações.

VPL – Valor presente líquido FCL – Fluxo de Caixa FCL A – Fluxo de Caixa Acumulado TIR – Taxa interna de retorno

Valores expressos em US Dolar onde US\$ 1,00 = R\$2,33 valor médio de acordo com a série histórica do dólar no ano de 2014.

Um investimento pode ser designado como uma proposta de aplicação de recursos que podem ainda possuir aplicações alternativas a um negócio, como também um sacrifício feito no momento para obtenção de um benefício futuro (REMER; NIETO, 1995). Analisar um investimento é fundamental na tomada de decisões quanto a alocação de recursos (QUEIROZ, 2001) diferenciando uma gestão financeira de sucesso ou fracasso.

Neste sentido, avaliando os quatro cenários do presente estudo pode-se observar que todos possuem VPL positivo, indicando que qualquer das situações escolhidas haverá retorno sobre o capital investido.

Quando avalia-se os cenários 1 e 2, onde a produção se dá sob o sistema de integração, a realização do protocolo Proposto resulta em um menor VPL (US\$4.787,58 vs. 6.494,24), menor TIR (29% vs. 651%) e maior payback (4 vs. 2 meses) em relação ao tratamento Comum.

Quando observamos a TIR dos Cenários 1 e 2 encontramos porcentagens bastante discrepantes, isto ocorre devido a diferença de valores investidos inicialmente, enquanto no Cenário 1 o tratamento Proposto exige a aquisição de maquinário específico para lavagem sob pressão e a utilização de diferentes tipos de produtos para realização do protocolo, o Cenário 2 com a utilização do tratamento Comum apenas necessita da utilização de um único detergente. O reflexo da discrepância entre os investimentos iniciais influencia diretamente na TIR, já que esta é calculada a partir da rentabilidade do montante investido.

Quando comparados os valores do VPL obtidos ao final do período de um ano, observamos maior valor de VPL para o Tratamento Comum em relação ao Proposto, porém a discrepância entre os valores é menor do que ao compararmos a TIR, ambos os valores são positivos e demonstram a viabilidade de aplicação dos protocolos de limpeza e desinfecção.

Em geral os custos com limpeza e desinfecção são de responsabilidade do produtor, como utilizado para elaboração dos cenários do presente estudo, porém, o benefício da adoção das práticas de limpeza e desinfecção detalhados e eficientes, e do programa de biosseguridade trazem benefícios a toda a cadeia produtiva avícola além dos mercados (OECD, 2007). Lake et al. (2013) avaliando a relação de custo/benefício das medidas de biosseguridade na cadeia avícola desde o galpão até a venda em supermercados, observou que as práticas menos onerosas e mais

eficientes na redução da contaminação por *Campylobacter* se dão durante a criação das aves.

Consequentemente, ao relacionarmos o estudo de Lake et al., (2013) com o modelo de produção mais adotado no país, a integração e com os resultados obtidos no presente estudo, a adoção de práticas preventivas como a limpeza e desinfecção demonstram que devem ser adotadas na produção de frangos de corte, porém, para que haja um menor impacto econômico para os integrados e maior aceitação de tais medidas pelos mesmos, a empresa integradora arcaria com os custos dos produtos para limpeza e desinfecção dos galpões e monitoramento, e o integrado com a mão de obra para realização de tais práticas. Desta maneira, provavelmente o valor para o investimento inicial seria reduzido e consequentemente os índices de TIR e VPL para utilização do tratamento Proposto se tornariam mais atraentes para adoção pelos produtores.

Ao observar-se os Cenários 3 e 4 nos quais a produção é independente, nota-se que o VPL encontrado para o tratamento Proposto é superior ao do tratamento Comum (US\$86.455,88 vs. 74.129,33), já a TIR é inferior (177% vs. 2395%). O payback é o mesmo para ambos, 2 meses. Neste caso podemos ver assim como nos cenários 1 e 2 uma grande discrepância entre as TIR, refletindo novamente a diferença entre os investimentos iniciais, porém, neste caso a VPL foi superior para o tratamento Proposto, pois o valor das entradas para este fluxo de caixa foi sempre superior aquelas do tratamento Comum, refletindo o melhor desempenho obtido pelas aves em decorrência do melhor status sanitário das instalações.

Ao avaliarmos os quatro cenários estudados em conjunto pode-se observar que há uma grande diferença entre os custos de produção e as receitas quando comparados a produção integrada com a independente, diferença esta também encontrada por Innocentini (2011).

Vale ressaltar que no presente estudo para obtenção dos custos de produção para a produção integrada os apenas foram considerados aqueles que seriam adicionados aos custos habituais do produtor, no caso mão de obra e produtos, para facilitar a visualização das diferenças entre os tratamentos.

Para os produtores independentes, todos os custos foram contabilizados, pois neste caso o produtor é responsável por todos estes, principalmente alimentação. Como o consumo de alimentos interfere sensivelmente no custo da produção, os

níveis de consumo de ração de cada um dos tratamentos foram considerados para a formação do custo total da produção.

Para a produção integrada o reflexo do desempenho diferente entre os grupos de tratamento se dá nos índices de produtividade, a ração é fornecida pela integradora, e o valor pago pelas aves considera o valor de conversão alimentar como um dos fatores para cálculo da remuneração do produtor.

Na avicultura constantemente as medidas de biosseguridade são vistas pelos produtores como um fator de aumento nos custos de produção, Fraser et al. (2009) realizaram um estudo avaliando medidas de biosseguridade com foco na redução de *Campylobacter* na produção de frangos e sua adoção nas propriedades levando em consideração a estimativa do custo de cada uma das medidas e observaram que quanto maior a estimativa do custo de cada uma das medidas menor a probabilidade da adoção voluntária de tais medidas.

Lagatta e Gameiro (2015) ao estudarem implantação das medidas de biosseguridade propostas na normativa IN 56 sobre o custo da produção de ovos observaram resistência dos produtores devido a possibilidade da geração de maiores custos para a produção, porém foram encontrados custos relativamente baixos frente aos possíveis riscos de enfermidades e dos prejuízos econômicos que essas enfermidades podem causar. Siekkinen et al. (2008) calcularam que o custo da biosseguridade por frango de corte fica em torno de €0,035 o que pode ser considerado baixo quando considerados os riscos da ocorrência de doenças e seus prejuízos.

Neste mesmo sentido, Davison et al. (1999) calculou o custo da ocorrência de um surto de Influenza na Pensilvania e encontrou valores que variavam entre US\$ 18.000,00 a US\$1.000.000,00 de prejuízo para os produtores de aves dependendo das medidas de erradicação necessárias para cada granja, estudos como este que calculam prejuízos da ocorrência concreta de surtos são comuns, porém poucos são aqueles que contabilizam os prejuízos ou ainda o quanto se deixa de ganhar com a ocorrência de doenças sub-clínicas (COX, 2005), por isto as medidas de biosseguridade incluindo a limpeza e desinfecção mostram-se de fundamental importância na produção de aves atual. Além disso, o presente estudo a partir de seus resultados obtidos nos cenários 1 e 3 reforça a possibilidade de que com investimento com limpeza e desinfecção relativamente baixo é possível obter retorno financeiro

positivo, além da possibilidade de ganhos no desempenho produtivo, citados no Capítulo 2.

O presente estudo corrobora com os resultados citados acima, pois demonstrou através dos cenários 1 e 3 que quando utilizados os métodos de limpeza e desinfecção Propostos, o qual pode fazer parte de um programa de biossegurança efetivo, a recuperação dos investimentos realizados é possível. Ainda, no cenário 3 foi possível observar um melhor VPL, refletindo ainda o maior desempenho obtido pelas aves em decorrência da redução da pressão de infecção obtida pelo tratamento. Os resultados do presente estudo assim como os demais trabalhos podem ajudar na desmistificação da adoção das práticas de limpeza, desinfecção e biossegurança na produção avícola, demonstrando a possibilidade de mesmo com aumento nos custos a possibilidade de ter receitas positivas ou ainda melhorar as receitas a partir do melhor desempenho das aves.

16 CONCLUSÃO

O protocolo Proposto mostra-se viável economicamente, pois a margem bruta de comercialização é semelhante entre ambos protocolos.

A apresentação de valor presente líquido e taxa interna de retorno positivas em todos os cenários demonstra a possibilidade da recuperação do capital investido na realização dos protocolos Comum e Proposto.

REFERÊNCIAS

- BONATTI, A. R.; MONTEIRO, M. C. G. B. Biosseguridade em Granjas Avícolas de Matrizes. **Intellectus**, Jaguariúna, v. 4, n. 5, p. 316-330, 2008.
- BORDEAUX-RÊGO, R.; GORET, P. P.; SPRITZER, I. M. P. A.; ZOTES, L. P. **Viabilidade econômico-financeira de projetos**. Rio de Janeiro: FGV, 2006. 164 p.
- CARNEIRO, S. L.; ULBRICH, A. C.; FALKOWSKI, T.; CARVALHO, A.; SOARES JR, D.; LLANILLO, R. F. **Frango de corte: integração produtor/indústria**. Curitiba: Programa Paraná, 2004. 12 p.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). **Custos de produção agrícola: a metodologia da CONAB**. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2010. 60 p.
- COX, B. Biosecurity – the Economics and Benefits – are we fooling ourselves. In: POULTRY SERVICE INDUSTRY WORKSHOP, 2005, Alberta. **Proceedings...** Alberta: PSIW, 2005. 138 p.
- DAVISON, S.; GALLIGAN, D.; ECKERT, T. E.; ZIEGLER, A. F.; ECKROADE, R. J. Economic analysis of an outbreak of avian influenza, 1997-1998. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 214, n. 8, p. 1164-1167, 1999.
- FRASER, R. W.; WILLIAMS, N. T.; POWELL, L. F.; COOK, A. J. C. Reducing Campylobacter and Salmonella Infection: Two Studies of the Economic Cost and Attitude to Adoption of On-farm Biosecurity Measures. **Zoonoses and Public Health**, v. 57, n. 7-8, p. 109-115, 2010.
- GITMAN, L. J. **Princípios da administração financeira**. São Paulo: Harbta, 1997. 841 p.
- GREZZI, G. **Limpeza e desinfecção na avicultura**. **Ergomix** [S.l.]: Engormix, 2008. Disponível in: <<http://pt.engormix.com/MA-avicultura/saude/artigos/limpeza-desinfeccao-avicultura-t100/165-p0.htm>>. Acesso em: 23 jan. 2016.
- INDICE NACIONAL DE PREÇOS AO CONSUMIDOR (INPC). **Série histórica**. 2015. Disponível em: <<http://www.portalbrasil.net/incpc.net>> Acesso em: 01 fev. 2016.
- INNOCENTINI, R. C. P. Análise dos custos de produção de frangos de corte nos sistemas integrado e independente-comunicação. **Veterinária Notícias**, v. 15, n. 2, p. , 2011.
- LAKE, R. J.; HORN, B. J.; DUNN, A. H.; PARRIS, R.; GREEN, F. T.; MCNICKLE, D. C. Cost-effectiveness of interventions to control Campylobacter in the New Zealand poultry meat food supply. **Journal of Food Protection®**, v. 76, n. 7, p. 1161-1167, 2013.

LAGATTA, L.; GAMEIRO, A. H. Estimativa do custo de implantação das medidas de biossegurança preconizadas pela IN 56 sobre o custo de produção de ovos. In: CONGRESSO DA APA – PRODUÇÃO E COMERCIALIZAÇÃO DE OVOS RIBEIRÃO PRETO, 13., 2015, Ribeirão Preto. **Anais...** Ribeirão Preto: APA, 2015. p. 252.

LAZIA, B. **Sistemas de produção empregados na avicultura**. 2014. Disponível em: <<http://www.portaagropecuario.com.br/avicultura/sistemas-deproducao-empregados-na-avicultura/>>. Acesso em: 17 set. 2014.

LONGARAY, A. A.; BEUREN, I. M. **Como elaborar trabalhos monográficos em contabilidade**: teoria e prática. São Paulo: Atlas, 2003.

MANNION, C.; LYNCH, P. B.; EGAN, J.; LEONARD, F. C. Efficacy of cleaning and disinfection on pig farms in Ireland. **Veterinary Record**: journal of the British Veterinary Association, v. 161, n. 11, p. , 2007.

MULLER, I. **A importância da limpeza e desinfecção nas granjas**. 2008 Disponível em: <<http://www.portaagropecuario.com.br/index.php?p=texto&&idT=878>>. Acesso em: 22 dez. 2012

NORONHA, J. F. **Projetos agropecuários**: administração financeira, orçamentos e viabilidade econômica. 2. ed. São Paulo: Atlas, 1987. 269 p.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. (OECD). **Agricultural Outlook foi OECD work**. Paris: OECD, 2007. p. 30.

QUEIROZ, J. A. **Aplicação do valor no risco (VAR), do modelo de precificação dos ativos de capitais e da teoria de precificação por arbitragem na avaliação econômica dos projetos de investimento em condições de risco**. 2001. 101 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção Mecânica) - Universidade de São Paulo, Campus de São Carlos, São Carlos, 2001.

RAMIREZ, A. **Four steps to effective cleaning and disinfecting Iowa State University Online**, 2015. Disponível em: <<http://nationalhogfarmer.com/health-diseases/1015-effective-cleaning-disinfecting-steps?page=6>>. Acesso em: 08 mar. 2016.

REMER, D. S.; NIETO, A. P. A compendium and comparison of 25 project evaluation techniques. Part 1: Net present value and rate of return methods. **International Journal of Production Economics**, v. 42, n. 1, p. 79-96, 1995.

ROSTAGNO, H. S. **Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais**. 3. ed. Viçosa, MG: Editora UFV, 2011. 252 p.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM (SAS). **User's guide**. Version 9.2 edition. Cary: SAS Institute, Inc., 2008.

SESTI, L. A. C Biosseguridade em avicultura: controle integrado de doenças em avicultura. In: SIMPÓSIO GOIANO DE AVICULTURA, 6., 2004, Goiânia **Anais...** Goiânia: SGA, 2004. p. 63-86.

SIEKKINEN, K. M.; HEIKKILÄ, J.; TAMMIRANTA, N.; ROSENGREN, H. The costs of biosecurity at the farm level: the case of Finnish broiler. In: CONGRESS OF THE EUROPEAN ASSOCIATION OF AGRICULTURAL ECONOMISTS (EAAE), 12., 2008, Grant. **Proceedings...** Grant: EAAE, 2008. p. 26-29.

SIEKKINEN, K. M.; HEIKKILÄ, J.; TAMMIRANTA, N.; ROSENGREN, H. Measuring the costs of biosecurity on poultry farms: a case study in broiler production in Finland. **Acta Veterinary Scandinavia**, v. 54, p. 12-19, 2012.

VIDAL, M. P.; AFERRI, G.; PEREIRA, A. G. S. C.; GAMEIRO, A. H. Modelo matemático para análise econômica de dietas: uma aplicação na avaliação de diferentes cereais na alimentação de cordeiros em confinamento. **Boletim da indústria Animal**, v. 71, p. 273-283, 2014.

CAPÍTULO 5

17 IMPLICAÇÕES

Os conceitos de limpeza e desinfecção são bastante conhecidos na avicultura, sabe-se que existem influências diretas e indiretas destas práticas na produtividade de lotes de frangos de corte assim como na qualidade final dos produtos. Porém poucos são os trabalhos encontrados, os quais conseguem quantificar essas influências tanto em índices produtivos quanto econômicos. Talvez um dos motivos da escassez destes trabalhos esteja relacionada a dificuldade de delinear um experimento adequado para tais mensurações. Como pode ser visto no presente estudo, foi realizado um estudo observacional, onde um único galpão de frangos recebeu em cada uma de suas metades um dos tratamentos avaliados. O cenário ideal, obedecendo as premissas da aleatoriedade, seria que se utilizassem vários galpões e que cada galpão seria admitido como unidade experimental. Mas, trabalhar com tais instalações torna-se oneroso e dificilmente são encontradas instalações experimentais as quais tenham estas características. Para tentar minimizar tal dificuldade, conduziu-se anteriormente o primeiro alojamento do presente estudo, no qual não foram observadas diferenças no desempenho das aves alojadas em cada uma das metades do galpão, desta maneira ficou demonstrado que mesmo que com a impossibilidade da aleatoriedade almejada, o galpão tem condições ambientais extremamente semelhantes para todos os boxes utilizados e ainda não proporciona influências nos resultados de desempenho obtidos.

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que tanto para as análises de desempenho quanto para a análise econômico-financeira a limpeza e desinfecção possuem influências positivas e mostram-se de realização viável, havendo a ainda a possibilidade de aumentar a produtividade dos lotes. Além disso, há a possibilidade de se explorar o potencial preventivo das medidas de limpeza e desinfecção, aliado a conhecida necessidade de redução, ou ainda não utilização de antibióticos promotores de crescimento na produção de aves.

Em relação a *Campylobacter* nota-se que o controle da ocorrência deste patógeno envolve medidas que devem ser tomadas durante o momento de criação, transporte e abate das aves. No presente estudo ficou evidente que mesmo com medidas rígidas de limpeza e desinfecção as quais eliminam esta bactéria do

ambiente, é possível que haja a re-contaminação do ambiente e consequentemente dos frangos, tornando o produto final, a carne, sujeita a contaminação.

A semelhança encontrada entre as cepas circulantes de *Campylobacter* no presente estudo com as avaliadas naqueles realizados em diversos países demonstra a importância do conhecimento das características deste patógeno a fim de elucidar sua patogenicidade. A possibilidade da troca de informação genética entre as bactérias da microbiota ambiental merece destaque, tal fato pode conferir desafios a saúde pública, como modificações nos fatores de virulência e resistência a antibióticos.

O presente estudo com seus resultados tem grande contribuição às práticas preventivas na avicultura, porém ainda pode-se questionar quanto a sua viabilidade fora do ambiente experimental, em outras situações de desafio sanitário, outro ou outros microrganismos, por isto deste trabalho surgem novas dúvidas e hipóteses que fazem com que novos estudos sejam necessários.

18 CONCLUSÃO GERAL

O desempenho produtivo das aves alojadas em instalações submetidas a ao tratamento Proposto de limpeza mostra-se superior aquelas alojadas em instalações onde foram adotados os procedimentos Comuns de limpeza e desinfecção. Este mesmo tratamento possui maior eficiência na redução da contagem total de microrganismos do ambiente e na capacidade de eliminar *Campylobacter* do ambiente produtivo em pisos e bebedouros. O protocolo Proposto mostra-se viável economicamente, havendo ainda a possibilidade da recuperação do capital investido na sua realização.

REFERÊNCIAS

- ALBINO, J. J. **Aplicação das ações de 5 S em aviários de corte e postura**. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2007 Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/59420/1/CUsersPiazzonDocuments31.pdf>>. Acesso em: 2 abr. 2015.
- AMASS, S. F.; RAGLAND, D.; SPICER, P. Evaluation of the efficacy of a peroxygen compound, Virkon S, as a boot bath disinfectant. **Swine Health Production**, v. 9, p. 121–123, 2001.
- BORNE, M. P.; COMTE, S. **Guias Gessuli vacinas e vacinação na produção avícola**. Porto Feliz: Gessuli, 2003. p.140.
- BORSOI, A. **Campylobacter em produtos avícolas e sua importância na saúde pública**. Paraná, 2011. Disponível em: <<http://pt.engormix.com/MA-avicultura/saude/artigos/campylobacter-produtos-avicolas-sua-t604/165-p0.htm>>. Acesso em: 18 abr. 2016.
- BRASIL. Portaria nº 326/MS Junho 1997, Alimentos conforme a lei. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, DF, 06 de novembro de 2002.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual Integrado de vigilância, prevenção e controle de doenças transmitidas por alimentos** Brasília, DF. 2008. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31758>. Acesso em: 1 jun. 2015.
- BURBARELLI, M. F. C.; MERSEGUEL, C. E. B.; RIBEIRO, P. A. P.; LELIS, K. D.; POLYCARPO, G. V.; CARÃO, A. C. P.; ALBUQUERQUE, R. The effects of two different cleaning and disinfection programs on broiler performance and microbiological status of broiler houses. **Revista Brasileira de Ciência Avícola** v. 17, n. 4, p. 575-580, 2015.
- BUTCHER, G. D.; YEGANI, M. **Biosecurity for the poultry industry florida cooperative extension service**. Florida: Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, 2008. Disponível em: <<http://edis.ifas.ufl.edu/pdf/VM/VM13800.pdf>>. Acesso em: 1 jun. 2015.
- CARDOSO, A. L. S. P.; TESSARI, E. N. C. **Salmonella na segurança dos alimentos e na avicultura**, 2008. Disponível em: <http://www.biologico.sp.gov.br/artigos_ok.php?id_artigo=80>. Acesso em: 01 jun. 2015.
- CARMO, G. M. I. **Vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos no Brasil, 1999-2004**. [S.l]: Boletim Eletrônico Epidemiológico, 2005. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/portal/aplicacoes/busca/buscar.cfm>>. Acesso em: 01 jun. 2015.

CARVALHO, A. C. F. B.; CORTES, A. L. L. Contaminação de produtos avícolas industrialização e seus derivados por *Campylobacter jejuni* e *Salmonella*.sp. **Ars Veterinaria**, Jaboticabal, SP, v. 19, n. 1, p. 057-062, 2003.

CARVALHO, A. C. F. B.; LIMA, V. H. C.; PEREIRA, G. T.; SCHOCKEN-ITURRINO, R. P. *Campylobacter* em granja avícola. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias** v. 96, n. 540, p. 191-195, 2001.

COLDEBELLA, A. **Importância da higienização na produção avícola**. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2004. (Embrapa Suínos e Aves; Comunicado Técnico, 363).

COX, B. Biosecurity – the Economics and Benefits – are we fooling ourselves. In: POULTRY SERVICE INDUSTRY WORKSHOP, 2005, Alberta. **Proceedings...** Alberta:PSIW, 2005. 138 p.

CUNNINGHAM, D. L.; FAIRCHILD, B. D. **Biosecurity basics for poultry growers** [S.l]: University of Georgia, USA, 2009. Disponível em: <<http://extension.uga.edu/publications/detail.cfm?number=B1306>>. Acesso em: 22 mar. 2016.

DOYLE, M. P. Association of *Campylobacter jejuni* with laying hens and eggs. **Applied Environmental Microbiology**, v. 47, n. 3, p. 533–536, 1984.

DUARTE, K. F.; JUNQUEIRA, O. M.; BORGES, L. L. **Qualidade e segurança na produção de carne de aves**. [S.l]: Engormix 2010. Disponível em: <<http://pt.engormix.com/MA-avicultura/industria-carne/artigos/qualidade-seguranca-producao-carne-de-aves-t246/471-p0.htm>>. Acesso em: 22 mar. 2016.

FIORENTINI, L. **Aspectos bacteriológicos da reutilização da cama de aviários de frangos de corte**. [S.l]: EMBRAPA Suínos e Aves, 2005. Disponível em: <<http://www.nordeste rural.com.br/nordeste rural/matler.asp?newsId=2833>>. Acesso em: 18 abr. 2015.

FRANCHIN, P. R.; AIDOO, K. E.; BATISTA, C. R. V. Sources of poultry meat contamination with thermophilic *Campylobacter* before slaughter Brazilian **Journal of Microbiology**, v. 36, p. 157-162, 2005.

FREITAS, M. F. L.; LEÃO, A. E. D. S.; STAMFORD, T. L. M.; MOTA, R. A. Ocorrência de *Staphylococcus aureus* em carcaças de frango. **Boletim do Centro de Pesquisas em Processamento de Alimentos**, v. 22, n. 2, p. 271-282, 2004

GREZZI, G. Limpeza e desinfecção na avicultura. In: CONFERÊNCIA APINCO, 2007, Santos. **Anais...** Santos: FACTA, 2007. p. 30.

HERMAN, L.; HEYNDRIKX, M.; GRIJSPEERDT, K.; VANDEKERCHOVE, D.; ROLLIER, I.; DE ZUTTER, L. Routes for *Campylobacter* contamination of poultry meat:epidemiological study from hatchery to slaughterhouse. **Epidemiology Infectious**, v. 131, p. 1169–1180, 2003.

HEYNDRICKX, M.; VANDEKERCHOVE, D.; HERMAN, L.; ROLLIER, I.; DE ZUTTER, L. Routes for salmonella contamination of poultry meat: epidemiological study from hatchery to slaughterhouse. **Epidemiology Infectious**, v. 129, p. 253–265, 2002.

JAENISCH, F. R. F. **Procedimentos de biosseguridade na criação de Aves**. [S.l]: EMBRAPA, 2000. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/439730/1/CUsersPiazzonDocuments258.pdf>>. Acesso em: 10 jun. 2015.

JAENISCH, F. R. **Sistemas de produção de frangos de corte. Saúde dos frangos**. [S.l] EMBRAPA, 2003. Disponível em: <<https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Ave/ProducaoodeFrangodeCorte/Sanidade-aves.html>>. Acesso em: 10 jun. 2015.

KUANA, S. L.; SANTOS, L. R.; BEATRIZ, L.; SALLE, C. T. P.; MORAES, H. L. S.; NASCIMENTO, V. P. Ocorrência de *Campylobacter* em lotes de frangos de corte e nas carcaças correspondentes. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 2, p. 480-486, 2008.

MACHADO, R. A. **Microbiota bacteriana no processamento industrial de frangos e sua influência na vida útil de carcaças refrigeradas**. 1992. 165 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1992.

MEROZ, M.; SAMBERG, Y Disinfecting poultry production premises **Science Technology Of International Epizoties**, v. 14, n. 2, p. 273-291, 1995.

MIWA, N.; TAKEGAHARA, Y.; TERA, K.; KATO, H.; TAKEUCHI, T. *Campylobacter jejuni* contamination on broiler carcasses of *C. jejuni*-negative flocks during processing in a Japanese slaughterhouse. **International Journal of Food Microbiology**, v. 84, p. 105-109, 2003.

MORISHITA, T. Y.; J. C. GORDON. **Cleaning and disinfection of poultry facilities**. [S.l.]: Extension Fact Sheet Ohio State University, 2002. Disponível em: <https://www.aphis.usda.gov/emergency_response/tools/cleaning/htdocs/images/Annex09_Cleaning.pdf>. Acesso em: 21 abr. 2015

MULLER, I. **A importância da limpeza e desinfecção nas granjas**. 2008 Disponível em: <<http://www.portaldoagronegocio.com.br/index.php?p=texto&&idT=878>>. Acesso em: 22 dez 2012

NEILL, S.; CAMPBELL, J.; O'BRIEN, J. Egg penetration by *Campylobacter jejuni*. **Avian Disease**, v. 14, n. 3, p. 313–320, 1985.

NEWELL, D. G.; FEARNLEY, D. G. C. Sources of *Campylobacter* Colonization in broiler chicken **Applied and Environmental Microbiology** v. 69, n. 8, p. 4343–4351, 2003.

OLIVEIRA, K. A. M.; MENDONÇA, R. C. S.; ANDRADE, N. J.; ALBINO, L. F. T. Ocorrência de *Campylobacter* no ambiente de criação de frango de corte **Revista Ceres**, v. 55, n. 6, p. 556-561, 2008.

OUROFINO SAÚDE ANIMAL. **Programa de Limpeza e Desinfecção para a Indústria de Suínos e Aves**. [S.l]: Ourofino, 2004. Disponível em:

<http://www.ourofino.com/portal/files/programas/programa_limpeza_e_desinfeccao_.pdf> Acesso em: 18 set. 2014.

PAYNE, J. B.; KROGER, E. C.; WATKINS, S. E. Evaluation of litter treatments on salmonella recovery from poultry litter. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 11, p. 239-243, 2002.

PETERSON, C. A.; DVORAK, G.; SPICKLER, A. R. **Maddie's infection control manual for animal shelters: for veterinary personel**. Iowa: Pet Rescue Foundation, 2008.. Disponível em:

<<http://www.cfsph.iastate.edu/BRM/resources/Disinfectants/Disinfection101Feb2005.pdf>>. Acesso em: 02 jun. 2015.

RISTOW, L. E. Desinfetantes e desinfecção em avicultura. **Aveworld**, v. 10, n. 29, p. 25-32, 2008.

SALEHA, A. A.; MEAD, G. C.; IBRAHIM, A. L. *Campylobacter jejuni* in poultry production and processing in relation to public health. **Journal World Poultry Science**, v. 54, p. 49-58, 1998.

SANEI, B.; INNES, P. Biosecurity recommendations for commercial poultry flocks **FactSheet**, v. 5 n. 77, Ontario, 2005 Disponível em:

<<http://www.omafra.gov.on.ca/english/livestock/poultry/fa>>. Acesso em: 02 jun. 2015.

SESTI, L. A. C.; SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D. E. S. N. Limpeza e desinfecção em suinocultura. **Suinocultura Dinâmica**, Concórdia, SC, v. 6, n. 20, p. 1-15, 1998.

SESTI, L. A. C. Biosseguridade em avicultura: controle integrado de doenças. In: SIMPÓSIO GOIANO DE AVICULTURA, 2004, Goiânia. **Anais...** Goiânia, GO, 2004.

SHELTON A.; MCCREA, B. **Cleaning and disinfection in pasture based poultry management sytems**. Delaware: Cooperative Extension Delaware State University, 2012. 3 p. Disponível em:

<<http://www.desu.edu/sites/default/files/u24/Cleaning%20and%20Disinfection.pdf>>. Acesso em: 02 jun. 2015.

SILVA, J. A; AZERÊDO, G. A.; BARROS, C. M. R.; COSTA, E. L.; FALCÃO, M. M. S. Incidência de bactérias patogênicas em carne de frango refrigerada. **Higiene Alimentar**, v.16, n.100, p. 97-101, 2002.

SILVA, J. A.; AZERÊDO, G. A.; BARROS, C. M. R.; COSTA, E. L.; FALCÃO, M. M. S. Incidência de bactérias patogênicas em carne de frango refrigerada. **Higiene Alimentar**, v.16, n. 100, p. 97-101, 2002.

SILVA, P. L. **Desafios atuais na produção e na sanidade avícola**. [S.l.] Engormix, Uberlândia, MG, 2009. Disponível em: < <http://pt.engormix.com/MA-avicultura/saude/artigos/desafios-atuais-producao-sanidade-t216/165-p0.htm>>. Acesso em: 02 jun. 2015.

SONCINI, R. A. O GMP como ferramenta da biossegurança na avicultura. In: SIMPÓSIO TÉCNICO DE INCUBAÇÃO, MATRIZES DE CORTE E NUTRIÇÃO, 1., 2007, Balneário Camboriú. **Anais...** Balneário Camboriú, SC, 2007.

STRINGFELLOW, K.; ANDERSON, P.; CALDWELL, D.; LEE, J.; BYRD, J.; MCREYNOLDS, J.; CAREY, J.; NISBET, D.; FARNELL, M. Evaluation of disinfectants commonly used by commercial poultry industry under simulated field conditions. **Poultry Science**, v 12, n. 88, p.1151-1155, 2009.

TE WINKEL, G. P.H. Biosecurity in poultry production: where are we and where do we go? **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 45, p. 361-372, 1997.

TOKACH, M. D.; GOODBAND, R. D.; DEROUCHÉY, J. M.; DRITZ, S. S.; NELSEN, J. L. Feeding and barn management strategies that maximize feed efficiency. In: _____. **Feed efficiency in swine**. Wageningen: Wageningen Academic Publishers, 2012. p. 41-59

UNIÃO BRASILEIRA DE AVICULTURA (UBABEF). **Relatório Anual 2014**. [S.l.]: União brasileira de avicultura, 2014. Disponível em: <<http://www.uba.org.br/>>. Acesso em: 4 set. 2015.

UNIVERSITY OF GEORGIA. AGROSECURITY (UGA). **Cleaning and disinfection premisses**. Georgia, 2005. 25 p. Disponível em: <http://www.agrosecurity.uga.edu/annexes/Annex09_Cleaning.pdf>. Acesso em: 2 maio 2016.

VAN AMSON, G.; HARACEMIV, S. M. C.; MASSON, M. L. Levantamento de dados epidemiológicos relativos à ocorrências/ surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTAs) no estado do Paraná Brasil, no período de 1978 a 2000. **Ciência Agrotecnologia**, v. 30, n. 6 p. 1139-1145, 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S141370542006000600016&lng=en&nrm=isso>. Acesso em: 02 jun. 2015.

VAZ, C. S. L. Campylobacter na segurança dos alimentos e na avicultura. **Avicultura Industrial**, v. 99, n. 1165, p. 15-19, 2008.

VENTURINI, K. S.; SARCINELLI, M. F.; SILVA, L. C. **Características da carne de frango**. Espírito Santo: Universidade Federal do Espírito Santo. UFES, 2007. Disponível em: <https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/caracteristicas_da_carne_de_frango_000fy1kfoyu02wx5ok0pvo4k3r15t9pj.pdf>. Acesso em: 02 jun. 2015.

ANEXO A

CONTRATO DE PARCERIA AVÍCOLA

Pelo presente instrumento de parceria avícola, de um lado [REDACTED] com sede no município de [REDACTED] inscrito no [REDACTED] pessoa jurídica de direito aqui denominada **INTEGRADOR**, por seus representantes legais infra firmado e do outro lado [REDACTED] sociedade com sede no município de [REDACTED] Estado de São Paulo, no [REDACTED] inscrita no C.P.F. sob o nº [REDACTED] inscrição de produtor nº IP.- [REDACTED], pessoa jurídica de direito privado, infra firmado doravante denominado **Parceiro Criador** ficou ajustado o presente **Contrato de Parceria Avícola**, que se regerá pelo art. 1.416 e seguintes do Código Civil Brasileiro mediante as condições e cláusulas que seguem:

PRIMEIRA - O Integrador entregará ao Parceiro Criador a quantidade de **14.000**, pintos de um dia para serem criados e terminados em propriedades do segundo concorrendo o Integrador para tal fim com as rações e medicamentos necessários para a criação e engorda das aves sendo que as eventuais sobras serão recolhidas ou transferidas para o lote seguinte.

Parágrafo único - O número de pintos acima indicado poderá sofrer variação para mais ou para menos em até 30%

SEGUNDA - O Parceiro Criador dispensará todos os cuidados necessários e indispensáveis para a criação e terminação das aves que poderá dispor de assistência técnica do Integrador através de técnicos especializados e habilitados podendo dispor ainda de orientação quanto à terminação de aves tanto no que diz respeito às instalações, equipamentos, como manejo e condições sanitárias a serem observadas objetivando um melhor resultado.

TERCEIRA - O Parceiro Criador receberá do Integrador a título de parceria uma percentagem sobre o total de números de aves produzidas para cortes, posto no abatedouro, que variará de acordo com resultado técnico de conversão alimentar, conforme tabela 1 anexa, sendo que a idade para a retirada das aves será regida pelo peso médio necessário ao abatedouro, ficando acertando que não haverá descontos por condenação sanitária.

PARÁGRAFO PRIMEIRO - Caso haja qualquer alteração no percentual de descontos nas tabela 1 anexa o Integrador remeterá nova tabela ao Parceiro Criador que deverá se manifestar no prazo de 10 dias contados a partir do recebimento da nova tabela, caso o Parceiro Criador não se manifeste por escrito, a tabela será considerada aceita pelo Integrador.

PARÁGRAFO SEGUNDO - Caso o Parceiro Criador não aceite a nova tabela citada no parágrafo anterior, ficará a opção do Integrador continuar ou fazer a rescisão do presente contrato, independente de qualquer aviso ou prévia notificação.

QUARTA - O Parceiro Criador preferencialmente venderá ao Integrador, os quilos de aves obtidos da parceria avícola, pelo valor estipulado na tabela 1 anexa, os quilos obtidos deverão ser considerados pela balança do Integrador, podendo haver pesagem de conferência na balança escolhida pelo parceiro criador. Para a efetuação do pagamento, é obrigatória a disponibilização do Talão de Nota Fiscal de Produtor Rural do parceiro Produtor, para o preenchimento dos valores do fechamento. O pagamento somente será realizado pelo departamento financeiro da Ad'oro após estarem todas as Notas Fiscais emitidas.

QUINTA - As despesas relacionadas com cama, fornecimento de condições ambientais adequadas às aves como todos os serviços, desde a preparação das instalações, das aves para abate, correrão por conta exclusiva do Parceiro Criador que se obriga a fornecer toda a mão de Obra necessária, sua ou de terceiros, respondendo pelos encargos sociais ou trabalhistas previstos em lei, ficando o carregamento das aves por conta da empresa Integradora .

SEXTA - O Integrador poderá acompanhar e fiscalizar, sempre que entender necessário, a criação e engorda das aves para o que lhe é assegurado livre e permanente acesso às instalações nas quais o plantel está sendo terminado.

SÉTIMA - Ocorrendo mortalidade das aves em criação, o Parceiro Criador dará ciência do fato em tempo hábil ao Integrador que poderá proceder ao exame, diagnóstico e providências técnicas que julgar necessárias.

Caso o Parceiro Criador não notifique o Integrador dos fatos acima em tempo hábil para se tomar as devidas providências este será obrigado a indenizar o Integrador pelo valor de todas aves mortas ou doentes.

OTÁVIA - A eventual deficiência no manejo do plantel, o descumprimento das normas técnicas, a utilização indevida das rações e medicamentos fornecidos pelo Integrador ou a infringência de qualquer outra disposição nas cláusulas anteriores é motivo bastante para a rescisão deste contrato, além de obrigar o Parceiro Criador a indenizar o Integrador pelos danos decorrentes de tais atos.

NONA - O presente contrato terá prazo indeterminado, iniciando-se a partir da data abaixo e podendo ser rescindido por qualquer uma das partes mediante prévio aviso por escrito, que terá a antecedência de no mínimo 03 (três) **LOTES** de aves além daquele que estiver em andamento no momento da entrega do aviso.

PARÁGRAFO PRIMEIRO - A parte que não obedecer os prazos acima afixados estará sujeita a uma multa de um valor equivalente a 600 gramas de frango vivo cotados na data do efetivo pagamento da multa, por ave constante na cláusula primeira.

DECIMA - Em obediência aos dispositivos legais fica assegurada a conservação dos recursos naturais e a proteção social e econômica dos parceiros, de acordo com o art. 13 do Decreto n. 58566/66 de 14/11/66.

DS **DÉCIMA PRIMEIRA** - Fica eleito o foro da comarca de São Paulo, para qualquer ação fundada neste contrato.

DÉCIMA SEGUNDA - Este contrato terá validade substituindo e revogando todo e qualquer contrato firmado anteriormente entre as partes.

E assim por estarem justos e contratados, assinam o presente instrumento em três vias de igual teor e forma, na presença de duas testemunhas, sendo a terceira via destinada ao Cartório de Registros de Títulos e Documentos para o devido registro.

TABELADO DE NOTAS E DE PROTESTO
DE TITULOS DE CORDEIROPOLIS - SP
VALDIR LOPES ESTEVAN - DESIGNADO
MEZ DE MAIO, 303-FONE(19)3546-3727

22 de Janeiro de 2008.

En test. 24 de Janeiro de 2008.

MURCIA AP. DE SOUZA 03/15 ESCRIVENTE
 NUNCA: 305662495012-426649453178-049
 (R UNITARIO: R\$ 4,50 Total: R\$ 4,50)

Documento sem valor econômico
USO SOMENTE COM SELLO DE AUTENTICAÇÃO

INTEGRADOR

PARCEIRO CRIADOR

TESTEMUNHAS:

DEMONSTRATIVO DE REMUNERAÇÃO DE INTEGRAÇÃO P/ LOTES MISTOS e SEX.

• Cálculo para Remuneração:

* MACHO :	Remuneração = 0,2609 x Q x M
* FÊMEA :	Remuneração = 0,2222 x Q x M
* MISTO :	Remuneração = 0,2400 x Q x M

Q - Quantidade Final de Aves
M - Multiplicador

○ **multiplicador** obtém-se através da diferença de conversão, ou seja:

$$M = CE - CC$$

Onde: CE - Conversão esperada para a semana, estabelecida mediante o resultado médio de CAC obtido para cada sexo na semana de saída da granja, visando com isto homogeneizar condições como pintos alojados, ração utilizada, da época do ano, etc

CC - Conversão corrigida obtida através da seguinte fórmula:

$$* \text{ Todos } CC = CR + \frac{(2,400 - PM)}{3,5}$$

Onde: PM - Peso médio das aves;

CR - Conversão real obtida (quantidade ração : quantidade de quilos carne)

Tendo o valor da diferença de conversão, utilizar a tabela abaixo para obter o multiplicador:

Dif. CAC	Multiplicador	Dif. CAC	Multiplicador
0,241 a 0,250	1,745	0,000	1,000
0,231 a 0,240	1,715	-0,001 a -0,010	0,973
0,221 a 0,230	1,685	-0,011 a -0,020	0,946
0,211 a 0,220	1,655	-0,021 a -0,030	0,919
0,201 a 0,210	1,626	-0,031 a -0,040	0,892
0,191 a 0,200	1,596	-0,041 a -0,050	0,865
0,181 a 0,190	1,566	-0,051 a -0,060	0,838
0,171 a 0,180	1,536	-0,061 a -0,070	0,810
0,161 a 0,170	1,506	-0,071 a -0,080	0,783
0,151 a 0,160	1,477	-0,081 a -0,090	0,756
0,141 a 0,150	1,390	-0,091 a -0,100	0,729
0,131 a 0,140	1,364	-0,101 a -0,110	0,702
0,121 a 0,130	1,338	-0,111 a -0,120	0,675
0,111 a 0,120	1,312	-0,121 a -0,130	0,648
0,101 a 0,110	1,286	-0,131 a -0,140	0,621
0,091 a 0,100	1,271	-0,141 a -0,150	0,594
0,081 a 0,090	1,244	-0,151 a acima	0,594
0,071 a 0,080	1,217		
0,061 a 0,070	1,190		
0,051 a 0,060	1,163		
0,041 a 0,050	1,135		
0,031 a 0,040	1,108		
0,021 a 0,030	1,081		
0,011 a 0,020	1,054		
0,001 a 0,010	1,027		

Onde :

- sinal (-) indica CAC pior que a média da semana
- sinal (+) indica CAC melhor que a média da semana

Esta tabela substitui a anterior e terá vigência a partir do dia 09/06/2006
Prazo de pagamento da remuneração: 21 Dias da data da saída do lote.