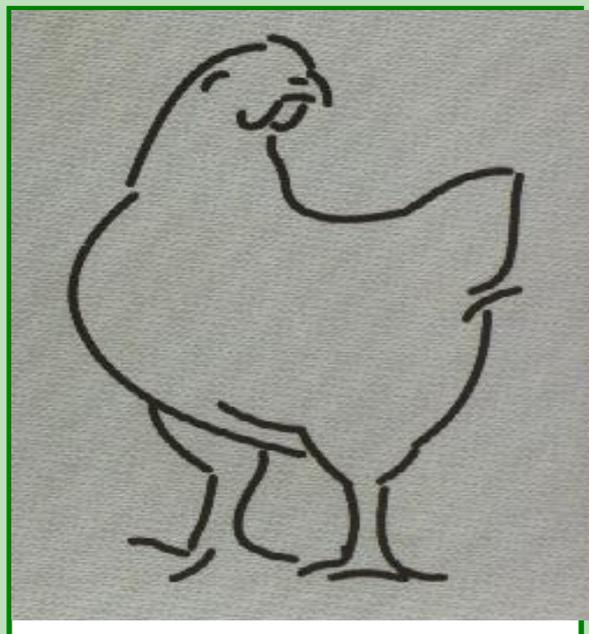




Simpósio sobre Ambiência, Sanidade e Qualidade da Carcaça de Frangos de Corte

09 a 10/12/97 - Concórdia, SC

Anais



***Simpósio sobre
Ambiência, Sanidade e
Qualidade da Carcaça de
Frangos de Corte***

09 a 10/12/97 - Concórdia, SC

Anais

Embrapa

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL

Presidente: Fernando Henrique Cardoso

Ministro da Agricultura e do Abastecimento: Arlindo Porto Neto

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA

Presidente: Alberto Duque Portugal

*Diretores: Dante Daniel Giacomelli Scolari
Elza Ângela Battaglia Brito da Cunha
José Roberto Rodrigues Peres*

CENTRO NACIONAL DE PESQUISA DE SUÍNOS E AVES - CNPSA

*Chefe Geral: Dirceu João Duarte Talamini
Chefe Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento de Suínos:
Paulo Roberto Souza da Silveira
Chefe Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento de Aves:
Gilberto Silber Schmidt
Chefe Adjunto de Apoio Técnico e Administrativo:
Ademir Francisco Giroto*

Embrapa Suínos e Aves. Documentos, 47

Exemplares desta publicação podem ser solicitados à:

Embrapa Suínos e Aves
Br 153 - Km 110 - Vila Tamanduá
Caixa Postal 21
89.700-000 - Concórdia - SC

Telefone: (049) 4428555

Fax: (049) 4428559

Tiragem: 300 exemplares

Tratamento Editorial: Tânia Maria Biavatti Celant

SIMPÓSIO SOBRE AMBIÊNCIA, SANIDADE E QUALIDADE
DA CARÇA DE FRANGOS DE CORTE, 1997,
Concórdia. **Anais ...** Concórdia: EMBRAPA - CNPSA,
1997. 111p. (EMBRAPA-CNPSA. Documentos, 47).

1. Frango de corte – carcaça – qualidade. 2. Frango
de corte – ambiência – manejo. 3. Frango de corte –
sanidade. I. Título. II - Série.

CDD 636.508

RESPOSTAS FISIOLÓGICAS DE FRANGOS DE CORTE CRIADOS EM ALTA DENSIDADE

Marcos Macari e Susane Siste Campos

Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Unesp
Campus de Jaboticabal
14870-000 Jaboticabal-SP.
Email: macari@fcav.unesp.br

Introdução

A avicultura teve grande avanço nas últimas décadas, sendo este fato associado à grande capacidade do setor no aprimoramento das linhagens, das condições sanitárias, do manejo, da alimentação, da ambiência, do processamento, dentre outras. No entanto, a criação de frangos de corte continua encontrando grandes desafios, pois constantemente se procuram patamares mais elevados de produtividade. Dentre estes desafios, encontramos nos países tropicais e subtropicais, condições de alta temperatura e alta umidade do ar, que quando conjugados, são limitantes para o bom desempenho produtivo das aves.

É fato conhecido que os frangos de corte necessitam de ambiente termoneutro para expressar toda a sua carga genética relacionada com o crescimento, tanto do tecido ósseo bem como do tecido muscular. Assim, o equilíbrio térmico perfeito é alcançado quando a quantidade de calor produzido é igual a quantidade dissipada, e isto, com menor custo energético. Neste sentido, o aperfeiçoamento dos galpões avícolas e das técnicas de manejo têm possibilitado superar efeitos prejudiciais de alguns elementos climáticos, específicos de determinadas regiões, e com isso alcançar bom desempenho produtivo dos frangos de corte. Há, contudo no mercado uma forte tendência da utilização de galpões climatizados ou semi-climatizados, a fim reduzir o impacto do ambiente na produção avícola.

As perdas econômicas devido ao estresse ambiental são muito importantes, pois ocorrem frequentemente próximo ao período de comercialização. Devido à expansão da produção de frangos e ao aumento nos custos de construção dos galpões há grande interesse em aumentar o número de aves/m², ou mesmo, aumentar o número de quilogramas de aves/m², com a finalidade de maximizar a produção por área, porém sem expandir o número ou área construída dos galpões.

É comum no Brasil a densidade de 10 aves/m² no sistema de criação de frangos de corte; contudo, em países como Japão, Dinamarca, França esta densidade por atingir até 20 aves/m². Inúmeros são os problemas que podem resultar no sistema de criação quando do aumento da densidade. Por exemplo, problemas de cama (aumento da umidade e deterioração da cama, aumento do

teor de amônia no ambiente, menor velocidade de crescimento das aves, dentre outros. Assim, a instalação para criação de frangos em altas densidades requer alguns cuidados adicionais, a fim de proporcionar condições adequadas para o melhor desenvolvimento das aves.

Poucos são os trabalhos na literatura que procuram relacionar os aspectos de densidade com a fisiologia dos frangos de corte. A maioria dos pesquisadores se atêm aos aspectos das instalações ou mesmo temperatura e umidade do ar, e seus impactos sobre o performance zootécnico das aves. Nesta palestra procuraremos abordar alguns aspectos relacionadas à fisiologia do frango de corte quando criado em alta densidade. Esta é uma das linhas de investigação de nosso grupo de pesquisa, sendo que os resultados a serem mostrados referem aos mecanismos físicos de perda de calor em frangos de corte criados em diferentes densidades no verão e inverno. Assim, o enfoque principal será o da fisiologia térmica.

Princípios gerais de perda de calor

Os mecanismos básicos de perda de calor estão relacionados aos processos físicos de perda de calor sensível e calor não-sensível, ou seja, a perda de calor pelos processos de radiação, condução e convecção e perda de calor pelo processo evaporativo. As equações que regem estes processos de dissipação de calor, são equações físicas e que configuram alta precisão dos resultados obtidos.

Perda de calor por radiação:

$$R = \varepsilon_1 \varepsilon_2 A h (T_p^4 - T_a^4)$$

Perda de calor por convecção:

$$C = hc (T_p - T_a)$$

Perda de calor por condução:

$$K = hf (T_p - T_a)$$

onde: ε - emissividade dos corpos 1 e 2

A - área em metros quadrados

h - constante de Stefan-Boltzman

T_p - temperatura média da pele

T_a - temperatura ambiente

hc e hf - constantes

É interessante notar que em todas estas equações, a variável que mais interfere nos processos de perda de calor, é a diferença de temperatura entre a pele do frango (temperatura média da pele) e a temperatura ambiente, sendo que para a perda de calor por radiação estas temperaturas estão elevadas a quarta potência.

A perda de calor pelo processo evaporativo pode ser cutânea e respiratória. Em que pese as aves não apresentarem glândulas sudoríparas, ocorre perda de calor pelo processo evaporativo cutâneo, pois há difusão de água para a pele da ave.

As equações que regem estes fenômenos são:

Perda de calor por evaporação cutânea (Ec)

$$E_c = h_e (@_p V_p - @_a V_a) Y$$

Perda de calor por evaporação respiratória (Er)

$$E_r = V (J_{ex} - @_a J_{ins}) Y$$

onde,

h_e - coeficiente de troca de calor

$@$ - umidade do ar

pV - pressões de vapor

V - volume minuto respiratório

J_{ex} - g de água no ar expirado

J_{ins} - g de água no ar inspirado

Y - calor latente

Também é importante notar que para a perda de calor por evaporação a mais importante variável é a pressão de vapor no ar ambiente. Assim, em ambiente com alta saturação a perda de calor pelo processo evaporativo (respiratório e cutâneo) é muito reduzida.

O estudo dos mecanismos que interferem nos processos de perda de calor em diferentes densidades torna-se relevante, considerando que, em função da sazonalidade de variação da temperatura e umidade do ar, a tolerância ao estresse ambiental dos frangos de corte pode ser alterada, permitindo um melhor conforto das aves e, como consequência melhor desempenho produtivo.

Nível de energia da ração

O nível de energia da ração influencia também no desempenho dos frangos de corte criados em diferentes temperaturas ambientais. Assim, na década de setenta já era pensamento a formulação de rações sazonais. É fato, também conhecido, que em ambientes de altas temperaturas e alta umidade utiliza-se rações com densidade energética mais elevada, sendo que nestas condições de arraçoamento a taxa metabólica dos frangos de corte é mais elevada do que a de animais alimentados com ração de teor energético mais baixo. Este fato está associado aos mecanismos de produção de calor. Campos (1995) mostrou que a utilização de níveis energéticos elevados durante o verão pode contribuir

negativamente para a dissipação de calor por irradiação pelos frangos de corte, sendo este fato devido à maior quantidade de calor gerado e ao menor gradiente térmico existente entre a ave e o ambiente. Estes achados foram obtidos quando as aves foram criadas na densidade de 10 aves/m².

Período do dia

A temperatura ambiente apresenta picos mínimo e máximo em função da posição do sol, ou seja, a menor temperatura durante o dia é obtida imediatamente antes do nascer do sol (ANS), sendo que a temperatura máxima é durante o zenit (sol a pino - PMA). No entanto, em galpões avícolas a temperatura máxima poderá ser função da inércia do telhado, pois quanto maior for a inércia térmica mais tarde seja a temperatura máxima. Assim, quando se mensura os processos de perda de calor (os quais são dependentes da diferença de temperatura média da pele e temperatura ambiente) estaremos com os valores máximo e mínimo de perda de calor.

Variação de parâmetros fisiológicos de frangos de corte criados em diferentes densidades no inverno e verão

Temperatura retal

Na Tabela 1 é mostrado o efeito do período do dia (antes do nascer do sol - ANS ou sol a pino - PMA) e da interação entre período e idade sobre a temperatura retal dos frangos de corte. Os dados mostram que a temperatura retal dos frangos de corte depende do período do dia (sendo maior durante o dia do que antes do nascer do sol) e não mostrou dependência com a densidade de criação. Por outro lado, o nível de energia da dieta influenciou a temperatura retal apenas durante o inverno (frangos de corte alimentados com rações energeticamente mais densa (3.200 kcal EM/kg) apresentaram temperaturas retais maiores), sendo que no verão o nível de energia da dieta não teve influência significativa sobre a temperatura retal dos frangos de corte. A idade do frango teve forte influência sobre a temperatura retal, pois as aves mais velhas apresentaram temperaturas retais mais elevadas do que as aves jovens. Estes achados mostram que a densidade de criação não tem grande influência sobre a temperatura retal dos frangos de corte quando criados no inverno ou verão, mas parâmetros como idade, período do dia e energia da dieta têm efeito significativo sobre esta variável termorregulatória, principalmente quando os frangos são criados no inverno.

Perda de calor por radiação (Rd em Watts)

Considerando que a perda de calor pelo processo de radiação depende da diferença de temperatura da pele (temperatura média) e temperatura ambiente e, considerando que este gradiente térmico é maior no inverno do que

no verão, os dados obtidos em nossas investigações serão analisados de acordo com a variação sazonal.

a) Verão

Os valores do quadrado médio são mostrados na Tabela 1, sendo que interações significativas foram encontradas entre as variáveis pesquisadas. Os valores de Rd mostraram-se maiores em função da idade das aves, sendo que com 42 dias de idade estas apresentaram níveis de Rd acima de 5W e com valores significativamente maiores ($p < 0,01$) para os frangos de corte criados na densidade de 18 aves/m² (Figura 1). O efeito da densidade também foi notado quando as análises foram realizadas em função do período do dia. Assim, valores maiores de Rd foram obtidos no período da manhã antes do nascer do sol e para as aves criadas na densidade de 18 frangos/m² (Figura 2). Estes achados permitem-nos concluir que, em condições de verão, a perda radiativa de calor tem papel importante na manutenção da homeostase térmica em frangos de corte criados em altas densidades (por exemplo 18 frangos/m²). Esta situação de perda calórica torna-se ainda mais relevante quando as aves são submetidas a condições ambientais que as demais vias de perda de calor são desfavoráveis, como na ausência de ventilação, aspersão e perda de calor por condução.

Outra conclusão destes achados é que com o aumento da energia da dieta ocorre a necessidade de maior perda de calor por radiação quando a densidade é aumentada. As Figuras 3 e 4 mostram que com o aumento da densidade e do nível de energia da dieta a perda de calor por radiação aumenta, a fim de manter a homeotermia nestes animais.

Considerando que em condições de verão o gradiente térmico entre pele e ambiente desfavorece a perda de calor por radiação, a adoção de técnicas de manejo que favoreçam a perda de calor por evaporação ou condução são altamente recomendadas quando do aumento da densidade. Assim, ventilação e aspersão (sistema de túnel), ou mesmo melhoria das condições de ambiência que reduzam a incidência de radiação solar nos galpões (pintura de telhado, telhas isolantes, forramento, etc.).

b) Inverno

A Tabela 1 mostra, também, os quadrados médios para Rd das análises realizadas neste trabalho. A Figura 5 mostra que maiores valores de perda de calor por radiação (Rd) foram verificados para os frangos de corte alimentados com ração de teor energético mais elevado (3.200 kcal EM/kg), e criados em densidades elevadas (18 aves/m²). Salienta-se que os frangos criados com nível de energia baixo (2.900 kcal EM/kg) e na densidade de 18 aves/m² foram os que apresentaram menores valores de Rd. Estes achados, novamente reforçam a idéia que o aumento da energia da dieta tem como consequência maior atividade metabólica e, que devido ao maior gradiente térmico entre a pele do frango e o ambiente, no inverno, a perda de calor por radiação aumenta. As Figuras 6 e 7 mostram que a Rd aumenta com a idade, sendo que para as aves alimentadas

com 3.200 kcal EM/kg o pico máximo de Rd foi de 13W, e para as aves arraçadas com 2.900 kcal EM/kg este valor máximo foi de 10W. Neste sentido, a idéia de que no inverno o aumento da densidade reduziria a perda de calor para o meio, parece não ser válida para a perda radiativa de calor, pois trata-se da perda de calor através de comprimento de onda curto, ficando na dependência do gradiente de temperatura entre a pele do frango e o meio ambiente.

“Turnover” de água e umidade da cama

Nestes experimentos não foram avaliadas as temperaturas superior e inferior da cama, sendo que as mesmas tiveram diferentes alturas (5, 10 e 15 cm de altura). Considerando que durante o estresse pelo calor (condições de verão), ocorre um aumento da quantidade de água ingerida e, neste sentido, um aumento da quantidade de urina formada, a qualidade da cama nestas condições dependeria da densidade de criação. Assim, densidades maiores associadas a maior ingestão e maior “turnover” de água, afetariam a cama de forma diferente.

A Tabela 2 mostra os valores de quadrados médios das variáveis pesquisadas, sendo que está sendo mostrado o efeito de cada variável, e não as possíveis interações entre as mesmas. Assim, o período do dia interfere na temperatura da cama (inferior e superior), mas não na umidade da mesma, independente da sazonalidade. Como era esperado a altura da cama tem importante influência na umidade da cama, ou seja, maior altura de cama determina menor umidade da mesma. A densidade teve efeito estatisticamente significativo sobre a temperatura e umidade, tanto no inverno como no verão, exceto na temperatura superior da cama em condições de verão. O mesmo efeito foi obtido para idade, pois a medida que os frangos se desenvolveram maior o turnover de água, e maior seu efeito sobre temperatura e umidade da cama, tanto no inverno como no verão.

A umidade da cama variou em função da altura da mesma e da densidade de animais criados por metro quadrado. Assim, a Tabela 3 mostra a variação da umidade da cama em função da densidade e idade das aves quando o experimento foi desenvolvido nos meses de verão.. Serão mostrados apenas os resultados a partir do 31º dia de idade.

No inverno a umidade da cama foi diferente apenas para a altura de cama de 5 cm. Este fato mostra que no inverno, com turnover de água menor, densidades de criação elevadas têm pouco efeito sobre a umidade da cama. A Tabela 4 mostra o efeito da altura da cama sobre a umidade da mesma durante o inverno. A Tabela 5 relaciona os valores de umidade da cama durante o inverno em função da densidade e idade dos frangos de corte.

Tabela 1 - Quadrados médios para a temperatura retal e perda de calor por radiação (Rd) em frangos de corte criados em diferentes densidades (10, 14 e 18 aves/m²) no inverno e no verão.

C.variação	G.L.	Quadrados Médios			
		Inverno		Verão	
		Temp. retal	Rd	Temp. retal	Rd
Período (P)	1	72,89**	1676,47**	203,42**	1695,02**
Energia (E)	1	1,31**		219,23**	1,60ns
		40,69**			
Densidade	2	0,41ns		18,71**	2,34ns
		13,07**			
Resíduo (a)	60	0,15	1,22	0,99	0,48
Idade (I)	32	0,99**		370,49**	4,25**
		62,65**			
Resíduo (b)	1890	0,06	0,56	0,80	0,23

Período - antes do nascer do sol (ANS) e pico (PMA)

Energia - 2.900 e 3.200 kcal EM/kg

Densidade - 10, 14 e 18 frangos/m².

Idade - 10 a 42 dias de idade

Observação: não são mostradas na Tabela as interações entre variáveis.

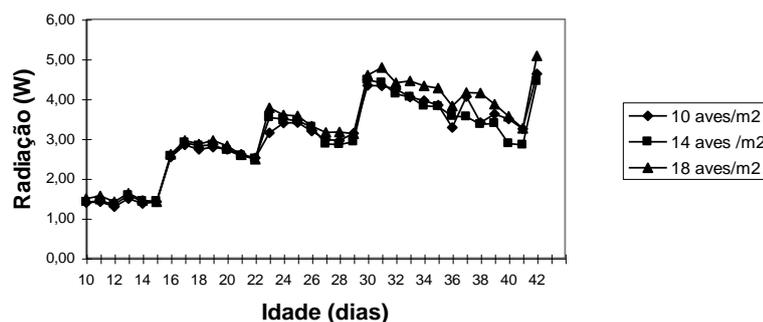


FIG. 1 - Efeito da idade sobre a perda de calor por radiação (em Watts) em frangos de corte criados em diferentes densidades populacionais em condições de verão.

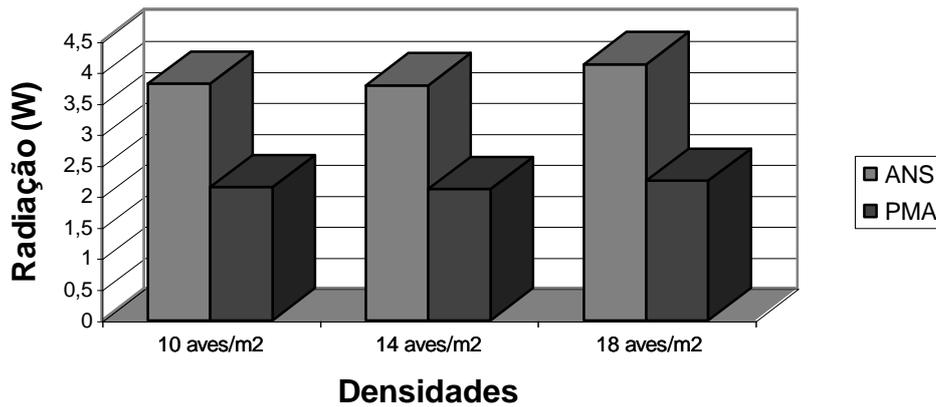


FIG. 2 - Efeito do período do dia (antes do nascer do sol - ANS e período de altura máxima - PMA) sobre a perda de calor por radiação em frangos de corte criados em diferentes densidades no verão.

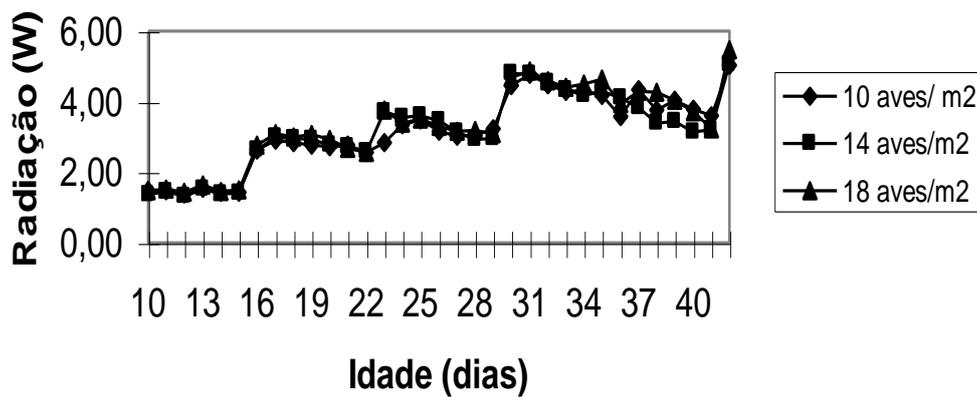


FIG. 3 - Perda de calor por radiação em frangos de corte criados em diferentes densidades e arraçoados com dieta de alto nível energético (3.200 kcal EM/kg) em condições de verão.

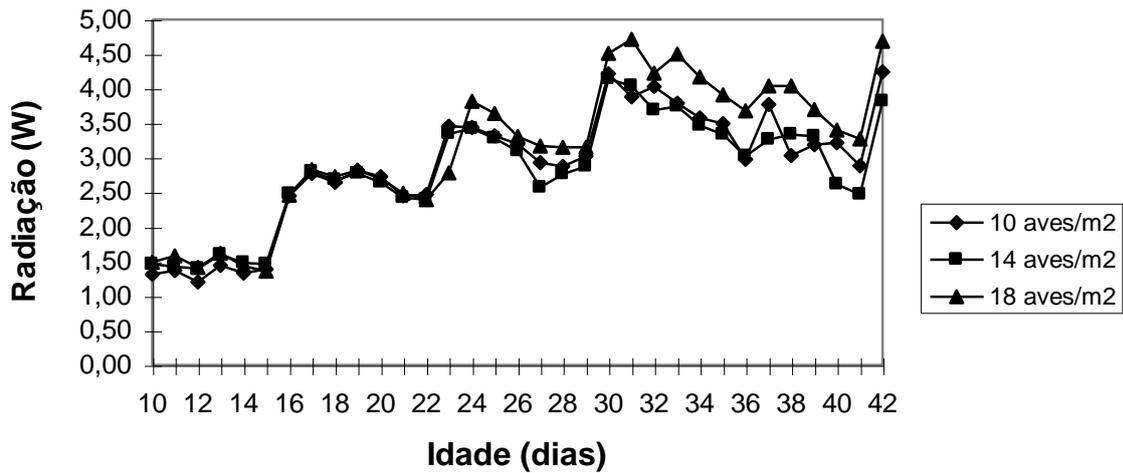


FIG. 4 - Perda de calor por radiação em frangos de corte criados em diferentes densidades e arraçoados com dieta de baixo nível de energia (2.900 kcal EM/kg) em condições de verão.

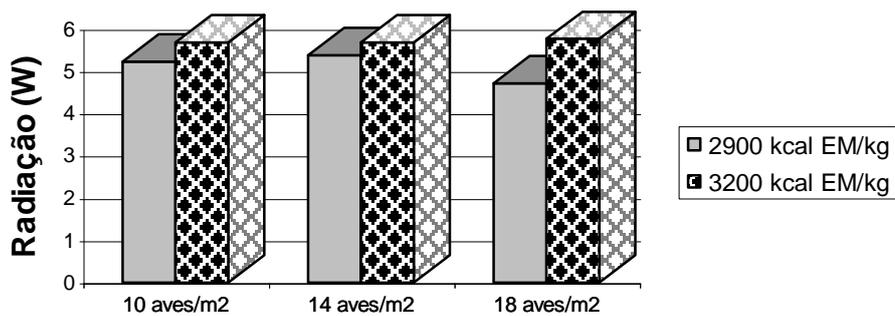


FIG. 5 - Perda de calor através do mecanismo de radiação de frangos de corte criados em diferentes densidades populacionais e alimentados com diferentes níveis de energia (alto - 3.200 kcal EM/kg e baixo - 2.900 kcal EM/kg) em condições de inverno

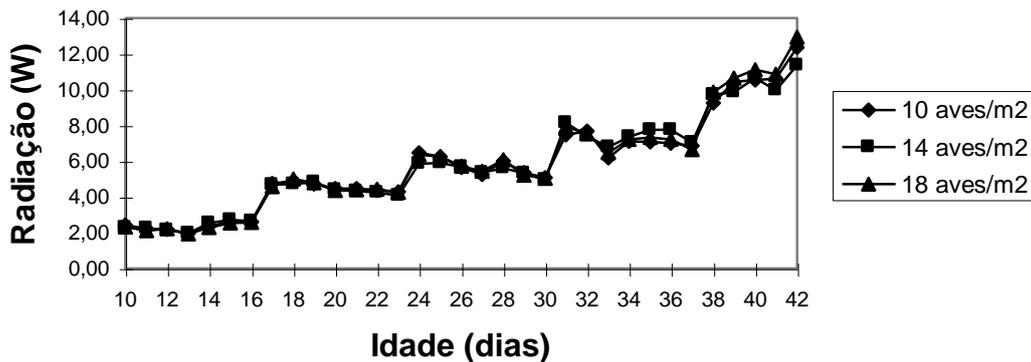


FIG. 6 - Variação da perda de calor por radiação em frangos de corte de diferentes idades, criados em diferentes densidades e alimentados com ração contendo 3.200 kcal EM/kg no inverno.

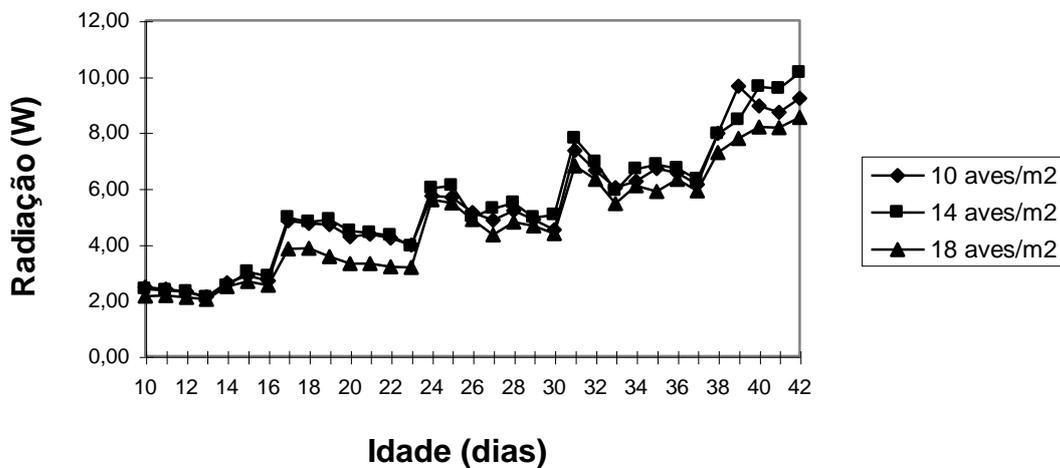


FIG. 7 - Efeito da idade sobre a perda de calor por radiação, em frangos de corte de diferentes idades, criados nas densidades de 10, 14 e 18 frangos/m² e arraçoados com dieta de baixo teor energético (2.900 kcal EM/kg).

As Figs. 8 a 11 mostram as condições ambientais durante o desenvolvimento dos experimentos, nas condições de inverno e verão.

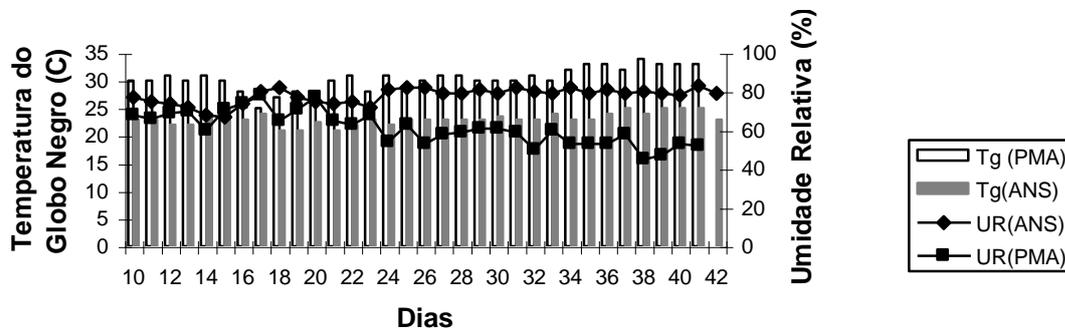


FIG. 8 - Variação da temperatura de globo negro(máxima e mínima) e umidade relativa do ar nos diferentes períodos do dia durante o desenvolvimento dos experimentos nos meses de verão.

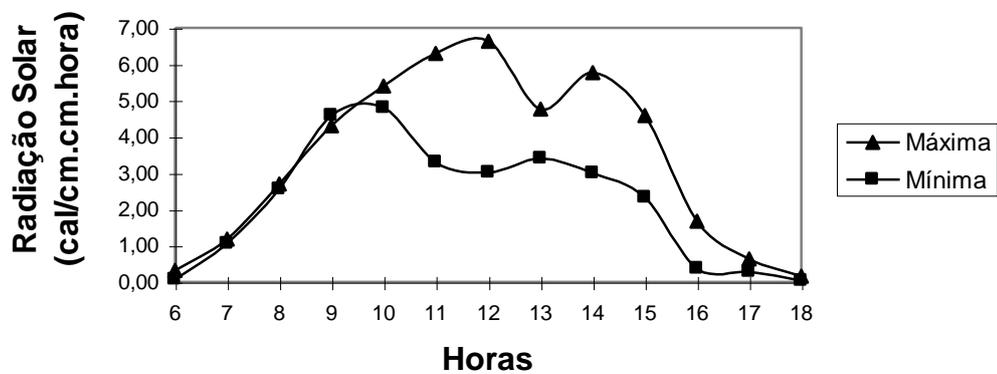


FIG. 9 - Insolação máxima e mínima obtida durante o período de desenvolvimento dos experimentos nos meses de verão.

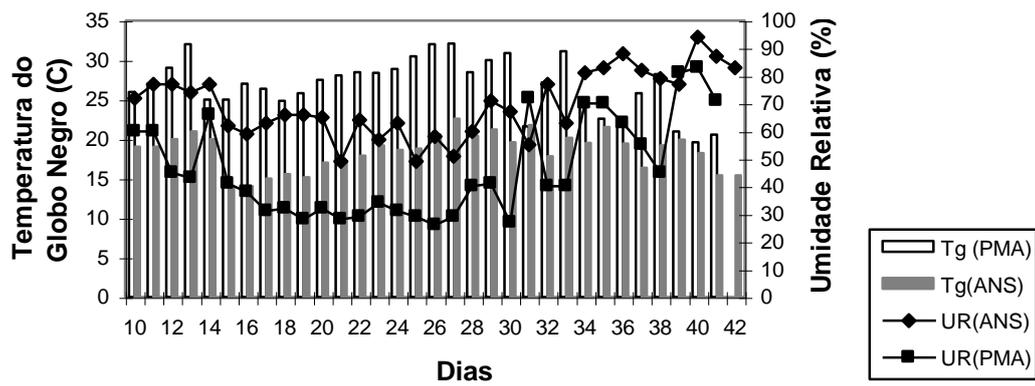


FIG. 10 - Variação da temperatura de globo negro (máxima e mínima) e umidade relativa do ar nos diferentes períodos do dia durante o desenvolvimento dos experimentos nos meses de inverno.

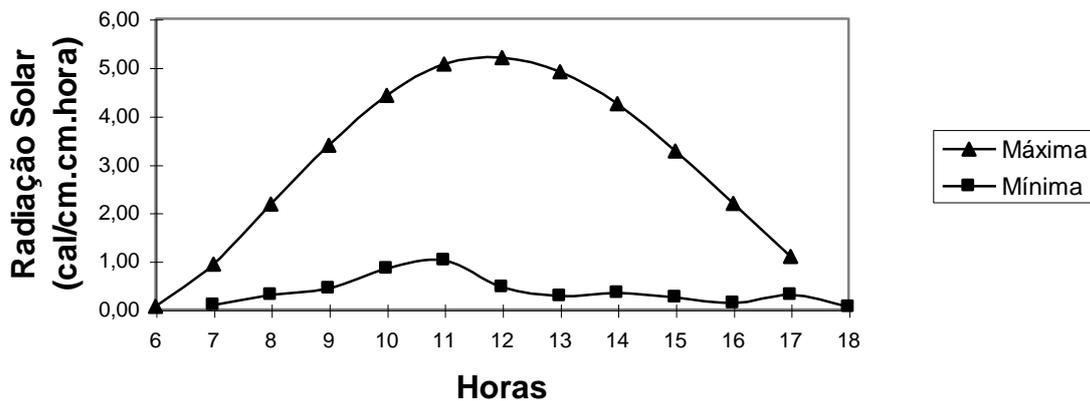


FIG. 11 - Insolação máxima e mínima durante o período de desenvolvimento dos experimentos nos meses de inverno.

Simpósio sobre Ambiência, Sanidade e Qualidade da Carcaça de Frangos de Corte
09 e 10 de Dezembro de 1997 - Concórdia, SC

Tabela 2 - Quadrados médios para a temperatura (superior e inferior) e umidade da cama de frangos de corte criados em diferentes densidades populacionais (10, 14 e 18 frangos/m²) durante o inverno e verão.

C.variação	Inverno			Verão		
	Temperatura		Umidade	Temperatura		Umidade
	Superior	Inferior		Superior	Inferior	
Período(P)	3672,67**	1502,67**	125,94**	3621,13**	2635,74**	33,29ns
Altura Cama(AC)	2,43ns	7,36ns	305,38**	40,34ns	1,38ns	622,42**
Densidade(D)	69,15**	146,46**	497,55**	50,57ns	17,94**	2112,83**
Resíduo	1,71	3,99	41,94	23,51	0,60	31,21
Idade(I)	336,16**	494,45**	1391,08**	67,50**	57,79**	1603,46**
Resíduo(b)	0,79	1,37	10,31	26,83	0,32	16,66

Tabela 3 - Umidade (%) da cama de frangos criados em diferentes densidades durante o verão.

Altura cama (cm)	Densidade(aves/m ²)			Idade(dias)
	10	14	18	
5	21,33	29,57	36,05	31
10	18,62	28,57	28,02	
15	24,11	24,90	31,75	
5	21,68	30,60	37,69	35
10	19,48	27,05	34,44	
15	22,21	25,97	25,50	
5	23,41	28,46	33,36	38
10	19,23	29,05	33,97	
15	22,39	25,48	23,99	
5	25,84	31,72	40,18	42
10	20,40	30,68	36,11	
15	21,64	26,78	21,11	

Tabela 4 - Médias de umidade(%) da cama de frango em função da altura de mesma para frangos criados no inverno.

Altura da cama (cm)	Umidade (%)
5	18,25
10	15,99
15	15,73

Os valores mostram-se estatisticamente diferente apenas para a altura de cama de 5 cm.

Tabela 5 - Médias de umidade da cama de frangos criados em diferentes densidades durante o inverno

Idade (dias)	Densidade (aves/m ²)		
	10	14	18
31	13,74	17,45	18,54
35	18,93	21,74	23,78
38	20,81	22,67	24,23
42	27,38	33,45	23,05

Bibliografia

Campos, S.S. Efeito do nível de energia da dieta, idade e temperatura ambiente sobre a temperatura superficial, carga térmica radiante e temperatura retal de frangos de corte. Dissertação de Mestrado, FCAVJ-Unesp, Jaboticabal, 102p, 1995.

ASPECTOS SANITÁRIOS DE CRIAÇÕES EM ALTAS DENSIDADES

(Controle sanitário básico)

Vilson Antonio Simon

Coopers Brasil Ltda
Campinas - SP

A avicultura brasileira atingiu o "status" de uma das grandes forças mundiais na produção de proteínas de origem animal, devido ao intenso trabalho organizado de todas as forças envolvidas neste processo.

A década de 90 marca o início de um novo processo do ponto de vista de produção de aves, principalmente Frangos de Corte. As empresas integradoras verificam que o custo/benefício do investimento em galpões de criação nos mesmos moldes de 30 anos passados é altamente questionável, ou seja, precisam otimizar a área produtiva disponível. Esta otimização pode ser resumida em aumento de densidade por metro quadrado de área disponível. Hoje já não analisamos mais o índice de eficiência (IEE), mais sim, quantos quilos de carne produzimos por metro quadrado.

Esta maior concentração de aves nos coloca frente a muitos questionamentos :

- Quais as melhorias do ponto de vista de ambiência que precisamos investir?

- Quais as alterações nos processos de manejo até agora adotados que precisamos reanalisar e melhorar ?

- Quais os impactos do ponto de vista sanitário sobre criações de alta densidade ?

Nesta apresentação vamos discutir um pouco quais os impactos sobre o perfil sanitário em frangos de corte criados em altas densidades e como podemos manejá-los.

O controle sanitário é uma das peças fundamentais na manutenção dos parâmetros produtivos na avicultura industrial. Ao analisarmos os dados disponíveis sobre os esforços da seleção genética, verificamos que 90% dos trabalhos realizados se correlacionam com: aumento da eficiência alimentar (redução de conversão alimentar), aumento de ganho de peso, rendimento de carcaça (carnes nobres - peito/coxa). Notadamente seleção de um animal(ave) mais resistente ou rústico é incompatível com a melhoria contínua da produtividade - Relação entre PRODUTIVIDADE e CUSTO POR UNIDADE PRODUZIDA.

Assim sendo, o que recebemos em nossas mãos para manejar é um produto extremamente sensível as inúmeras variáveis presentes no campo, entre elas: clima, qualidade de matéria prima, qualidade de manejo, instalações, ambiência, equipamentos, qualidade de água entre outras.

Com isto exposto, fica evidenciado que a necessidade de implementação de programas de monitoria, controles, acompanhamentos, em suma, GERENCIAMENTO, são fundamentais para a sobrevivência das empresas de produção e sua perenização no mercado.

Para o delineamento de qualquer programa de controle, precisamos elaborar um check-list de todos os fatores que podem estar envolvidos diretamente ou indiretamente sobre o processo. O recomendável nestas situações é a convocação das pessoas responsáveis pelas diferentes áreas da empresa, reunindo-as para sessões de "brainstorming", de onde com toda certeza emergirão as respostas e nossa maneira de agir.

Neste aspecto, a implementação de um Programa de Controle Sanitário para Frangos de Corte, poderia começar com busca de respostas aos seguintes questionamentos:

- Somos uma empresa com ciclo produtivo total : matrizeiro / incubatório / integração

fábrica de rações / abatedouro / ?

- Somos uma empresa que depende 100% d os pintinhos do mercado fornecedor ?

- Somos uma empresa com produção total de nossa ração ou dependemos de terceiros ?

- Somos uma empresa com laboratório de controles (sanitário, matéria prima,etc...) próprio ou dependemos de assistência e serviços terceirizados ? Estamos localizados em região isolada, ou confluímos com várias outras empresas de produção ?

- Investimos em treinamento de equipes de assistência técnica e no contínuo monitoramento dos resultados atingidos pelos nossos integrados ?

etc.....

- Se utilizamos programas de vacinações, baseados em que os implantamos?

- Nossos programas de vacinações seguem uma lógica de diagnóstico e monitoramento de sua eficiência ?

- Quais são os problemas mais comuns que enfrentamos no dia-a-dia de nossa produção de frangos de corte ?

Com o resultado obtido aos questionamentos, tem-se a base para o desenho de um programa que venha atender as necessidades do nível de controle sobre as variáveis que podem influenciar nosso desempenho como um todo.

Os principais desafios sanitários que deveremos manter constantemente monitorados são :

- Desafio para o vírus da Doença de New Castle
- Desafio para o vírus da Bronquite Infecciosa
- Desafio pelo vírus da Doença de Gumboro ou Doença Infecciosa da Bursa (DIB)
- Nível de desafio para Coccidiose Aviária
- Nível das Enterites e como classificamos as mesmas

Seria muito fácil o estabelecimento destes programas e seu acompanhamento, se todos os problemas que enfrentássemos em frangos de corte fossem entidades independentes, como acima citadas. Mas não é bem assim.

Sabemos que na exploração avícola moderna os diferentes fatores interagem entre si, determinando o aparecimento de SÍNDROMES.

Entre as principais Síndromes em Frangos de Corte relacionamos:

- Síndromes Respiratórias
- Síndromes Imunodepressoras
- Síndromes Digestivas
- Síndrome Ascítico
- Síndrome da Mortalidade Súbita (SMS)
- Síndrome da Má-Absorção (SMA)
- Síndrome da Cabeça Inchada - SHS (Pneumovírus)
- Síndrome Celulítica (Celulite em Frangos de Corte)

e assim por diante.

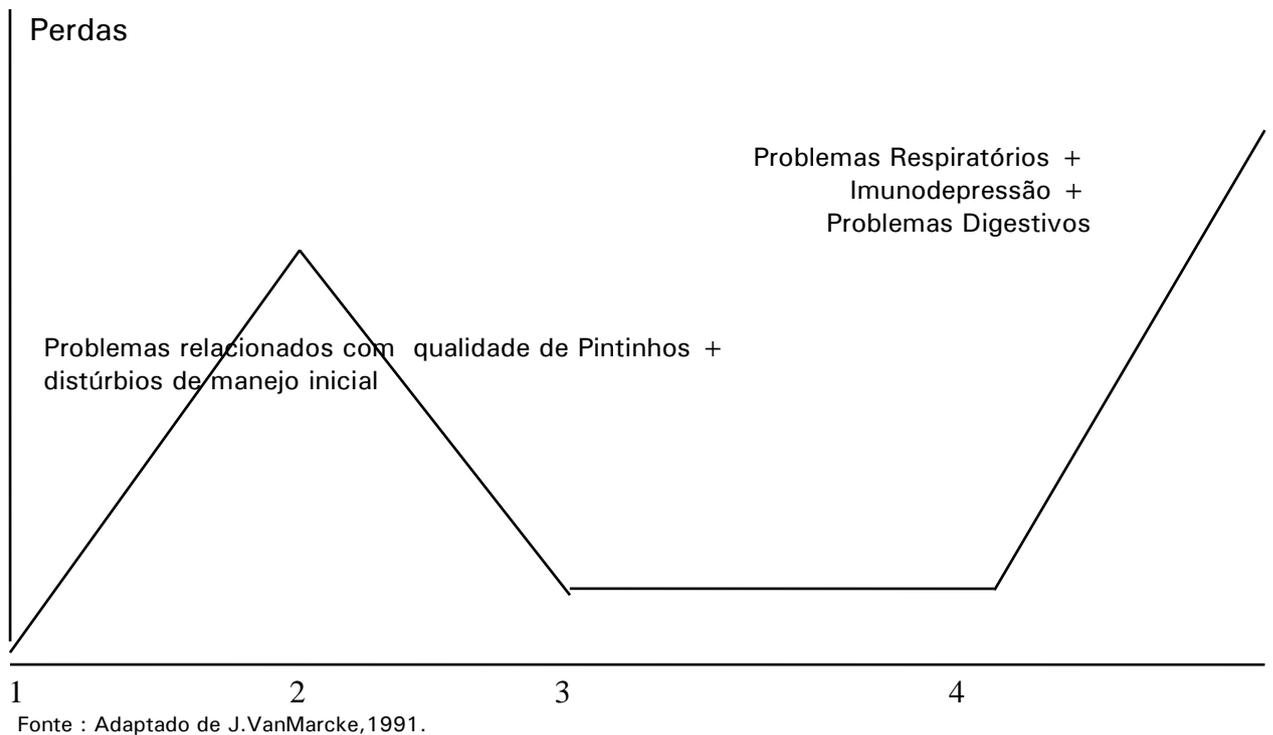
Além disso deveremos considerar alguns fatores sanitários exóticos em nosso meio produtivo, mas presentes em países que exercem algum tipo de parceria com o Brasil, e entre estes quadros, deveríamos manter em pauta :

- Influenza Aviária (???) (quadro Mexicano - 1995/1996)
- Laringotraqueíte (???) (Vizinhos do Mercosul)
- Hepatite por Corpúsculo de Inclusão (Perú, Chile entre outros)

Como regra geral, e para facilitar a elaboração de nossos programas de controle, podemos dividir o ciclo de vida dos frangos de corte e seus problemas de ordem sanitária e produtiva, em duas fases, como observamos no esquema 1, proposto por Johan VanMarcke (1991) e adaptado por V.Simon(1996) :

■ Entre a 1ª. e 3ª. semana : neste período os problemas mais comuns estão relacionados com a qualidade de pintinhos, desordens de manejo inicial (principalmente aquecimento).

■ A partir da 3ª. semana até o abate: é nesta fase de vida que observamos as maiores complicações de ordem respiratória, imunodepressiva e síndromes digestivas (Coccidioses, enterites,etc...), e muitas vezes com reflexo final no rendimento de abate (condenação parcial e ou total).



E então, podemos agora sugerir um CONTROLE SANITÁRIO BÁSICO PARA FRANGOS DE CORTE ??

Sim e Não !!!

Sim, se eu listar do meu ponto todos os fatores que considero fundamentais na implantação de um programa de controle, entre eles :

- ⇒ Monitoria de qualidade de pintinhos de 01 dia de vida : onfalite, aspergilose, refugos, peso médio ao alojamento.
- ⇒ Vacinação em 100% dos pintinhos contra a Doença de Marek + Gumboro.
Análise da qualidade de pele em abatedouro para estabelecer a necessidade de associação de vacina contra Bouda Aviária.
- ⇒ Vacinação no campo contra New Castle e Bronquite Infecciosa.
- ⇒ Eleição de galpões sentinelas para monitoria de rotina para Coccidiose Aviária.
- ⇒ Acompanhamento e tabulação de resultados de abatedouro - aerosaculites, condenação parcial e condenação total.
- ⇒ Análise de qualidade de matérias primas: milho, farelo de soja, farinhas de origem animal (pesquisa e monitoramento de micotoxinas, salmonellas, etc...)

Mas a resposta é Não !!!

Pois, o que estou propondo, é a discussão (brainstorming) de todos os aspectos que possam estar envolvidos na sua elaboração.

Cada empresa deverá analisar e estabelecer um entendimento de todos os fatores que interagem sanitariamente no desempenho produtivo do plantel, facilitando com isto o desenho estratégico de procedimentos de controle, monitoria, acompanhamento, em suma, GERENCIAMENTO dos índices zootécnicos, objetivo maior de nossa interferência sobre o processo produtivo em avicultura.

E qual o impacto da alta densidade sobre o Perfil Sanitário das aves ?

As principais complicações sanitárias observadas neste tipo de criação estão correlacionadas com:

1) Qualidade de carcaça: principalmente Celulite - Tipo 2, bem como, calos de peito e riscos de dorso, detectadas a nível de abate

2) Condições ambientais estressantes: baixa correlação entre equipamentos disponíveis e aves alojadas, principalmente a partir da 4a. semana de idade, falta de ventilação adequada, densidade de cama (altura), disponibilidade de vazão de água, etc..., estes fatores complicam demasiadamente a ordem social. É comum observar canibalismo entre as aves.

3) Problemas de pernas (complicadas por bactérias = Necrose de Cabeça de Femur)

4) Síndromes Respiratória (Síndrome da Cabeça Inchada)

5) Imudepressão (qualidade visual de bolsas de Fabrício = hipotrofia).

Bibliografia

Dufour, L. Correct Use of Serology in Broilers for Disease Monitoring and Diagnosis. DATAGRAM.Select Laboratories, 1993.

Picault, J.P. Doenças Respiratórias e Imunossupressoras em Avicultura.Uma abordagem Européia. Revista Aves&Ovos.1995.

Simon, V. Ocorrência e Controle das Enfermidades Respiratórias em Frangos de Corte. In. IV SCAVET.USP. Agosto 1996.

Vanmarcke, J. Respiratory Problems in Broilers - Prevention and Treatment. Rhone Merieux Avian Seminar. Proceedings. December 1993.

FUNDAMENTOS DE VENTILAÇÃO EM GALPÕES AVÍCOLAS

Diomar Roberto Barro, Médico Veterinário

Avimec Ind. e Com. de Equipamentos Ltda

Embora seja reconhecida a importância do ambiente, nem todos os produtores avícolas de destacam pelo controle ambiental de seu galpão. Em geral, a chave do êxito está em uma ventilação apropriada, a qual possibilita crescimento mais rápido, melhor conversão alimentar, mortalidade inferior, melhora na qualidade dos frangos e maior renda.

Nos termos mais simples, ventilação significa introduzir ar externo para dentro do galpão e extrair o ar interno do mesmo. A ventilação inclui também a remoção do ar de dentro do galpão, que pode ser de suma importância. Ventilação apropriada significa remover a quantidade correta de ar no momento certo e de maneira tal que leve a temperatura, a umidade e outras variações ambientais a valores ótimos para o desenvolvimento das aves.

Não é muito difícil ventilar corretamente um galpão avícola. É necessário, entretanto, compreender os efeitos e princípios em jogo, estar atento ao que ocorre dentro do galpão e fazer os ajustes necessários. Pretende-se aqui trazer informações práticas, começando com uma perspectiva geral dos objetivos da ventilação explicando a relação entre ventilação e os principais fatores no controle ambiental do galpão avícola.

Para possibilitar o manejo do ambiente na avicultura, é necessário conhecer a interação das aves com a temperatura e a umidade, além de conhecer os princípios da ventilação e do resfriamento por evaporação.

Perspectiva geral

Ventilação para condições internas ótimas

Uma ventilação adequada permite criar as condições ambientais que conduzem a uma ótima produtividade. À medida que as aves crescem, será necessário intensificar a ventilação. Porém, através de todo o processo, desde o recebimento das aves até seu abate, estes são os fatores básicos que a ventilação lhe permite controlar:

Temperatura apropriada

A temperatura ideal que proporcione melhor ganho de peso e de conversão alimentar varia em função da idade das aves, desde 32,2 °C para frangos de um dia até 21,1 °C ou menos, na idade de abate. Temperaturas muito elevadas ou muito baixas retardam o crescimento, e podem aumentar a mortalidade. No inverno e no verão, o controle da ventilação permite manter a temperatura dentro da zona de termoneutralidade. Em tempo de calor, a ventilação é a única

maneira prática de evitar que o galpão e os frangos se aqueçam excessivamente. O resfriamento evaporativo reforça então o efeito refrescante da ventilação.

Umidade ótima

A umidade relativa é geralmente correta quando está entre 50% e 70%. No Sudeste dos Estados Unidos, o problema mais comum é o excesso de umidade, especialmente no inverno. O excesso de umidade resulta em uma cama úmida e empastada, traz problemas de amoníaco e pode causar o superaquecimento das aves. A ventilação é a única maneira prática de reduzir uma umidade excessiva. Ar demasiado seco no galpão traz problemas de poeira. A ventilação levará o ar carregado de poeira, porém pode secar ainda mais o galpão.

Ar fresco em quantidade adequada

Ao respirar, as aves extraem oxigênio do ar, por isso é necessário introduzir ar fresco no galpão para repor o oxigênio. A ventilação para esse propósito é necessária em todas as estações, em tempo frio ou quente.

Eliminação de gases nocivos

Além da ventilação introduzir ar fresco no aviário, possibilita extração dos gases provenientes da respiração das aves, principalmente o anidrido carbônico. O problema mais comum em matéria de gás tóxico vem do amoníaco desprendido de uma cama muito úmida, que causa problemas de saúde e afeta a produção. Uma ventilação suficiente previne a acúmulo de amoníaco ao controlar a umidade relativa. Por sorte, a condução de ar fresco e a remoção de gases tóxicos resultam da mesma ventilação empreendida para controlar a temperatura e a umidade.

Ambiente uniforme no interior do aviário

Um ambiente interno saudável deve estender-se uniformemente por todo o galpão. Porções de ar paralisado, correntes de ar, lugares frios ou quentes podem causar mortalidade e reduzir o rendimento das aves.

No domínio do controle ambiental avícola é necessário considerar devidamente todos os fatores envolvidos, uma vez que os mesmos são interdependentes.

COMO INTERAGEM AS AVES, A TEMPERATURA E A UMIDADE

O controle do conforto das aves durante o seu crescimento

As aves muito jovens têm pouca capacidade de regular sua temperatura interna e necessitam de calor, uma temperatura de mais ou menos 32,2°C. À medida que elas crescem sua "zona de conforto" se amplia um pouco e abaixa, de modo que em tempo de abate preferem estar entre 18,3 e 21,1°C. Isto

implica que, no princípio do período de crescimento, a principal preocupação deve ser que tenham bastante calor; quando estão crescidos, o excesso de calor pode ocorrer ainda no inverno é uma eventualidade menos freqüente. O sistema de ventilação servirá para manter a temperatura dentro do galpão na zona de conforto das aves, deve-se compreender como interagem as aves, a temperatura e a umidade.

As aves convertem o alimento e a água em energia que utilizam para o funcionamento de seus órgãos e músculos, para manterem-se aquecidas, para crescerem e aumentarem de peso. Porém, como não são máquinas com 100% de rendimento, também geram um apreciável excesso de calor e de umidade (na matéria fecal e na respiração).

A produção de calor corporal aumenta com o crescimento das aves. Por exemplo, num galpão de 120 por 12 m, com 20.000 aves de sete semanas de idade, a produção de calor equivale-se a dois ou três aquecedores de ventilação forçada (insufladores de ar quente) funcionando continuamente.

A umidade produzida pelas aves também varia com idade. Um lote de 20.000 aves de 1,8 kg pode produzir 3785 litros de água por dia, conforme a temperatura. Igualmente, a temperatura e a umidade dentro do galpão tendem a aumentar durante o período de crescimento.

A ventilação é necessária tanto no inverno quanto no verão

Em períodos de elevada temperatura, a ventilação é indispensável para extrair do galpão o excesso de calor produzido pelas aves. Já em épocas frias, é freqüente a necessidade de adicionar calor, porém as aves serão cada vez mais capazes de manterem-se aquecidas a si mesmas e ao galpão com o seu próprio calor. Entretanto, qualquer que seja a estação, as aves são afetadas caso não consigam se livrar do excesso de calor devido à elevação demasiada da temperatura ou da umidade do galpão. Embora a temperatura e a umidade interajam afetando o conforto das aves, para facilidade os dois fatores serão considerados separadamente nos próximos parágrafos, e por último será examinado o efeito da interação.

As aves são resfriadas principalmente pelo ar, o qual retira o calor corporal e o transfere para o meio próximo. As aves carecem do sistema de transpiração, um mecanismo eficaz de resfriamento evaporativo presente nos humanos. Portanto, mesmo que consigam algum resfriamento por evaporação na respiração e no ofego, dependem sobretudo da transferência direta do calor do corpo ao ar para seu resfriamento. Quando são vistas levantando as asas, não é porque estão tentando voar, mas sim porque estão com calor e tratam de expor ao ar a maior parte possível de seu corpo.

As aves completamente emplumadas só ficam confortáveis na presença de uma diferença substancial de temperatura entre o seu corpo (que está normalmente a mais de 37,8°C) e o ar que circula. À medida que a temperatura do galpão sobe, os mecanismos de dissipação do calor das aves perdem eficácia. Nessas circunstâncias ocorre elevação da temperatura corporal e redução da atividade e da ingestão de alimento, o que retarda o crescimento e, caso a situação não se reverta, causa mortalidade.

Em geral, enquanto as aves dissipam calor é possível evitar que a temperatura do galpão eleve-se demasiadamente, extraindo o ar quente e substituindo-o com ar externo mais fresco. Uma vez que a maior parte do calor corporal é transferido para o ar, quanto mais se renova o ar, mais se refrescam as aves. Na maioria dos galpões, enquanto a temperatura externa é inferior a 29,4°C, o sistema de ventilação é capaz de extrair por si somente uma quantidade suficiente de ar quente para manter a temperatura interna na zona de conforto das aves.

Além de renovar simplesmente o ar do galpão, pode-se ajudar as aves a suportarem o calor submetendo-as ao vento, com o que experimentarão uma sensação térmica mais baixa. Por exemplo, em um galpão a 32,2°C e com umidade média, um fluxo de ar circulando a 20 metros por minuto as faz sentir a 32,2°C. Porém, a circulação forçada de ar a 60 metros por minuto dará a elas a sensação de estar a 26,7°C; se o fluxo de ar estiver a 120 metros por minuto (2 m/s), terão a sensação de estar a 23,9°C.

O resfriamento evaporativo ajuda as aves a suportarem o calor sempre que não há umidade excessiva

É necessário um galpão com ventilação por túnel para conseguir uma velocidade de 120 metros por minuto. Porém, mesmo sem ela, a ventilação forçada é uma ajuda real.

Em tempo muito quente, a evaporação da água exposta ao ar pode ser usada para se conseguir um resfriamento adicional. Para isso, pode-se pulverizar água em gotinhas muito pequenas, ou passar a corrente de ar através de um tecido molhado. Porém, esses métodos somente são bem sucedidos quando a umidade do ambiente está baixa e a velocidade do ar suficiente em todo o galpão.

As noites frescas ajudam as aves a suportarem temperaturas altas durante o dia

As aves suportam temperaturas diurnas mais altas se as temperaturas noturnas forem pelo menos 13,9°C mais baixas. Durante a noite seus corpos liberam o excesso de calor acumulado durante o dia, de modo que possam começar o dia seguinte refrescadas. Se a temperatura não baixar o suficiente durante a noite, no dia seguinte amanhecem com excesso de calor corporal. Isso afeta seu desenvolvimento e pode causar mortalidade. Nessa situação o uso de ventiladores também durante a noite pode ser útil para ajudar a reduzir a "temperatura efetiva".

As aves também eliminam algum excesso de calor ao respirar

As aves também eliminam algum excesso de calor corporal através da respiração. É por isso que ficam ofegantes quando sentem calor. É como um sistema de refrigeração de reserva, que entra em ação ao redor de 29,4°C. O que ocorre é que as aves aumentam o resfriamento evaporativo ao passar o ar

sobre os tecidos úmidos de seus pulmões e canais respiratórios. Porém, só dá resultados se o ar estiver relativamente seco. Se já contém toda a umidade possível, não evaporará mais umidade do corpo e não haverá resfriamento.

Se a umidade relativa ultrapassar os 80% as aves podem ficar com calor mesmo com temperaturas não muito superiores a 26,7°C.

A umidade elevada dificulta a eliminação do calor

Como regra básica, se a temperatura do galpão exceder a 26,7°C e a soma da temperatura e da umidade relativa for de 106,7 ou mais, as aves começarão a ter dificuldade em perder calor corporal. Significa que a soma da temperatura e da umidade relativa constitui um índice de calor.

Assim, por exemplo, as aves estarão bem com uma temperatura de 29,4°C e uma umidade relativa de 70%, já que a soma de ambas é 99,4. Porém, se a umidade subir a 80%, a soma será de 109,4 e começará a ser observada a piora da conversão alimentar, devido ao calor. A 90% de umidade relativa (29,4°C + 90 = 119,4) os frangos podem começar a morrer de calor.

Como opera a ventilação

A ventilação consiste na introdução de ar externo dentro do galpão e extração de ar interno do mesmo. É um processo contínuo e essencial em todos os dias, durante o ano inteiro, na produção avícola. Além disso, as necessidades de ventilação no inverno e no verão são muito diferentes. Nesta seção, veremos como muda de tempo frio para tempo quente e como diferentes sistemas de ventilação enfrentam essas necessidades mutantes.

A quantidade de ar que o sistema de ventilação deve introduzir ou extrair do galpão depende das condições meteorológicas e da idade das aves. Significa que é necessário o intercâmbio de ar apropriado, que pode consistir na renovação completa do ar do galpão a cada minuto, ou a cada cinco ou dez minutos. A capacidade de ventilação em metros cúbicos por minuto determina o ritmo máximo de renovação possível. Um sistema baseado em ventiladores deve ser ciclicamente ativado e desativado a fim de se obter o ritmo de renovação desejado.

Como satisfazer as necessidades das aves: ventilação, ritmo de renovação, passagem de ar

Também a modalidade da passagem de ar pelo galpão pode ser de suma importância quanto a número, tamanho e posição das entradas, o modo de misturar o ar externo com o ar interno, o percurso do ar e sua extração. Trata-se de aspectos que devem ser ajustados às necessidades das aves. Dois sistemas de ventilação de mesmo ritmo de renovação afetarão as aves de diferentes maneiras se os fluxos de ar que criarem forem muito diferentes.

A extração do excesso de calor exige renovação de grande volume e passagem de ar entre as aves

Extraír do galpão o calor solar e o calor gerado pelas aves é em geral a primeira prioridade em dias quentes, uma vez que as aves estão completamente emplumadas. Isso requer em geral a maior quantidade de ventilação possível. Pode ser necessária a renovação total do ar do galpão a cada minuto. Em pleno verão, seu sistema poderá estar em funcionamento 100% do dia e ainda boa parte da noite. Nessas condições, é importante o percurso; obter-se-á os melhores resultados colocando-se as entradas ao nível das aves e forçando um fluxo rápido de ar relativamente fresco entre elas, para facilitar a extração direta de seu calor corporal.

Ventilação natural: ao abrir as cortinas se permite a passagem de vento externo através do galpão

Cabe perguntar de início, sobre os sistemas de ventilação: Como introduzem ar dentro do aviário? A ventilação natural consiste em abrir simplesmente as janelas para deixar as brisas externas passarem através do galpão. Isso se faz, em geral, por meio das cortinas, de modo que se designa também como "ventilação por manejo de cortinas". A ventilação por cortinas pode ser muito eficaz, porém depende muito do vento. A ventilação forçada utiliza ventiladores para introduzir ar no galpão. Os ventiladores podem empurrar o ar para dentro ou funcionar como exaustores que aspiram ar externo por outra abertura de admissão. A ventilação forçada é menos afetada pelos ventos, de modo que oferece maior controle das condições internas. Além disso, pode-se usar ventiladores internos para movimentar o ar, tanto com ventilação natural quanto com ventilação forçada. Estes ventiladores ajudam a misturar o ar externo com o ar interno para produzir as condições desejadas, porém não introduzem ar externo no galpão.

Os ventiladores que empurram ar externo para dentro do galpão são chamados de pressão positiva. Os exaustores, que provocam aspiração do ar por outras aberturas, criam uma pressão negativa no galpão.

SISTEMA 1 - VENTILAÇÃO POR MANEJO DE CORTINAS

Ventilação por cortinas: Ideal quando a temperatura externa está próxima daquela que os frangos necessitam

Abrindo as cortinas do galpão pode-se passar rapidamente por ela um grande volume de ar externo. Com isso as condições internas tendem a logo igualar-se com as condições externas. Portanto, a ventilação por cortinas é ideal quando a temperatura externa é mais ou menos a que as aves necessitam. Porém, o ritmo de renovação de ar depende muito do vento presente. Em dias quentes, com pouco vento, são imprescindíveis ventiladores de circulação para conseguir algum refrescamento dos frangos através do ar que passa por eles. Agregar nebulizadores a estes ventiladores equivale a um nível adicional de refrescamento.

A melhor ocasião para usar as cortinas é quando a temperatura externa é igual ou ligeiramente inferior (não mais que 5,5° ou 8,3°C) daquela que se deseja no galpão.

Quanto maiores as aves, maior a diferença de temperatura que podem compensar, devido ao maior calor gerado. Quando a temperatura externa é inferior daquela que se deseja no galpão, abre-se e fecha-se ciclicamente só um pouco a cortina, para manter a temperatura sem deixar de renovar o ar.

Em tempo frio, o ar frio desce ao nível do chão, o que esfria os frangos e condensa a umidade

O problema com a ventilação por cortinas em tempo frio é que o ar admitido por pequenas aberturas entra com pouca velocidade e em seguida desce a nível do chão, onde esfria os frangos e causa condensação, conseqüentemente, molhando a cama. Ao mesmo tempo sai o ar mais quente que se encontra mais acima, o que acarreta maiores diferenças de temperatura no local, e como conseqüência, maior tensão nas aves.

Quando se utiliza a ventilação por cortinas em tempo fresco, é imprescindível o controle com temporizadores de curto período e com termostatos de segurança para as aves. Serão úteis os ventiladores de circulação para acelerar a mistura do ar frio que entra com o ar interno morno. Contudo, mesmo em tempo moderado, as flutuações normais de temperatura e vento, de dia e à noite, podem requerer ajustes freqüentes na cortina. Por isso dizemos que a ventilação por cortina requer supervisão permanente.

SISTEMA 2 - PRESSÃO NEGATIVA COM EXAUSTORES E ABERTURAS DE ADMISSÃO LATERAIS

Os sistemas de pressão negativa com entrada e saída laterais são projetados para ventilação mínima, ou seja, a admissão da quantidade precisa de ar fresco necessário para tirar o excesso de umidade e de amoníaco em tempo frio e/ou durante a primeira semana de um ciclo de crescimento, quando as aves são ainda muito pequenas. Com exaustores em uma parede lateral e aberturas horizontais de admissão na parte superior de ambas as paredes laterais, consegue-se o fluxo que permite uma ventilação adequada sem deixar de conservar calor nem causar problemas de umidade.

A chave do êxito está em criar um vácuo parcial apropriado, de maneira que o ar entre em velocidade suficiente e igual por todas as aberturas de admissão. Se essas aberturas estão distribuídas uniformemente em toda a extensão do galpão, o fluxo através do mesmo será uniforme. A pressão estática requerida é geralmente de 1,27 a 2,54mm/ca.

Consegue-se a pressão estática apropriada quando o número correto dos exaustores está equilibrado com o número, tamanho e projeto apropriado das aberturas de admissão. Os galpões que usam esse sistema podem ter de dois a seis exaustores de 1 m. Esse número é determinado pelo ritmo de renovação do ar (em metros cúbicos por segundo) que é necessário para tirar a umidade e o amoníaco com a mínima queda de temperatura no galpão. É possível que seja

necessário aquecimento adicional. O ajuste das aberturas de admissão de ar pode ser crítico. Se forem muito pequenas (para o número de exaustores em uso) a pressão estática subirá excessivamente; como conseqüência, os ventiladores fornecerão menos ar que sua capacidade nominal e o ritmo de renovação será insuficiente.

O ajuste da área de admissão é crítico para um bom funcionamento

Se as aberturas de entrada forem muito grandes para o número de exaustores em uso, a pressão estática cairá e em conseqüência o ar externo tenderá a entrar somente pelas aberturas mais próximas dos exaustores, criando um fluxo de ar não uniforme e condições desfavoráveis para as aves.

O fluxo de ar através do galpão é determinado pelo tipo de abertura de admissão usada

As aberturas de admissão podem se aberturas na cortina, ranhuras nas placas em cima da cortina ou aberturas ajustáveis. A idéia é introduzir o ar frio (que é mais denso) a uma velocidade que lhe permita manter-se numa altura o tempo suficiente para misturar-se com o ar interno mais quente, antes de descer ao chão. Quanto mais frio o ar externo, mais importante é a velocidade de entrada. As aberturas ajustáveis facilitam a solução para dirigir o ar que entra para o forro.

As aberturas na cortina tendem a dirigir o ar para o chão. Se forem usadas, é muito importante fazê-las uniformes ao redor do galpão e muito pequenas. Além disso, pode ser necessário algum circulador para contribuir para a mistura na altura.

A ventilação por pressão negativa com exaustores laterais funciona muito bem, porém exige atenção constante para manter a pressão estática e a distribuição de ar corretas. Por sua vez, isso requer a combinação apropriada de aberturas de admissão e ventiladores, bem como um galpão bem fechado. Quando se liga os exaustores, o ar penetra por todas as aberturas existentes, não só por aquelas planejadas. Se existem frestas, o sistema funcionará pobremente ou não funcionará. Um galpão bem fechado é de importância primordial.

SISTEMA 3 - VENTILAÇÃO TÚNEL

Os galpões previstos para a ventilação tipo túnel operam segundo o método da pressão negativa para produzir a máxima ventilação requerida em tempo quente, com renovação completa do ar do galpão uma vez por minuto. Exaustores de grande tamanho em um extremo do galpão aspiram ar externo através de grandes janelas de admissão situadas no lado oposto e o movem a alta velocidade como num túnel de vento no comprimento de todo o galpão.

A sensação térmica resultante reduz a temperatura percebida pelas aves em até 8,3°C. A velocidade de circulação necessária para renovação total em um minuto depende da extensão do galpão. Se mede 120 metros de comprimento, o

ar deve circular a 120 metros por minuto, e os galpões são efetivamente projetados para ventiladores de capacidade suficiente para fornecer esta velocidade. Em um galpão típico para criação de frangos de corte, se o ar externo está a 32,2°C, uma velocidade de 120 metros por minuto provocam nas aves uma sensação térmica de 24°C, supondo uma densidade de população normal e aves totalmente emplumadas. Dada uma temperatura externa, deverá ser ligado um número determinado de exaustores para produzir a velocidade de circulação e o ritmo de renovação requeridos para manter as aves em sua zona de conforto, segundo sua idade e tamanho.

A sensação térmica reduz menos à medida que a temperatura do ar sobe, especialmente acima de 32,2°C, quando o ar começa a esquentar as aves em vez de refrescá-las. Os galpões com ventilação tipo túnel devem recorrer ao resfriamento evaporativo em tempo muito quente.

Os galpões ventilados no modo túnel precisam de uma seção de admissão adequada

No uso desses galpões procura-se estabelecer a pressão estática mais baixa possível, com o objetivo de manter a quantidade de ar desejado. A área das aberturas de admissão é de importância primordial. Uma boa regra é Ter 15 metros quadrados de área de admissão para cada exaustor de 1,2 metros se não recorrer ao resfriamento evaporativo. Alguns painéis para resfriamento requereriam uma área adicional. Em todo caso, estes galpões devem ser bem fechados.

A decisão de ativar o modo túnel depende da temperatura externa

Com a ativação do túnel de ventilação introduz repentinamente um grande volume de ar externo no galpão, esse tipo não deve ser ativado quando a temperatura externa é muito mais baixa que a interna. Para uma transição suave, a experiência demonstra que se pode ativar o tipo túnel quando a temperatura externa está entre 23,3° e 26,7°C, segundo o tamanho das aves e as condições existentes no galpão.

A ventilação no tipo túnel está convertendo-se na favorita para o clima quente do Sudeste, especialmente para a criação de aves de maior tamanho, de 2,27 a 3,17 kg de peso. Estão aparecendo galpões de construção recente, totalmente fechados, com admissão e escape lateral, ventilação de tipo túnel e sem cortinas.

Bibliografia

- Manual da Hired – Haud
- Palestras do Prof. James Donald da Universidade do Alabama - EUA

DESEMPENHO E VIABILIDADE ECONÔMICA DA CRIAÇÃO DE FRANGOS DE CORTE EM ALTA DENSIDADE

João Batista Luchesi*

*Multimix Produtos e Serviços Agropecuarios Ltda
Campinas – SP.

A crescente pressão para a redução dos custos de criação de frangos de corte tem levado algumas empresas a aumentarem a taxa de lotação, como forma de reduzir os custos de mão-de-obra e investimentos na construção de novos aviários. Porém, na maioria das vezes, isto tem sido feito sem a devida adaptação de equipamentos, de ambiente e de nutrição à nova situação.

É comum encontrarmos empresas que passaram de um alojamento de 10 aves por m² para 18 até 20 aves. Considerando-se que as aves atinjam o mesmo peso a uma determinada idade, por exemplo: 44 dias – 2.250 g, verificamos que teremos cerca de 22,50 e 40,50 kg de carne por m² para 10 aves m² e 18 aves, respectivamente, ou seja, um incremento de 80% na quantidade de carne produzida por m² do aviário. Isso aumenta em cerca de 80% o volume das excretas, tornando a “cama” mais úmida e emplastrada, o que dificulta o seu manejo, eleva os níveis amônia, e conseqüentemente propicia o surgimento de problemas respiratórios. Pela própria natureza das aves, que ciscam a “cama”, o desafio ao trato gastrointestinal estará exarcebado, com grandes probabilidades do aparecimento de enterites específicas ou inespecíficas. Assim, o nutricionista deverá estar atento aos programas de promotores de crescimento e agentes anticoccidianos, visando enfrentar esta nova situação.

Do ponto de vista nutricional deve-se estar atento à densidade de nutrientes e energia da dieta, uma vez que a maior lotação aumenta a competitividade para acessar os comedouros, o que implica em maior desgaste energético.

Os resultados de pesquisas, em geral, têm indicado que na criação em alta densidade ocorre piora nos resultados zootécnicos, mas com aumento na lucratividade. Entretanto, a viabilidade desse sistema de criação requer revisão dos níveis nutricionais e energéticos das dietas, dos níveis e tipos de aditivos utilizados, da forma física da ração e do programa de alimentação, bem como nos equipamentos e no ambiente do galpão.

BARREIRAS SANITÁRIAS NA COMERCIALIZAÇÃO DE CARNES DE AVES

Luiz Carlos Oliveira

Méd. Vet., DIPOA - Brasília, DF.

Introdução

As Barreiras Sanitárias, juntamente com os fatores econômicos afetam atualmente todo o setor de produtos de base, determinando elevado custo e conseqüentemente limitações na competitividade, constituindo nas principais dificuldades na expansão do comércio internacional de produtos avícolas brasileiros.

Atualmente os problemas sanitários assumem papel preponderante como mecanismo de restrição ao comércio, tanto no âmbito internacional como nacional, face a regulação das questões tarifárias pela OMC e das próprias exigências do mercado nacional, não só pelas preocupações ligadas à saúde pública mas como conseqüência da própria evolução dos padrões de qualidade, que passam a ditar as preferências.

O estudo e a compreensão desses fatores limitantes facilita o estabelecimento de ações conjuntas que visem minimizá-las.

Características

As barreiras sanitárias podem ser caracterizadas como as que afetam a Saúde Animal, no caso específico as doenças das aves, e as que afetam a saúde pública, através de Toxinfecções Alimentares e Presença de Substâncias Nocivas - Resíduos Químicos e Biológicos nos produtos destinados ao consumo humano.

Assim, constitui-se como principal barreira sanitária relacionada à sanidade avícola a existência no país da Doença de Newcastle, e do não estabelecimento de zona livre, em que pese praticamente não existe na avicultura industrial dos principais Estados produtores.

Quanto às de interesse à saúde pública, as Enfermidades Transmitidas por Alimentos podem ser subdivididas em:

a) Infecções Alimentares, sendo a principal as causadas por salmonela (*S. enteritidis* e *S. thiphimurium*), seguidas das transmitidas por *Campylobacter*, *Listeria*, *E. coli*, *Yersinia*, dentre outras.

Embora de distribuição mundial e de impossível erradicação, na atualidade, as salmonelas consistem na principal barreira, principalmente pelas legislações da maioria dos países que se baseiam na presença/ausência no produto como critério de rejeição.

a) Intoxicações Alimentares, ocasionadas principalmente por toxinas bacterianas (enteroxinas) como as ocasionadas por *Staphylococcus aureus*, *Clostridium*, *E. coli* enterotoxígenas e outras, como as micotoxicoses.

b) Presença de Resíduos químicos e biológicos, como de antibióticos e quimioterápicos, coccidiostáticos e de pesticidas.

Até que sejam estabelecidos programas de controle/erradicação e/ou estabelecimento de zonas livres, os problemas ligados à sanidade avícola ainda não constituem limitações ao comércio nacional, somente ao internacional. Todavia as questões ligadas à saúde pública são atualmente preocupações de igual nível em qualquer que seja o âmbito do comércio.

Fatores reguladores do comércio internacional

1 - Países Signatários da Organização Mundial do Comércio - OMC

Após a rodada do Uruguai do GATT (Acordo Geral de Tarifas ao Comércio) e a criação da OMC, as questões relacionadas com as barreiras técnicas ficam regidas pelo Acordo Sanitário e Fitossanitário. As questões de saúde animal são baseadas na Oficina Internacional de Epizootias - OIE. Já o Codex Alimentarius é a base para questões relacionadas à saúde pública e aos padrões tecnológicos e higiênico-sanitários da produção, inspeção e certificação de alimentos.

2 - Os países não signatários da Organização Mundial do Comércio regulam o comércio internacional através de requisitos e regulamentos específicos, negociados bilateralmente ou através de acordo bilaterais ou multilaterais e por blocos econômicos (União Européia, NAFTA e Mercosul).

Principais barreiras internacionais

União européia

Quanto à sanidade avícola - Doença de Newcastle (somente Estados RS, SC, PR, SP e MS).

Quanto à saúde pública - Salmonelas, *Campylobacter*, Resíduos Químicos e Biológicos.

Quanto aos Critérios Tecnológicos, e de Certificação

- Diretivas CEE - 71/118; 92/116 e 94/984.

Quanto ao critério de Habilitação

- Aplicação do Sistema APPCC (HACCP);
- Visita em cada estabelecimento (até 1996);
- Indicação do Ministério da Agricultura da Lista com visita por amostragem;

O descredenciamento de 1 (um) estabelecimento acarreta em retirar todo o país do mercado da União Européia.

América do norte

- Requer equivalência de legislação e sistema de inspeção (não reconheceu ainda o Brasil);
- Aceita o critério de regionalização (OMC) após 1996;
- Aprova primeiramente o Sistema de Defesa Sanitária para posterior habilitação de estabelecimentos;
- Aplicação do Sistema APPCC (HACCP).

Conclusão

Afora as questões de custos, tarifárias e subsídios, as barreiras técnicas constituem atualmente os principais obstáculos e mecanismos reguladores no comércio internacional, tendo sempre o maior rigor, e já se caracterizando como fator limitante no comércio nacional.

Os organismos de saúde pública têm desenvolvido maiores esforços para a inocuidade dos alimentos, aprimorando os mecanismos de controle. Assim, exige-se do setor produtivo e de transformação industrial constante aprimoramento dos controles sanitários e melhor qualidade na obtenção do alimento.

Mas para efetivo domínio e controle são necessários esforços conjuntos dos setores privados de produção, comercialização, públicos de controle e finalmente dos consumidores no esclarecimento dos riscos e perigos específicos, e conseqüente preparo e conservação adequada dos alimentos.

O CONTROLE DAS SALMONELAS NA CADEIA PRODUTIVA AVÍCOLA

Nascimento, W. P.; Salle, C. T. P.; Moraes, H. L. S.; Silva, A. B.; Santos, L. R.;
Cardoso, M. O.; Pontes, A. P. e Oliveira, S. D.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)
Faculdade de Veterinária
Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária (CDPA)
Av. Bento Gonçalves, 8824 - Porto Alegre - RS - CEP.: 91.540-000
Fones: (051) 316-6130 e 316-6138 Fax: (051) 319-1062

1. Introdução

Salmonelose é um termo que designa um grupo de doenças agudas ou crônicas, causadas por um ou mais membros do gênero *Salmonella*, o qual pertence à família *Enterobacteriaceae*. Este gênero é composto por mais de 2300 sorovares, diferenciados com base em reações bioquímicas e sorológicas, sendo uma parte destes passível de ser isolada a partir de aves, as quais constituem o maior reservatório individual de salmonelas existente na natureza, sendo estas um dos veículos mais importantes dentre os causadores de toxinfecções no homem.

As salmoneloses das aves são clinicamente classificadas, pela maioria dos autores, em três doenças: a Pulorose, causada pela *Salmonella enterica* sub-espécie *enterica* sorovar Pullorum (doravante aqui referida como *S. Pullorum*); o Tifo Aviário, causado pela *Salmonella enterica* sub-espécie *enterica* sorovar Gallinarum (ou *S. Gallinarum*); e as infecções paratífóides ou paratifo aviário, determinadas pelos sorovares não-adaptados às aves, os quais, até por não possuírem preferência por um hospedeiro em especial, muito freqüentemente podem causar toxinfecções alimentares em humanos.

Doenças como a pulorose e o tifo aviário quase impossibilitaram a produção avícola em larga escala, antes do desenvolvimento de testes práticos e programas de erradicação em reprodutoras, enquanto que, nos dias de hoje, é a ocorrência de salmonelas paratíficas, em especial a *Salmonella enterica* sub-espécie *enterica* sorovar Enteritidis (*S. Enteritidis*) e a *Salmonella enterica* sub-espécie *enterica* sorovar Typhimurium (*S. Typhimurium*), que ameaça a aceitação pública dos produtos de origem avícola, por medo das já mencionadas toxinfecções alimentares.

Diante destes fatos, tornou-se grande a busca, por parte da indústria avícola, de métodos de prevenção e controle que permitam a produção de lotes e alimentos livres destes patógenos, quer por seus prejuízos econômicos diretos (no caso das perdas por pulorose e tifo) como pelos indiretos (má imagem do produto avícola junto ao consumidor).

2. Pulorose

Também conhecida como Diarréia Branca Bacilar, trata-se de uma doença infecciosa, transmitida via ovo, atingindo especialmente pintinhos e peruzinhos, freqüentemente caracterizada por diarréia esbranquiçada e alta mortalidade em aves jovens, com adultos portadores assintomáticos.

Transmite-se principalmente por via transovariana, embora seja admitida a penetração pela casca do ovo (extra-genital), mas em menor número. Outra forma bastante importante é a horizontal, onde pintos infectados nascem e infectam outros sãos no nascedouro (via sistemas digestivo e respiratório), com extensa disseminação. Com isto, aves infectadas, aparentemente sãs, são vendidas às vezes a vários compradores, espalhando o problema para outras regiões ou países. Pode ainda ocorrer por por canibalismo de aves infectadas, por procedimentos como a debicagem, ou por ingestão de ovos contaminados.

É possível controlar-se a ocorrência desta doença, tendo-se lotes livres de *S. Pullorum*, desde que se atenha a procedimentos bem definidos. Resumindo, temos que ter lotes reprodutores livres, com nascedouros e criação desta progênie sob circunstâncias que precludam o direto ou indireto contato destas com aves infectadas. Só pode-se admitir o uso de ovos provenientes de lotes livres. Caso isto não seja possível, deve-se incubá-los separadamente. A existência de lotes infectados compromete todo o "status" de todas as aves daquela granja. Aves de reposição só se forem oriundas de lotes livres, ou que fiquem em quarentena até serem testadas e declaradas livres. A reutilização da cama, desde que livre de *Salmonelas*, por estar úmida e conter mais amônia, aumenta enormemente o pH do meio, a ponto de ser salmonelicida. O tempo de sobrevivência desta bactéria em cama usada foi de 3 semanas, enquanto na cama nova foi de 11 semanas.

Em certas circunstâncias (pequenos lotes, pequenos criadores), o procedimento deverá ser o do sacrifício do lote, com limpeza e desinfecção absolutas, troca de cama, e reestocagem com aves comprovadamente livres. A vacinação normalmente não é recomendada, até porque amostras vivas e mortas de *S. Pullorum* são más indutoras de proteção, preferindo-se os programas de erradicação, com sorologia. A doença ainda causa perdas catastróficas em locais onde não hajam medidas para controlá-la, como ocorre em países em desenvolvimento tentando estabelecer sua produção avícola.

3. Tifo Aviário

Doença septicêmica em aves domésticas, de curso agudo ou crônico, com mortalidade moderada ou muito alta, dependendo grandemente da virulência do organismo causador, a *S. Gallinarum*. Normalmente é uma doença de aves adultas, mas que tem sido relatada em aves jovens e pintinhos. Como na pulorose, as perdas no tifo começam no nascimento, mas continuam até a idade de postura, com as poedeiras vermelhas e reprodutoras pesadas sendo mais suscetíveis.

Pode ser transmitida de várias maneiras. As aves portadoras e reatoras são, de longe, os mais importantes agentes disseminadores e perpetuadores da infecção, sendo comum o contágio por contato entre aves infectadas e suscetíveis, por coabitação. A transmissão via ovo é possível, embora não haja concordância a este respeito na literatura. Não há evidências de transmissão por acasalamento ou correntes de ar. Por outro lado, ratos podem transmitir, bem como tratadores, pessoal que lida com a ração, compradores de aves e visitantes que vão de lote em lote e de granja para granja podem carregar o agente, o que pode ser evitado por desinfecção de sapatos, mãos e roupas. Igualmente, caminhões, cestos, caixotes e sacos de ração podem estar contaminados. Aves silvestres, moscas, outros animais e insetos podem ser importantes transmissores mecânicos, especialmente se eles estão se alimentando de carcaças de aves mortas ou miúdos de plantas processadoras ou nascedouros / incubadoras.

No que tange ao tratamento, prevenção e controle, drogas profiláticas e terapêuticas têm sido desenvolvidas contra o tifo, tendo um papel no salvamento de lotes infectados. Furazolidona e sulfaquinoxalina têm sido utilizadas na ração, sendo que no caso da primeira, a doença poderá reaparecer após o tratamento.

Os cuidados preventivos são semelhantes aos da pulorose, com cuidados com o ambiente, com a possível transmissão via ovo, presença de outras aves (reservatórios). Pintinhos somente vindos de fontes livres de tifo e pulorose, ração livre, se possível peletizada, evitar ratos, camundongos, coelhos, cães e gatos próximos às aves. Controlar insetos e outros (moscas, ácaros, larvas, etc...). Usar água clorada, cuidar da proteção de funcionários, da limpeza de caminhões, fômites, etc... Dispor adequadamente das aves mortas, com eliminação das aves portadoras / positivas com incineração. A testagem recomendada pelo NPIP dos Estados Unidos e mais recentemente pelo MA do Brasil são importantes medidas no sentido de controlar e erradicar a doença.

Quanto à imunização, nos EUA bacterinas não são mais produzidas, e vacinas vivas não são permitidas. Ainda assim, a vacina com a cepa 9R, viva, pode proteger contra o desafio por até 32 semanas. Entretanto, ela é potencialmente perigosa, especialmente na infecção ovariana e transmissão via ovo, além de reação sorológica transitória. Igualmente, sabe-se pouco a respeito da possibilidade de reversão à virulência, além de não possuir um marcador que a diferencie das cepas de campo. A literatura refere que a mesma pouco protege contra infecção nem transmissão transovariana, embora seu uso intensivo possa reduzir a queda na postura. Normalmente não vacinam-se matrizes ou avós, pela interferência na testagem e pelo mascaramento de sintomas de infecção por cepas de campo.

4. Salmoneloses paratíficas

Doenças agudas ou crônicas das aves e de muitos outros animais (inclusive mamíferos), causada por qualquer uma das Salmonelas do grande grupo das não-específicas de nenhum hospedeiro (no caso das aves, outras que não a *S. Gallinarum* ou *S. Pullorum*).

Ataca principalmente aves jovens (até 2 sem. de idade), com as aves mais velhas tornando-se em geral portadoras intestinais assintomáticas, por longo período. Não tem seletividade na sua patogenicidade por linhagens ou raças de aves específicas, embora seja mais prevalente em perus do que em qualquer outra espécie de ave doméstica.

Gansos e patos jovens são bastante suscetíveis, com surtos tornando-se freqüentemente epizoóticos. A freqüência e a variedade de espécies de aves infectadas, em diferentes localidades, sugerem que estas infecções são não-discriminatórias, apenas necessitando acesso aos microorganismos. São ainda patógenos de todas as espécies de mamíferos domésticos e selvagens (bovinos, suínos, ovinos, caprinos, eqüinos, cães, gatos e répteis), podendo infectá-los cronicamente, sendo portadores assintomáticos e liberando o microorganismo nas fezes. Ratos e camundongos são óbvios portadores intestinais de *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis*. Moscas, besouros, baratas, pulgas e lagartos também são perigosos, com suas presenças nos galpões podendo causar infecções em lotes sucessivos de aves.

No tocante à transmissão, a transovariana é incomum em galinhas, sendo um pouco mais freqüente em perus, assim mesmo com um baixo nível de ovos infectados. No entanto, aceita-se que pelo menos algumas *Salmonelas* podem produzir infecções no ovário e peritônio de poedeiras, possibilitando assim a contaminação dos conteúdos dos ovos antes da postura. A contaminação fecal da casca durante a postura, ou em ninhos, cama ou incubadoras contaminadas pós-postura são muito importantes, já que portadoras intestinais são comuns, por até 18 meses ou mais.

A *S. Typhimurium* é capaz de penetrar todas as estruturas externas da casca em 6 minutos a 37,2 °C, com defeitos e quebras sendo mais importantes que a espessura da casca na influência sobre a penetração. A água contaminada pode servir como fonte de transmissão, bem como inalação de pó, contaminação fecal da ração, e consumo direto de material fecal por aves jovens. Pode haver ainda transmissão direta para aves jovens, a partir de aves mais velhas que sejam portadoras crônicas e assintomáticas, bem como por fômites como botas, sacos de ração, caixas, bandejas e equipamentos de cria. Rações contaminadas podem ser uma comum e muito importante fonte de *Salmonelas* paratíficas. O número de microorganismos contaminantes é normalmente baixo, mas a ocorrência é alta. Com esta larga distribuição, torna-se difícil controlar o problema, havendo correlações diretas entre: *Salmonelas* encontradas nas rações e *Salmonelas* encontradas nas camas dos animais que alimentam-se delas; igualmente, entre *Salmonelas* isoladas de ingredientes das rações e aquelas isoladas de carcaças processadas. As rações livres de *Salmonella* não são uma panacéia, mas é um passo importante no sentido de reduzir infecções por este agente. Fezes de portadores infectados são as fontes mais comuns de infecção entre aves adultas, inclusive entre lotes contaminados anteriormente, para novos lotes mantidos naqueles locais posteriormente, perpetuando a infecção. Por outro lado, humanos infectados (tratadores, funcionários do frigorífico) ou dejetos podem infectar as aves tanto no lote como no processamento.

4.1. Problemas de saúde pública

Muitos sorotipos paratíficos têm sido isolados de aves domésticas, caracterizando-as como um dos principais reservatórios de salmonelas envolvidas em casos de toxinfecções alimentares. Um exemplo são as carcaças de frangos, as quais podem ser contaminadas durante o abate e representar uma ameaça à saúde pública.

Nos EUA, embora a incidência precisa do número de surtos de intoxicação alimentar em humanos causados unicamente por salmonelas (exceto *S. Typhi*) seja desconhecida, em função da não-comunicação às autoridades de pequenas ocorrências, o Centro de Controle de Doenças (CDC) estima em mais de 40.000 casos por ano, com cerca de 500 mortes. O nº total de casos de intoxicações alimentares em geral nos EUA e Canadá em 1988 foi estimado em impressionantes 4 milhões de casos, com um custo econômico (incluindo perda de mercado, em produtividade e força de trabalho) de até US\$ 4.8 bilhões por ano. Em um período de 5 anos (1985-89), ocorreram nos EUA, somente causados por *S. Enteritidis*, 189 surtos, com 6.604 pessoas envolvidas, das quais 43 morreram.

Por sua vez, os ovos e a carne de frango são dois dos produtos mais comumente apontados como origens dos agentes causadores de intoxicações alimentares, e isto em parte (no caso do ovo) é devido à contaminação com material fecal que pode ocorrer durante a postura, material este que, se estiver infectado, poderá comprometer o produto. No caso da carne, o processo de industrialização, que inclui a passagem do frango por etapas de processamento comuns, faz com que a existência de um relativamente pequeno número de animais infectados possa causar a multiplicação destas ocorrências, com a contaminação de toda a linha de abate.

As bactérias, capazes de fixar-se através de suas fímbrias à superfície das carcaças, tendo como aliada a formação de um "filme" de líquidos durante o processamento, causam uma enorme dificuldade para serem removidas. Em todos os produtos destinados ao consumo humano, a inaceitabilidade de presença de *Salmonella* é total, ou seja, zero *Salmonella* no produto final.

4.2. As barreiras sanitárias e a necessidade de controle

Vários países têm introduzido, nas últimas décadas, legislações que visam proteger suas populações contra possíveis patógenos causadores de doenças, tanto em humanos como em animais. Estas leis costumam ser chamadas de barreiras sanitárias, já que impedem o trânsito e a comercialização de produtos de origem animal provenientes de áreas consideradas de risco, podendo servir inclusive como disfarce para o bloqueio de produtos importados, já que esta prática é, de outra forma (barreiras alfandegárias), proibida pelas regras do antigo acordo GATT e da atual Organização Mundial do Comércio (OMC).

As situações mais conhecidas relativas a produtos de origem avícola são a não aceitação da presença de *Salmonella* em 25 g de alimento, por parte de países como os membros do NAFTA (E.U.A., Canadá e México) e dos países da União Européia, posição que deverá ser reforçada na nova edição do CODEX

Alimentarius da Organização Mundial da Saúde.

No âmbito do MERCOSUL, o governo argentino baixou normas de aceitação de produtos de reprodução importados, devendo estes provirem de lotes livres de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovares Pullorum e Gallinarum, e controlados para Typhimurium e Enteritidis. O Brasil, através do Plano Nacional de Sanidade Avícola, propõe-se a premiar com certificação todos aqueles estabelecimentos livres destes patógenos, sendo estes então liberados para exportar seus produtos (ovos férteis e pintos de 1 dia).

Concentrando-se o foco na qualidade microbiológica dos produtos de origem avícola, temos o estabelecimento, na esteira dos certificados internacionais de qualidade, de programas como o ARCPC (Análise de Riscos e Controle de Pontos Críticos), o qual conceitua e propõe medidas de controle em pontos específicos da produção e processamento industrial de alimentos. O objetivo final dos procedimentos de ARCPC é certamente a erradicação destes microorganismos, mas suas altas incidências e a grande variedade de possíveis fontes fazem com que, embora não atingindo resultados absolutos, este plano seja capaz de controlar e reduzir os níveis de contaminação dos produtos finais. Basicamente, os pontos críticos referentes `a patógenos transmissíveis por alimentos seriam, sucintamente:

a) Aqueles referentes à contaminação nos estágios iniciais da produção (lotes reprodutores, pintos de 1 dia, cama, ambiente, ração, água, insetos, animais domésticos, fômites em geral e pessoal envolvido na criação, entre outros).

b) Transporte de animais vivos.

c) Escalda (um dos locais de maior contaminação cruzada no abatedouro).

d) Lavagem (dependente da pressão da água).

e) Depenamento (em equipamento que facilmente acumula resíduos que podem gerar contaminação).

f) Evisceração (especialmente a mecânica, que no caso de lotes desuniformes gera uma alta ocorrência de rompimento de intestinos, com contaminação da linha de abate com seus conteúdos).

g) Chilling (há riscos por acúmulo de material orgânico, pela dificuldade na renovação e resfriamento dos grandes volumes de água utilizados).

h) Cortes e empacotamento (problemáticos pela possibilidade de contaminação por contato com superfícies contaminadas).

i) Refrigeração, estocagem e distribuição.

Cada um destes pontos possui procedimentos para seu controle, bem como

objetivos e indicadores de sua eficiência, os quais podem ser encontrados na literatura, não cabendo análise individualizada neste momento.

Dados estes fatos, aliados a um comportamento já não tão inespecífico das *Salmonelas* paratíficas em relação ao hospedeiro (em especial no caso da *S. Enteritidis*, capaz de causar septicemia e transmitir-se verticalmente em aves) e a um já mencionado aumento no número de casos de Salmoneloses em humanos em inúmeros países do mundo, aumento este que chegou a 1000% no Brasil, no período de 1979 a 1987, paralelos a uma predominância dos isolamentos de *Salmonella* em alimentos de origem avícola, cria-se então uma necessidade imperiosa e inadiável de determinar-se a exata origem e extensão da ocorrência destes microorganismos no processo de produção e industrialização dos produtos avícolas, bem como, de posse destes dados, estabelecer sólidos e confiáveis programas de prevenção e controle.

4.3. Tratamento, prevenção e controle

Como consequência óbvia da detecção de pontos críticos para a presença de *Salmonella* na avicultura, obtida através dos processos de monitorização microbiológica, tem-se como etapa subsequente a adoção de medidas de prevenção e de controle destas contaminações, as quais têm merecido grande destaque nos últimos anos, demonstrado pelo grande número de trabalhos de pesquisa realizados nesta área.

A quimioterapia tem alguma eficácia em termos de reduzir a mortalidade, embora existam evidências de que as aves tratadas com antibióticos continuariam portadoras ativas, havendo inclusive um aumento na quantidade de *Salmonelas* excretadas nas fezes.

Além das recomendações tradicionais de confinamento total, proteção ambiental, lavagem e desinfecção e de vazio sanitário, normais na avicultura industrial, pode-se ressaltar ainda alguns outros mais utilizados, como por exemplo, no que se refere ao controle da infecção dos animais, a aplicação de flora bacteriana normal de animais adultos a pintinhos (princípio da exclusão competitiva), que evitaria assim a possibilidade da *Salmonella* encontrar espaços livres para infectar o trato gastrointestinal das aves, já que estes já estariam ocupados pelas bactérias provenientes da flora administrada anteriormente. Outra proposição é a da utilização de ácidos orgânicos (propiónico, acético, láctico, etc...) na ração dos animais, como forma de criar um meio inadequado à sobrevivência de patógenos como a *Salmonella*.

A vacinação de animais em locais de alto risco, tanto com bacterinas modificadas geneticamente como com bacterinas autógenas, especialmente no caso de *Salmonelas* paratíficas em lotes de reprodutoras têm sido recomendados, sendo algumas destas já aprovadas pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) para uso naquele país. Vacinas mortas normalmente produzem respostas fracas ou inconsistentes, fundamentalmente porque os organismos são rapidamente destruídos e eliminados, além da possível destruição de Ag relevantes durante a preparação. Vacinas vivas atenuadas têm sua imunogenicidade proporcional à sua virulência, com a atenuação sacrificando parte da imunogenicidade. Vacinas vivas mutantes de *S.*

Typhimurium (deficientes, por exemplo, na síntese de aminoácidos aromáticos, não se multiplicando no tecido do hospedeiro, requerendo PABA) são capazes de reduzir a excreção fecal, o estado de portador ao abate e o número de Salmonelas no ambiente do galpão. O desenvolvimento, entre outras, da vacina "Zoosaloral H", na Alemanha, baseada em cepa marcada da *S. Typhimurium*, tem dado esperanças quanto ao controle desta e também da *S. Enteritidis*. O fato da cepa ser marcada permite a sua diferenciação de cepas de campo, por técnicas de biologia molecular.

A monitorização microbiológica da ração e dos insumos de origem animal, bem como do ambiente em que as aves são criadas, paralelamente ao controle da infecção dos plantéis reprodutores, quer seja por ELISA ou por métodos mais tradicionais, é essencial para evitar-se a disseminação do agente.

Quanto ao controle dos produtos de origem avícola, algumas recomendações, no caso dos ovos, seria a de coletá-los várias vezes ao dia (mínimo 4x, podendo chegar a um ideal de 10x ao dia). A manutenção de ovos sob refrigeração (de 4 a 7°C) desde o armazenamento até o momento do consumo, passando pela comercialização, já é uma possibilidade real, tanto nos EUA como na Grã-Bretanha. Igualmente, a lavagem dos ovos deve ser feita por aspersão de água com sanitizantes, a uma temperatura ao redor dos 43 °C. Ovos com mais de 2 semanas não deveriam ser comercializados, pois a deterioração (decaimento) das estruturas internas do ovo (calaza, gema) facilitariam a contaminação.

Finalmente, em relação aos produtos cárneos, o controle deverá ocorrer não só quanto ao cuidado com a contaminação cruzada nos processos de depenagem e evisceração, mas também com a adoção de temperaturas de escalda ao redor de 60°C que, sem produzir efeitos adversos no odor e/ou sabor do produto, permitem uma sensível redução na quantidade de *Salmonella* nas carcaças. A lavagem com água clorada pode possibilitar a redução em até 90% do número de Salmonelas nos produtos, enquanto que o borrifamento de água sobre as carcaças, o mais freqüentemente possível, evitaria a formação do "filme" de água contaminada com a presença e fixação de bactérias na carcaça, sendo então facilmente removidos especialmente na escalda, tendo-se ao final um "filme" relativamente limpo aderido à carcaça. A monitoração do pessoal envolvido no processamento das aves, no tocante a possíveis infecções intestinais também é essencial, visto que estes têm contato direto com o produto, inclusive na sua forma final.

Agradecimento

O primeiro autor gostaria de agradecer ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsa de produtividade em pesquisa.

TÉCNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR NO DIAGNÓSTICO DE DOENÇAS DE AVES

Liana Brentano

Embrapa Suínos e Aves

Conceitos: biologia molecular e técnicas de biologia molecular

A biologia molecular tem cada vez mais ocupado espaço não apenas em pesquisa, mas também em áreas aplicadas, como no diagnóstico de doenças de aves. Os usuários de laboratórios de diagnóstico podem não estar ainda totalmente familiarizados com esta área e portanto uma breve e mesmo superficial revisão de alguns conceitos importantes, que formam a base das técnicas de biologia molecular, podem esclarecer melhor como avaliar as vantagens, do que consistem e o que se pode esperar de técnicas de biologia molecular como métodos que podem ser utilizados para atender as demandas por resultados de diagnóstico mais rápidos, mais específicos e sensíveis de doenças.

De forma bastante genérica pode-se definir a biologia molecular como a área da biologia que tem enfoque principalmente na investigação da estrutura, funcionamento e formas de regulação dos organismos a nível molecular, mais especificamente nos diferentes aspectos que concernem aos ácidos nucleicos e sua expressão na célula ou em microrganismos, englobando assim vários enfoques de diversas áreas de pesquisa como bioquímica, genética, microbiologia, imunologia, patologia entre outras. A pesquisa em biologia molecular tem gerado excelentes ferramentas técnicas que tem encontrado também larga aplicação à nível clínico, terapêutico e de diagnóstico, tais como na área de terapia gênica, identificação de marcadores genéticos de doenças, bem como no diagnóstico e epidemiologia de doenças infecciosas pela identificação de patógenos via métodos de detecção direta de seus genomas ou ainda a sua caracterização a nível molecular para definir aspectos da sua evolução e epidemiologia pelas relações existentes entre microrganismos incidentes ou prevalentes em diferentes regiões. Técnicas de biologia molecular referem-se portanto basicamente às metodologias que envolvem o isolamento, a manipulação *in vitro* e análises de ácidos nucleicos e de proteínas que são os produtos da expressão de genes. As técnicas de DNA recombinante são exemplos das ferramentas básicas da biologia molecular e envolvem métodos de clonagem de genes realizados por meio do isolamento de segmentos de DNA, que são inseridos e investigados em diferentes organismos, tais como vetores eucarióticos ou procarióticos geneticamente modificados. Estes vetores são utilizados para sínteses ou realização de modificações das cópias do DNA clonado ou ainda a síntese de proteínas codificadas pelo clonado em vetores especialmente modificados para expressão de genes exógenos neles inseridos. A identificação de genes e seu isolamento para fins de clonagem e análises como o sequenciamento de DNA foi extremamente simplificada com o desenvolvimento

da técnica de PCR (polimerase em cadeia), por permitir a síntese e o isolamento de segmentos do genoma com grande nível de amplificação do DNA, que poderá então ser mais facilmente clonado em vetores e analisado *in vitro*. Portanto, ao utilizarmos técnicas de biologia molecular na área de diagnóstico também nos referimos principalmente às metodologias que envolvem a extração e manipulação do genoma de células ou de microorganismos e a identificação de doenças por meio da análise, detecção e identificação de DNA ou RNA característicos à estes organismos. Um exemplo claro é o diagnóstico de diferentes vírus que constituem importantes causadores de doenças em aves, por meio da detecção específica da presença de seu genoma em aves suspeitas de determinada infecção. Como é feita esta detecção e como podem ser caracterizados patógenos aviários, especificamente vírus das aves é o tópico principal que será abordado.

PCR: Polimerase em cadeia: bases técnicas

PCR, ou polimerase em cadeia, desenvolvida há cerca de dez anos pela Perkin Elmer-Cetus Corporation nos Estados Unidos, rapidamente revolucionou e se tornou uma das ferramentas básicas da pesquisa em biologia molecular, facilitando o isolamento, identificação e clonagem de genes. A sua aplicação é ampla e atualmente é a técnica de biologia molecular que vem cada vez mais ocupando espaço também no diagnóstico de doenças de aves, inclusive no Brasil, para a detecção de micrororganismos associados a importantes doenças de impacto econômico na avicultura. Seria pretensioso tentar aqui uma revisão em biologia molecular abordando genética, estrutura de ácidos nucleicos e a toda a base bioquímica que define o desenvolvimento da técnica de PCR, mas uma breve e mesmo superficial colocação de apenas alguns conceitos poderá pelo menos explicitar alguns dos princípios que definem o seu funcionamento.

DNA, RNA, nucleotídeos, codons e síntese de proteínas

O genoma de microorganismos, como os vírus, contém o seu código genético único, que determina as características distintas (fenótipo) entre as diferentes famílias de vírus ou mesmo entre diferentes subtipos virais. Os vírus se distinguem em sua complexidade estrutural, mecanismos de replicação e patogenia, que são por sua vez determinados pelos diferentes tipos de genomas encontrados nos vírus, que podem ser constituídos de DNA ou mesmo RNA, contendo neles os diferentes genes que codificam proteínas estruturais que formam a partícula viral completa, assim como outras proteínas que exercem importantes funções na célula infectada pelo vírus e que são necessárias à sua replicação e tem também importante papel na patogenia das doenças que causam nos animais. O DNA é formado por quatro nucleosídeos: Adenina, Guanina, Citosina e Timidina, ligados cada um a uma deoxirribose, por sua vez dispostos em uma sequência em cadeia em infinitas diferentes combinações entre estas 4 bases, ligadas umas às outras via ligações fosfato. Estas sequências formam fitas de DNA que são complementares entre si via ligações de hidrogênio formadas sempre entre os nucleotídeos adeninas e timidinas

(ligações A-T) ou entre citosinas e guaninas (ligações C-G). (FIGURA 1) Esta sequência de nucleotídeos determina o código genético para a síntese de proteínas através de codons específicos que são sempre formados por 3 nucleotídeos que codificam um determinado amino ácido. Os codons para a síntese de amino ácidos seguem a sequência determinada por apenas uma das fitas de DNA, denominada fita de codificação ("coding strand").

Esquemáticamente, uma sequência de DNA formada pelos 4 nucleotídeos e seu pareamento: ATGGTTAGCTAGGCCAC.....
TACCAATCGATCCGG TG.....

Codons no DNA: ATG GTT AGC TAG GCC
AC.....

.aa codificados: Metionina Valina Serina Triptofano Alanina

Portanto a ordem, ou seja a sequência em que estão dispostos estes quatro nucleotídeos determina que amino ácidos estão presentes e em que sequência se encontram na proteína, determinando qual a será a estrutura e as propriedades da proteína codificada pelo DNA.

Replicação, transcrição, tradução (expressão de proteínas)

A multiplicação celular ou de microrganismos como os vírus que contém como genoma DNA depende da concomitante replicação do seu DNA, ou seja da síntese de novas cópias de DNA que serão incorporadas na nova célula ou partícula viral. A replicação envolve um processo complexo com vários componentes e pontos de regulação, catalizado pela enzima DNA polimerase que sintetiza novas cópias de ambas as fitas do DNA por meio da incorporação de nucleotídeos complementares a cada fita do DNA a ser copiada, que serve como um molde para a síntese completa do nova cópia do DNA. De forma relativamente diferente da replicação, a cópia do DNA em RNA é denominada de *transcrição*, onde a fita de DNA é também fielmente copiada, mas a fita complementar sintetizada consiste de RNA. Diferentemente do DNA, o RNA contém uridinas ao invés de timidinas e os nucleosídeos do RNA estão ligados a ribose. Na *transcrição* o DNA serve de molde para a síntese de RNA por um processo que por sua vez envolve a enzima RNA polimerase DNA-dependente. Outro processo de síntese de ácidos nucleicos é também a transcrição reversa, descoberta nos retrovírus, onde o seu genoma que consiste de RNA é transcrito em DNA via a enzima denominada transcriptase reversa por ao contrário sintetizar DNA a partir do RNA num processo reverso ao anteriormente conhecido. Há nas células eucarióticas (ex. células animais) e procarióticas (ex. bactérias) diferentes RNAs, entre os quais o RNA mensageiro (mRNA) transcrito a partir do DNA. O mRNA é o RNA de fato "lido" na célula para a expressão do código genético definido na sequência do DNA, resultando na síntese de proteínas num processo denominado de *tradução*. Portanto, ao conhecermos as sequências de DNA, determinadas por técnicas de biologia molecular, podemos inferir a sequência do mRNA e subsequentemente podemos também inferir a

sequência de proteínas, o que é um processo muito mais simples do que técnicas bioquímicas demoradas e difíceis de sequenciamentos de amino ácidos e podemos rapidamente até mesmo muitas vezes prever sua estrutura e função com base em famílias de proteínas cujas sequências e funções já sejam conhecidas e disponíveis em bancos de dados de genomas.

Estes simples e rápidos conceitos são a base de técnica de PCR, onde não apenas microrganismos cujo genoma consiste de DNA podem ter o seu DNA copiado e amplificado especificamente *in vitro*, mas também os vírus cujo genoma já consiste de RNA que podem também ser sintetizados e identificados via uma primeira etapa de transcrição reversa do seu RNA, resultando primeiro na síntese de DNA complementar (cDNA) que poderá então ser subsequente amplificação por PCR. A técnica de PCR envolve vários ciclos de síntese de DNA mediada por uma enzima DNA polimerase termoestável, que mantém sua atividade mesmo sob altas temperaturas e em repetidos ciclos de amplas variações de temperatura, que normalmente afetam a atividade de outras enzimas.

Quais são alguns dos princípios e como é realizada a técnica de PCR?

Qual a função de primers, enzimas termoestáveis, ciclos e temperaturas na reação de PCR?

Antes de identificar como vem sendo utilizada PCR no diagnóstico de doenças de aves é pertinente abordar vários pontos sobre a técnica em si. A primeira etapa, realizada antes da reação por PCR, consiste na eficiente extração do DNA ou RNA de tecidos e células através de métodos que mantenham a sua integridade, como por exemplo devido a ação de nucleases ou RNases que degradam o DNA ou RNA, contendo ainda o mínimo possível de inibidores da enzima polimerase. Existem inúmeros protocolos disponíveis, que envolvem diferentes detergentes e enzimas para o processo de extração, que podem ser consultados em excelentes referências para estas técnicas e que também contem uma ampla revisão geral com protocolos práticos de laboratório sobre a técnica de PCR e suas várias modalidades e aplicação (Sambrook et al., 1989; Innis et al., 1990).

Para implantar a técnica de PCR para o diagnóstico de doenças infecciosas das aves é importante ter como referência inicial a sequência conhecida do genoma do microorganismo suspeito a ser identificado. Sequências da maioria dos vírus aviários, bactérias, e mycoplasmas aviários hoje conhecidos já são disponíveis em bancos de dados de genomas, onde as sequências, depositadas por diferentes laboratórios de pesquisa, foram determinadas por técnicas como PCR, clonagem e sequenciamento do DNA. Conhecida a sequência do DNA, ou do RNA inferido pela sequência do DNA, podem ser delineados primers, que são um dos componentes essenciais para a reação. Primers ("iniciadores") consistem de pequenas cadeias de cerca de 15 a 20 nucleotídeos em média e que podem ser encomendados e obtidos comercialmente já a custos razoáveis, de empresas que produzem oligonucleotídeos sintéticos. Os primers correspondem a fragmentos da sequência do DNA a ser sintetizado por PCR e

sua função é fornecer um sítio de iniciação para a enzima polimerase, que irá iniciar a síntese de DNA a partir do primer catalizando a incorporação de nucleotídeos e assim o alongamento da cadeia de DNA usando a fita complementar do DNA de fita dupla a ser copiado como "molde" para incorporar corretamente e na sequência determinada por este molde os novos nucleotídeos, sintetizando assim a fita complementar do DNA (ver diagrama da reação de PCR). O uso simultâneo de um primer específico exatamente complementar a determinada sequência presente em cada uma das fitas do DNA gera então nova cópia do DNA de fita dupla, pela síntese equimolar de ambas fitas do DNA durante a reação. É importante salientar que uma vez que infinitas combinações da sequência dos quatro nucleotídeos que compõe o DNA são possíveis e havendo grandes diferenças entre o tamanho de diferentes genes, o DNA de diferentes organismos terá uma sequência distinta e característica que define aquele organismo. Os primers portanto ao hibridizarem a uma determinada sequência do DNA, previamente definida como segmento que se objetiva sintetizar, estabelecem corretamente que sequência ou apenas que parte da sequência total do DNA presente na reação será amplificada, observando-se que sejam dadas as condições de meio (pH e molaridade do tampão utilizado na reação) e principalmente de temperaturas ajustadas especificamente aos primers utilizados para garantir a sua precisa hibridização à fita complementar que será copiada. Ocorre assim a síntese específica apenas do DNA reconhecido pelos primers, mesmo na presença de qualquer outro DNA, o que simplifica muito o processo de amplificação específica do DNA de microrganismos na reação pois reduz na maioria dos casos a necessidade de sua prévia purificação para a reação de PCR. Como exemplo, ao extrairmos inicialmente o DNA e RNA total de células infectadas com vírus para seu diagnóstico por PCR, de fato extraímos indiscriminadamente nestas extração de ácidos nucléicos tanto o DNA (ou RNA) viral assim como grande quantidade do DNA (e RNA) total da célula, mas a correta escolha de primers permite a amplificação apenas do genoma viral ou segmento do genoma que contenha um gene específico que queremos diagnosticar.

Com relação aos vários ciclos e temperaturas distintas que caracterizam a reação de PCR (Fig. 2), a primeira etapa, mantida por cerca de dois minutos em média à temperatura de 94°C tem a função de primeiro desestabilizar e romper por meio da alta temperatura as pontes de hidrogênio que mantêm hibridizadas as duas fitas do DNA. Esta etapa a 94°C separa as duas fitas de DNA para permitir que os primers possam então ter acesso e se ligarem (hibridizar) à sua fita de DNA complementar.

Uma vez que pontes de hidrogênio entre G-C são mais estáveis a maiores temperaturas que pontes A-T, a sequência dos primers (caso mais ricos em G e C ou em A e T) definem a temperatura ótima do próximo estágio da reação, que é a de hibridização, ou seja o pareamento e a ligação dos primers ao DNA a ele complementar. A temperatura de hibridização é de modo geral estabelecida na faixa de 50° a 60° C, conforme os primers usados. Como os primers são menores que as fitas de DNA, ao reduzir-se esta etapa a esta temperatura eles hibridizam mais rapidamente e eficientemente, contrário às longas fitas de DNA complementares que permanecem abertas, permitindo a sua síntese. A

sequência e tamanho dos primers são essenciais na especificidade da hibridização, pois dependendo da temperatura utilizada durante a reação de hibridização o pareamento poderá vir ser menos estável ou mesmo permitir erros pontuais de pareamento do primer ao DNA em alguns nucleotídeos, o que pode levar a errada amplificação de uma outra sequência diferente de DNA também presente na reação mas que venha a ter certo grau de homologia à sequência visada à amplificação. Portanto, a escolha criteriosa da sequência dos primers a serem utilizados e padronização das temperaturas de hibridização são essenciais na obtenção de resultados esperados, com síntese específica da sequência apenas do DNA que se quer amplificar. Após estes ciclos de separação das fitas de DNA e hibridização dos primers, a temperatura da reação é modificada para 72°C e mantida por 2 a 4 minutos, em tempo diretamente proporcional ao tamanho do DNA a ser amplificado, para que ocorra então a síntese do DNA mediada por uma polimerase termoestável, como a Taq polimerase (originária de uma bactéria termofílica que cresce a altas temperaturas). A polimerase incorpora nucleotídeos que são obtidos de uma mistura dos quatro deoxinucleotídeos (A,T,C,G) previamente adicionados à reação, na presença de um tampão de pH estável com concentrações ótimas de íons como Mg^{++} que devem ser padronizados para cada teste diagnóstico que for implantado. Os tempos de cada uma destas etapas podem ser ligeiramente variáveis, dependendo das sequências em questão e do tamanho do DNA a ser amplificado, que é medido em número total de nucleotídeos. Após estas etapas executadas à diferentes temperaturas, se reinicia cada etapa novamente, em vários ciclos repetidos, cada ciclo consistindo então da separação das fitas, hibridização dos primers e síntese de DNA. Como em cada ciclo novas cópias do DNA foram sintetizadas, mais DNA está disponível a medida que se inicia um novo ciclo e assim cada ciclo pode gerar cada vez maior número de cópias do DNA resultando na amplificação exponencial do DNA, de onde advém a grande sensibilidade desta técnica. O total de ciclos em PCR é usualmente mantido no máximo por volta de 30 a 35 ciclos em média para evitar que, quando havendo a possibilidade da incorporação de mutações, ou seja a eventual incorporação pela polimerase de nucleotídeos errados (não complementares) não ocorra então a subsequente amplificação exponencial destes erros, pois resultariam em falhas na especificidade do produto final amplificado.

A reação toda é executada *in vitro*, em pequenos volumes e automaticamente em aparelho termociclador programado para atingir corretamente cada uma das temperaturas previstas à cada etapa, executando o número de ciclos programados. Terminada a reação, uma alíquota é removida e analisada por eletroforese em gel de agarose em paralelo a um padrão de fragmentos de DNA de tamanhos conhecido. O gel é então corado com brometo de etídeo e visualizado sob luz ultravioleta identificando-se se o DNA amplificado corresponde ao tamanho esperado e se há amplificação inespecífica indicada pela presença de outros fragmentos de DNA. De diferentes tamanhos na reação.

Apenas como ressalva mesmo aos baixos níveis de introdução de mutações no DNA sintetizado por PCR, este é um evento provável com o uso da enzima termosestável Taq polimerase, amplamente utilizada nas reações de diagnóstico. Esta enzima não possui uma atividade de autocorreção de falhas de incorporação

de nucleotídeos, mas este não é um problema significativo por serem muitas vezes apenas esporádicas mutações pontuais que não alteram significativamente o DNA sob o ponto de vista de diagnóstico pois não há mudança significativa e detectável da sequência amplificada. Contudo, dependendo dos objetivos da reação, tais como a obtenção da correta sequência de DNA para a clonagem e expressão autêntica da proteína codificada por determinado gene outras enzimas termoestáveis podem ser utilizadas. Por exemplo, quando realizamos a clonagem de um gene do reovírus com o objetivo de expressar *in vitro* uma de suas proteínas para poder investigar a sua função bioquímica na replicação do reovírus, amplificamos o gene M1 por PCR utilizando a enzima Vent polimerase, que tem atividade de exonuclease que autocorrigue erros de incorporação de nucleotídeos. De fato, ao sequenciarmos o gene M1 do reovírus não observamos a introdução de mutações e tínhamos a certeza de poder expressar *in vitro* a autêntica proteína sem mutações na sua sequência de amino ácidos que pudessem refletir em alteração na sua correta estrutura terciária e secundária. Contudo, uma vez que a eficiência da Vent polimerase é muito inferior a Taq, ela não é tão adequada como a Taq polimerase a rotinas que dependem de reações de PCR eficientes e sensíveis para o diagnóstico rápido de sequências determinadas de DNA.

Como confirmar a especificidade do DNA amplificados por PCR?

Análise com enzimas de restrição

A especificidade do DNA amplificado por PCR pode ser mais seguramente confirmada também por outros métodos. Um destes é a análise do DNA com enzimas de restrição. Há um grupo de enzimas de restrição hoje amplamente utilizadas em biologia molecular, obtidas comercialmente, que reconhecem sequências específicas de DNA, em que dependendo da enzima variam de 4 a 6 nucleotídeos e a clivagem é feita em uma única posição. Dois simples exemplos são as enzimas EcoRI que reconhece a sequência G↓ATTC (a seta indica o sítio de clivagem) ou a enzima AatII que reconhece a sequência GACGT↓C. Um determinado DNA poderá conter um ou outro sítio de restrição ou mesmo vários sítios para uma mesma enzima. Sequências de DNA que forem diferentes formarão então distintos mapas de restrição, demonstrados por diferenças no número ou tamanho dos fragmentos gerados pelas enzimas usadas para clivar o DNA. Como mencionado anteriormente, um dos requisitos importantes para o diagnóstico por PCR é o conhecimento prévio da sequência de DNA que queremos amplificar, pois permite também sabermos de antemão quais os sítios disponíveis para diferentes enzimas de restrição e prever quais enzimas clivam ou não o DNA e que tamanhos de fragmento deverão ser gerados caso tenhamos amplificado corretamente o DNA esperado. Há porém a possibilidade de termos amplificado cepas virais variantes que tenham variações significativas na sequência do gene amplificado por PCR. Portanto ao definirmos quais enzimas usar é importante utilizar enzimas que clivam sequências do DNA que sejam conhecidamente mais conservadas, ou seja que mantenham praticamente as

mesmas sequências de ácidos nucleicos entre diferentes amostras isoladas de vírus mesmo em genes de menor conservação de sequências. Ou, por outro lado devemos escolher para diagnóstico apenas a amplificação daqueles genes com sequências que permanecem bastante similares ou homólogas (conservadas) mesmo quando se tratando de vírus que possuem diferentes cepas virais, tais como amostras variantes, se quisermos aplicar este tipo de análise para definir a especificidade do DNA amplificado.

Um exemplo de confirmação do produto de PCR seria o diagnóstico por meio de análise com enzimas de restrição do vírus da doença de Newcastle, onde o gene que codifica a sua proteína interna no nucleocapsídeo viral é altamente conservada e assim análises com estas enzimas seriam mais precisas, em contraste aos genes que codificam proteínas do envelope viral, como a proteína de fusão que apresenta maiores variações entre diferentes cepas do vírus. Ao implantar o diagnóstico por PCR é imprescindível portanto conhecer-se bem a estrutura do vírus a ser diagnosticado e ter sempre que possível como base as seqüências já conhecidas de diferentes amostras já isoladas e sequenciadas, para definir claramente os objetivos do que se quer detectar e interpretar corretamente os resultados obtidos.

PCR aliado a análises de DNA com enzimas de restrição para o diagnóstico de variantes virais de vírus aviários

A principal aplicação da análise de DNA viral com enzimas de restrição está na área de diagnóstico de cepas virais variantes. A ocorrência de cepas virais variantes está muitas vezes diretamente relacionada a genes virais que codificam proteínas externas ou glicoproteínas do envelope viral no caso de vírus envelopados e que por sua vez estão associadas a indução de respostas imunes mediadas por anticorpos neutralizantes. Variações nas sequências destes genes se refletem em variações antigênicas entre diferentes cepas virais e a ocorrência de diferentes tipos ou sorotipos de vírus de diferentes graus de patogenicidades ou que causam falhas na proteção vacinal conferida por cepas vacinais significativamente heterólogas à cepas de campo circulantes em determinadas regiões. Alguns dos melhores exemplos são os vírus da bronquite infecciosa das aves e o vírus da doença de gumboro que apesar de serem vírus estruturalmente relativamente pouco complexos se comparados a outros vírus como herpesvírus da doença de Marek ou poxvírus (bouba aviária), mas tem importante capacidade de introduzir mutações nas suas sequências de genes e gerar novas cepas virais que podem apresentar significativas e importantes variações antigênicas em suas proteínas externas quando comparadas diferentes amostras isoladas à campo. Variações antigênicas entre diferentes vírus são normalmente determinadas por testes imunológicos, mas mais recentemente com base em que estas variações são definidas a nível molecular pela seqüência do genoma, técnicas que permitem o isolamento de genes e caracterização do seu perfil molecular tem também sido aplicadas ao diagnóstico de cepas variantes. Entre estas está a análise com enzimas de restrição que ao clivarem sequências específicas de DNA permitem estabelecer um perfil conforme o número e tamanhos dos fragmentos gerados.

Contudo, nem toda técnica de diagnóstico é perfeita e esta análise deve levar em conta importantes aspectos, tais como o fato de uma única mutação, ou seja a variação de um único nucleotídeo no DNA poder abolir um sítio de clivagem e alterar o perfil de restrição do DNA, sem contudo refletir na alteração da proteína e portanto não causando variação antigênica. Estas mutações são denominadas silenciosas, pois não alteram o amino ácido codificado e portanto não causam mutações na proteína. Isto se deve a redundância do código genético, pois um mesmo amino ácido pode ser codificado por mais de um codon (o codon consiste de 3 nucleotídeos), a exemplo do amino ácido lysina que é codificado tanto pelo codon AAA ou AAG ou o amino ácido valina que por sua vez possui 4 codons, GUU, GUC, GUA e GUG. Por outro lado, mutações podem de fato alterar o codon para um determinado amino ácido, mas a mudança deste amino ácido pode não refletir em alteração importante que desestruture o epítipo reconhecido por anticorpos e não será portanto significativo por não incorrer em variação antigênica. Por isso, novamente salienta-se que a análise com enzimas de restrição deve ser muito criteriosa, e por isso é sempre levado em conta o uso de diferentes combinações de diferentes enzimas de restrição, escolha de tipos de enzimas de restrição com base na especificidade dos sítios reconhecidos para clivagem, para uma análise mais compreensiva e representativa que permita interpretar reais variações que possam ser encontradas. Neste caso, novamente é essencial poder dispor como base amostras de referência conhecidas como padrão aos resultados esperados.

Um exemplo: Diagnóstico de cepas variantes do vírus da doença de gumboro

Foi com estes critérios que elegantemente Jackwood e Jackwood (1997) utilizando RT/PCR (Reverse transcription PCR) e enzimas de restrição recentemente puderam determinar perfis moleculares variantes em 22 amostras do vírus da doença de gumboro (IBDV). Eles sintetizaram o RNA viral das diferentes amostras em DNA por transcrição reversa usando primers específicos, amplificando então por PCR um fragmento de DNA de apenas 394 nucleotídeos do gene da proteína VP2, que foi posteriormente analisado com seis diferentes enzimas de restrição. Foram observados 10 perfis moleculares em cepas relatadas como variantes do vírus, sendo que um sítio de restrição permitiu seguramente diferenciar 4 amostras vacinais de cepas variantes do vírus. Os resultados foram confirmados por sequenciamento e demonstram a utilidade desta técnica para o diagnóstico diferencial de diferentes cepas vacinais circulantes de cepas variantes de campo do vírus da doença de gumboro.

Caracterização de cepas variantes do vírus da Bronquite infecciosa das aves pela análise com enzimas de restrição

O vírus da bronquite infecciosa das aves (IBV), contém um genoma de RNA não segmentado que codifica 3 proteínas estruturais, M (gene M), S (gene S) e N (gene N). A subunidade S1 da glicoproteína S ("spike protein") localizada no envelope externo (Tyler e Fields, 1996) é reconhecida como a principal indutora

de anticorpos neutralizantes (Cavanagh et al., 1992; Cavanagh et al., 1997). O IBV caracteriza-se pela presença de inúmeros sorotipos do vírus, devido a regiões variáveis na sequência de amino ácidos da proteína S1 e portanto em diferenças na capacidade neutralizante de anticorpos induzidos por S1 expressa em diferentes cepas do VBI. Portanto a proteína S1 é considerada o principal componente do vírus responsável pela habilidade de diferentes sorotipos do IBV em quebrarem a resposta vacinal, quando da infecção por amostras de campo suficientemente heterólogas à cepa vacinal (Cavanagh et al., 1992; Cavanagh et al., 1997). O diagnóstico e definição precisa das relações entre diferentes amostras do IBV prevalentes em regiões de intensa produção avícola é importante para a adoção de medidas de controle, tais como delineamento de estratégias de vacinação ou avaliar a real necessidade ou não de desenvolvimento e introdução de novas cepas vacinas, mais antigênicamente relacionadas aos sorotipos do IBV variantes prevalentes em surtos da doença à campo. Um novo sorotipo do IBV pode surgir como resultado de apenas algumas alterações de amino ácidos em S1, mas estas alterações podem não necessariamente afetar epítopes que induzem anticorpos neutralizantes e portanto a análise sorológica ou a nível molecular fornece importantes informações sobre a epidemiologia e a ocorrência ou não de amostras variantes numa região. Por muitos anos as técnicas de soroneutralização cruzada (Hofstadt, 1980; Cook, 1997) foram utilizadas como meio de definir a relação antigênica entre cepas vacinais e amostras isoladas de campo para prever a capacidade de vacinas em conferir proteção. Mas, estes testes de neutralização cruzada feitos em cultivos celulares, são extremamente demorados, laboriosos e caros. Em contraste, a técnica de PCR aliada a análise com enzimas de restrição do gene que codifica a proteína S1 é mais rápida para o diagnóstico e permite ao mesmo tempo também determinar variações a nível molecular entre diferentes amostras isoladas do IBV. A observação de uma direta correlação da análise de restrição com os resultados de testes de neutralização cruzada faz com que este diagnóstico a nível molecular se constitua em ferramenta ágil e aplicável ao diagnóstico e epidemiologia de diferentes sorotipos ou variantes do IBV (Kwon et al., 1993a; Lin et al., 1991a; Lin et al., 1991b). Outras técnicas de diagnóstico do IBV por PCR utilizam também a detecção de proteínas internas do vírus, tais como a proteína N do nucleocapsídeo viral, que apresenta maior grau de conservação na sua sequência entre diferentes cepas do vírus (Falcone et al., 1997) e a proteína M, que é a proteína de matriz (Andreasen et al., 1991; Kwon et al., 1993b) mas não permitem a avaliação de variações entre cepas do vírus como as nos níveis detectáveis em S1. Além dos importantes aspectos epidemiológicos do IBV, que podem ser avaliados por PCR, esta técnica tem inúmeras vantagens de diagnóstico pois pode ser rápida e específica pela detecção do vírus diretamente em tecidos ou swabs traqueais (Kwon et al., 1993b), substituindo o demorado isolamento e adaptação do IBV em ovos embrionados.

Técnica de sequenciamento para análise de diferentes amostras virais: o exemplo do Vírus da doença de Newcastle

Mais recentemente tem sido obtida uma maior compreensão dos aspectos moleculares que determinam os diferentes graus de patogenicidade encontrados entre diferentes amostras do vírus da doença de Newcastle (VDN) (Nagai e Klenk, 1977). A infectividade do VDN está associada principalmente a proteína F localizada no envelope viral, a qual media o processo de penetração do vírus na célula apenas após um processo de clivagem de sua forma precursora FO em duas subunidades, F1 e F2. A proteína F varia entre diferentes amostras do VDN quanto a clivabilidade ou não por distintas proteases diferencialmente distribuídas em diferentes tecidos, sugerindo que amostras altamente patogênicas para galinhas (amostras velogênicas) podem ser clivadas por grupos de proteases mais amplamente distribuídas na maioria dos tecidos, produzindo uma infecção sistêmica e fatal. Em contraste, a proteína FO de amostras de menor patogenicidade, como as mesogênicas ou lentogênicas requerem proteases mais específicas para clivagem, como as do tipo tripsinas e portanto estes vírus parecem estar restritos a crescer nos tratos digestivos e respiratório. Como diferentes proteases atuam reconhecendo sequências distintas de aminoácidos, foram investigadas as sequências de DNA que codificam os aminoácidos (aa) do sítio de clivagem de FO de diferentes amostras do VDN através da amplificação do gene para proteína F do VDN por PCR. Os paramyxovírus, como o VDN, possuem um genoma de RNA que pode ser sintetizado *in vitro* como cDNA (complementary DNA) pela enzima transcriptase reversa e primers específicos para amplificar por PCR segmento do gene F contendo área de clivagem. Foi demonstrado assim que sequências específicas de nucleotídeos, codificando cerca de 10 aminoácidos situados no sítio de clivagem de FO estão associados diretamente a amostras velogênicas do VDN. A sequência de aminoácidos neste sítio de clivagem determina então a clivabilidade de FO por uma ou outra protease e conseqüentemente estabelece as diferenças em patogenicidade de diferentes amostras virais (Collins et al., 1994; Seal et al., 1995). Ou seja, foi observada uma correlação genotípica com a virulência de vários patótipos do VDN, sugerindo que com base no sequenciamento deste gene cepas velogênicas podem ser diferenciadas das lentogênicas também *in vitro*, sendo esta uma futura metodologia também viável de patotipagem do VDN, mais rápida e com menores riscos à biosegurança do que os demorados testes de patogenicidade (cerebral e intravenosa) em pintos de 1 dia para definir amostras como sendo velogênicas ou não (Collins et al., 1994; Seal et al., 1995; Marin et al., 1995). Através do sequenciamento do gene da proteína F, amostras isoladas do vírus podem ainda ser grupadas filogeneticamente, tornando possível mapear as origens de diferentes vírus, tais como cepas vacinais circulantes ou cepas de campo, definindo com segurança a epidemiologia da doença e prever o patótipo do vírus isolado (Seal et al., 1995). Em resumo, a análise a nível molecular, pelo sequenciamento do gene da proteína F do VDN, permitiu um grande avanço na elucidação de um dos principais determinantes da patogenicidade viral, além de constituir-se em metodologia aplicada à epidemiologia ao definir aspectos evolutivos entre diferentes amostras (avaliados a nível de conservação da

sequências gênicas), assim como em ferramenta viável como potencial método para determinar *in vitro* a patogeniidade de amostras do VDN.

Em resumo, a análise a nível molecular, pelo sequenciamento do gene da proteína F do VDN, permitiu um grande avanço na elucidação de um dos principais determinantes da patogenia viral, além de constituir-se em metodologia aplicada à epidemiologia ao definir aspectos evolutivos entre diferentes amostras (avaliados a nível de conservação das sequências gênicas), assim como em ferramenta viável como potencial método para determinar *in vitro* a patogeniidade de amostras do VDN.

Outra metodologia, envolvendo também técnicas de biologia molecular utilizada no diagnóstico e epidemiologia do VDN é a análise de diferentes genes ou segmentos do genoma viral com enzimas de restrição. Esta análise demonstrou a evolução de diferentes vírus e a origem geográfica de surtos, permitindo estabelecer pelo menos 6 diferentes grupos de vírus e perfis (fingerprints) únicos associados a cepas vacinais. Contudo, ao contrário da técnica de sequenciamento, a análise de restrição não permite definir *in vitro* a patogeniidade de amostras do VDN, uma vez que não há correlação entre um determinado mapa de restrição e apenas um patótipo viral (Pordany et al. 1996).

Outros exemplos de vírus aviários e os aspectos moleculares ligados ao diagnóstico

Amostras de diferentes sorotipos do vírus da doença de Marek podem ser diagnosticadas por PCR. As vantagens do PCR são evidentes também no diagnóstico do vírus da reticuloendoteliose (REV) das aves, uma vez que é mais sensível que o isolamento do vírus em cultivo celular. Por exemplo, a amplificação pela polimerase em cadeia (PCR) foi descrita como permitindo o diagnóstico do vírus da reticuloendoteliose no sangue ou plasma de aves, sugerindo a ocorrência de viremia mesmo em aves sorologicamente positivas, nas quais é difícil prever-se a excreção do vírus uma vez que este é mais difícilmente isolado de aves sorologicamente positivas, tolerantes à doença clínica mas que oferecem riscos à excreção do vírus por longos períodos (Davidson et al., 1995).

Vantagens da técnica de PCR como método para diagnóstico

Devido a algumas das complexidades e alta sensibilidade da técnica de PCR, são necessários que sejam exercidos extremos cuidados para evitar a contaminação cruzada de reagentes e portanto PCR ainda tem se limitado bastante ao uso em laboratórios mais bem equipados e especializados. Contudo, é possível conseguir-se a padronização criteriosa da técnica para o diagnóstico seguro e efetivo obedecendo-se os cuidados de determinar as condições ideais a cada sequência a ser amplificada e manutenção de práticas seguras de laboratório. A técnica de PCR poderá estar cada vez mais disponível no diagnóstico de doenças de aves também no Brasil, a medida que sejam feitos maiores investimentos em recursos de infraestrutura e pessoal de laboratório, para viabilizar a disseminação da técnica e um salto de qualidade pela rapidez e

especificidade dos resultados que permite obter. As suas vantagens são muitas, a exemplo por permitir o rápido diagnóstico de organismos fastidiosos, como vírus de aves de difícil ou muito demorado isolamento e identificação através de técnicas clássicas de virologia e por não haver sequer a necessidade de que o vírus a ser identificado esteja viável. Mesmo amostras de vírus inativado ou tecidos fixados tem sido relatados como material para diagnóstico, o que aumenta a biossegurança na manipulação de agentes infecciosos altamente patogênicos ou mesmo exóticos a determinada região. Também, técnicas sorológicas podem ser definidas como métodos de diagnóstico presuntivo, enquanto que a direta identificação do agente infeccioso consiste em um diagnóstico definitivo da ocorrência da infecção. Um exemplo é a alta disseminação do vírus da doença de gumboro e a presença de anticorpos vacinais, onde testes sorológicos convencionais indicam que houve infecção mas não determinam a ocorrência e disseminação do vírus de campo nas aves que em contraste pode ser diagnosticada por PCR.

Um dos muitos exemplos que poderiam também ser dados das vantagens de PCR na área de diagnóstico é a identificação da infecção pelo vírus da anemia das aves, que é um importante agente imunossupressor principalmente em frangos de corte. O diagnóstico do CAV é comumente feito pela soroconversão, através de testes de soroneutralização (Jorgensen, P.H. (1990; Imai e Yuasa, 1990), imunofluorescência (Yuasa e Tezuka, 1985) e teste de ELISA (Todd et al., 1990), ou pelo demorado isolamento do vírus em células MSB-1 (Goryo et al., 1987) ou in vivo em pintos SPF de 1 dia de idade (Bulow, 1991; McNulty, 1991). O CAV não cresce em células de cultivo primário de aves ou em outras células de linhagem normalmente utilizadas para cultivos de vírus (Goryo et al., 1987). Uma das poucas células permissivas ao vírus são células de linhagem linfoblástica como células MDCC-MSB-1 derivadas de tumor do vírus de Marek (Goryo et al., 1987). Porém, por razões ainda desconhecidas algumas amostras do vírus são dificilmente isoladas também em células MSB-1, tais como as amostras isoladas no Brasil ou a amostra CAV-1 isolada nos Estados Unidos (Lucio et al., 1990; Brentano et al., 1991). Diagnósticos mais sensíveis tem sido implantados com sucesso para a detecção do vírus diretamente em aves afetadas através da técnica de PCR, pela amplificação específica do genoma do vírus presente em órgãos ou no soro de aves infectadas, ou detecção do vírus isolado primeiramente em células MSB-1 (Soiné et al., 1993; Tham et al., 1992a; Tham et al., 1992b, Todd et al., 1993).

Técnicas de *hibridização* para verificar produtos de PCR e *hibridização in situ* como exemplo na detecção do vírus da anemia das aves em tecidos de aves infectadas

PCR aliada à técnica de hibridização é outro método que permite confirmar a amplificação correta do genoma viral. O DNA viral amplificado por PCR é transferido a membranas de nitrocelulose e posteriormente hibridizado com sondas de DNA correspondendo à sequências do vírus. Sondas de DNA complementares à sequência a ser detectada podem consistir de pequenos oligonucleotídeos marcados in vitro com determinadas enzimas ou radioisótopos,

ou consistir de sequências maiores do genoma sintetizadas *in vitro* por PCR com a incorporação de nucleotídeos conjugados a enzimas como biotina ou digoxigenina ou nucleotídeos marcados com radioisótopos como P^{32} para a visualização e detecção da reação de hibridização. A hibridização, ou pareamento específico da sonda com o DNA sintetizado por PCR e transferido à membrana indica a especificidade do DNA amplificado. Sondas de DNA também podem ser usadas para detectar a presença de determinado DNA ou RNA em tecidos de aves suspeitas de determinada infecção. Por exemplo, o uso de sondas de DNA para hibridização foi descrita para o diagnóstico específico do vírus da anemia diretamente em tecidos de aves suspeitas da infecção pelo CAV na técnica conhecida como hibridização *in situ* (Noteborn et al., 1992; Allan et al., 1993; Nielsen et al., 1995). Porém, comparada a PCR a técnica de hibridização *in situ* pode ser bastante mais demorada e demanda mais complicada padronização para evitar hibridização com sinais inespecíficos e portanto não tem tido tão ampla aplicação quanto PCR atualmente.

Outro exemplo de detecção viral em tecidos por hibridização *in situ* foi relatada para diagnóstico de hepatite e pancreatite causada por adenovírus. Tecidos fixados em formalina foram desparafinados e digeridos com pepsina e incubados com sondas de DNA de 40 nucleotídeos correspondendo a região do genoma do adenovírus I marcados com digoxigenina. Após a hibridização os tecidos foram incubados com anticorpos anti-digoxigenina, marcados com a enzima fosfatase alcalina, em processo de revelação da reação pela cor na presença do substrato da enzima, em processo bastante semelhante mas muito mais sensível que provas de diagnóstico imunohistoquímicos (Goodwin et. al., 1996).

Uso de técnicas de expressão *in vitro* de proteínas recombinantes para desenvolvimento de testes imunodiagnósticos

Ao conceitualmente normalmente definirmos um gene = uma proteína, sequências de DNA correspondendo a determinado gene uma vez clonadas em vetores especialmente modificados para conter os sinais e elementos necessários à transcrição do mRNA irão subsequentemente sintetizar proteínas ao serem estes vetores transfectados (introduzidos) em células que permitem a sua replicação, transcrição e que fornecem todos elementos necessários à tradução (expressão do gene) em proteínas (tRNA, ribossomos, energia, e complexos de outras proteínas reguladoras de todos estes processos na célula). Há inúmeros sistemas de expressão *in vitro* de proteínas e a grande maioria destes utilizamos anteriormente em trabalho de tese que envolveu a expressão e caracterização de uma das proteínas do reovírus. Esta área é significativamente complexa e variada para poder ser detalhada, mas em resumo pode-se indicar que há basicamente dois sistemas mais usados (FIGURA 3). Um destes é a expressão em organismos procarióticos, como a bactéria *E. coli* que é transfectada com plasmídeos de expressão recombinantes contendo o gene que queremos expressar clonado adjacientemente a um gene para uma proteína conhecida e de fácil purificação. Ao serem expressos estes genes produz-se uma mesma proteína, chamada de fusão por consistir da expressão de ambos os genes e

sua fusão na mesma proteína. A presença da proteína de fusão conhecida facilita a purificação contra um substrato conhecido que liga-se a esta proteína. A vantagem deste sistema é a significativa quantidade de proteína expressa e a eficaz purificação que permite, mas tem a desvantagem não introduzir modificações características às proteínas eucarióticas, tais como glicosilação ou mesmo manutenção da correta estrutura terciária. Mesmo assim, dependendo da proteína que se quer expressar este pode ser um excelente sistema, por exemplo a ser aplicado para a expressão de proteínas de nucleocapsídeo viral, tais como dos paramyxovírus como o vírus da doença de Newcastle ou vírus influenza, que não são proteínas glicosiladas e normalmente são expressas em altos níveis pelo vírus. O uso de métodos para detectar proteínas de nucleocapsídeo já foi demonstrado por exemplo em testes de ELISA com anticorpos monoclonais de captura para detecção de proteínas de nucleocapsídeo. Mas, a expressão *in vitro* de proteínas pode às vezes ser mais rápida que todo o processo de desenvolvimento e caracterização de anticorpos monoclonais e portanto pode ser considerada um método viável também para implantação de testes imunodiagnósticos. Proteínas expressas em *E. coli* podem muitas vezes ser altamente purificadas em altas quantidades e assim podem ser utilizadas para produção de antígenos purificados do vírus para testes de ELISA.

Outro exemplo de sistema de expressão *in vitro* de proteínas é o uso de vírus como vetores, tais como baculovírus. Na nossa experiência é um excelente sistema que permitiu expressar por exemplo uma proteína autêntica do reovírus, que pode ser parcialmente purificada por imunoafinidade e manteve sua atividade biológica. Um exemplo em vírus aviários é também a expressão da proteína de nucleocapsídeo do vírus de Newcastle (VDN), onde a proteína N expressa por baculovírus foi utilizada como antígeno em teste de ELISA para detecção de anticorpos ao VDN (Errington et al., 1995).

Bibliografia

- Allan, G.M., Smyth, J.A., Todd, D. e McNulty, M.S. (1993). In situ hybridization for the detection of chicken anemia virus in formalin-fixed, paraffin-embedded sections. *Avian Dis.* 37:177-182.
- Andreasen, J.R., Jackwood, M.W. e Hilt, D. (1991). Polymerase chain reaction amplification of the genome of infectious bronchitis virus. *Avian Dis.* 35: 216-220.
- Brentano, L., Mores, N., Wentz, I., Candratilleke, D. e Schat, K. (1991). Isolation and identification of chicken infectious anemia virus in Brazil. *Avian Dis.* 5:793-800.
- Bulow, Van V. (1991). Infectious anemia. Em: *Diseases of poultry*, 9o ed, B.W. Calenk, H.J. Barnes, C.W. Beard, W.M. Reid e H.W. Yoder, editores. Pg 690-699.
- Cavanagh, D., Ellis, M.M. e Cook, J.K.A. (1997). Relationship between sequence variation in the S1 spike protein of infectious bronchitis virus and the extent of cross protection *in vivo*. *Avian Pathol.* 26: 63-74.

- Cavanagh, D., Davis, P.J., Cook, J.K.A., Li, D., Kant, A. e Koch, G. (1992). Location of the amino acid differences in the S1 spike glycoprotein subunit of closely related serotypes of infectious bronchitis virus. *Avian Pathol.* 21: 33-43.
- Collins, M.S., Bashirudin, J.B. e Alexander, D.J. (1993). Deduced amino acid sequence of the fusion protein cleavage site of newcastle disease virus showing variation in antigenicity and pathogenicity. *Arch. Virol.* 128:363-370.
- Cook, J. (1997). Bronquite infecciosa aviária: situação mundial e distribuição de sorotipos. Anais, pg 13-27. Simpósio Sobre Sanidade Avícola, FACTA (Fundação Apinco de Ciência e Tecnologia Avícola), pg 13-27. Maio 97, São Paulo - SP.
- Davidson, I., Borovskaya, A., Perl, S. e Malkinson, M. (1995). Use of the polymerase chain reaction for the diagnosis of natural infection of chickens and turkeys with Marek's disease virus and reticuloendotheliosis virus. *Avian Pathol.* 24: 69-94.
- Errington, W., Steward, M e Emmerson, P.T. (1995). A diagnostic immunoassay for Newcastle disease virus based on the nucleocapsid protein expressed by a recombinant baculovirus.
- Falcone, E., Dámore, E., Di Trani, L., Sili, A. e Tolin, M. (1997). Rapid diagnosis of infectious bronchitis virus by the polymerase chain reaction. *J. Virol. Meth.* 64: 125-130.
- Fields (1996). Em: Fields Virology, B.N. Fields D.M. Knipe e P. Howley et al., (editores) Virology, Lippincot-Raven Press, Philadelphia, EUA.
- Goodwin et al., 1996. *Avian Dis.* 40: 828-831.
- Goryo, M., Suwa, T., Matsumoto, S., Umemura, T. e Itakura, C. (1987). Serial propagation and purification of chicken anemia agent in MDCC-MSB1 cell line. *Avian Pathol.* 16:149-163.
- Hofstadt, M.S. (1981). Cross immunity in chickens using seven isolates of avian infectious bronchitis virus. *Avian Dis.* 25: 650-654.
- Imai, K. e Yuasa, N. (1990). Development of a microtest method for serological and virological examination of chicken anemia agent. *Jp. J. Vet. Sci.* 52(4):873-875.
- Innis, M. A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J. (1990). editores em: PCR protocols. A guide to methods and applications. Academic Press Inc. New York, USA.
- Jackwood e Jackwood (1997). *Avian Dis.* 41: 97-104.
- Jorgensen, P.H. (1990). A microscale serum neutralization test for the detection and titration of antibodies to chicken anemia agent - prevalence of antibodies in Danish chickens. *Avian Pathol.* 19:583-593.
- Kwon, H.M., Jackwood, M.W., Gelb Jr., J. (1993a). Differentiation of infectious bronchitis virus serotypes using polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. *Avian dis.* 37: 124-202.

- Kwon, H.M., Jackwood, M.W., Brown, T.P. e Hilt, D. (1993b). Polymerase chain reaction and a biotin labeled DNA probe for detection of infectious bronchitis virus in chickens. *Avian Dis.* 37: 149-156.
- Lin, Z., Kato, A., Kudou, Y. e Ueda, S. (1991a). A new typing method for the avian infectious bronchitis virus using polymerase chain reaction and restriction enzyme fragment length polymorphism. *Arch. Virol.* 116: 19-31.
- Lin, Z., Kato, A., Kudou, Y., Umeda, K. e Ueda, S. (1991b). Typing of recent infectious bronchitis isolates causing nephritis in chicken. *Arch. Virol.* 120: 145-149.
- Lucio, B.A., Schat, K.A. and Shivaprasad, H.L. (1990). Identification of the chicken anemia agent, reproduction of the disease, and serological survey in the United States. *Avian Dis.* 34:146-153.
- Marin, M.C., Villegas, P., Bennet, J.D. e Seal, B.S. (1996). Virus characterization and sequence of the fusion protein gene cleavage site of recent Newcastle disease virus isolates from southeastern Puerto Rico. *Avian Dis.* 40:382-390.
- McNulty, M.S. (1991). Chicken anemia agent: a review. *Avian Pathology*, 20:187-203.
- Nagai, Y. e Klenk, H.T. (1977). Activation of precursors of both glycoproteins of Newcastle disease virus by proteolytic cleavage. *Virology*. 77:125-134.
- Nielsen, O.L., Jorgensen, P.H., Bisgaard, M. e Alexandersen, S. (1995). In situ hybridization for the detection of chicken anemia virus in experimentally-induced infection and field outbreaks. *Avian Pathol.* 24:149-155).
- Noteborn, M.H.M., Verschueren, A.J., van Roozelaar, D.J., Veldkemp, S., van Der Eb, A.J. e De boer, G.F. (1992). Detection of chicken anemia virus by DNA hybridization and polymerase chain reaction. *Avian Pathol.* 21:107-118.
- Pordány, A.B., Wehmann, E., Herczeg, J., Belák, S. e Lomniczi, B. (1996). Identification and grouping of Newcastle disease virus strains by restriction site analysis of a region of the F gene.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. e Maniatis, T. *Em: Molecular cloning, a laboratory manual*. 2ª edição. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, Estados Unidos.
- Seal, B.S., King, D.J. e Bennet, J.D. (1995). Characterization of Newcastle disease virus isolates by reverse transcription PCR coupled to direct nucleotide sequencing and development of sequence database for pathotype prediction and molecular epidemiological analysis. *J. Clin. Microbiol.* 35:2624-2630.
- Soiné, C., Watson, S.K., Ribycki, E., Lucio, B., Nordgreen, R.M., Parrish, C.R e Schat, K.A. (1993). Determination of the detection limit of the polymerase chain reaction for chicken infectious anemia virus. *Avian Dis.* 37:467-476.
- Tham, K.M. e Stanislawek, W.D. (1992a). Polymerase chain reaction amplification for the detection of chicken anemia virus DNA in tissues and sera. *Avian Dis.* 36:1000-1006.
- Tham, K.M. e Stanislawek, W.D. (1992b). Detection of chicken infectious anemia agent DNA sequences by the polymerase chain reaction. *Arch. Virol.* 127:245-255.

- Todd, D., Mackie, D.P., Mawhinney, K.A., Connor, T.J., McNeilly, F. e McNulty, M.S. (1990). Development of an enzyme-linked immunosorbent assay to detect serum antibody to chicken anemia agent. *Avian Dis.* 34:359-363.
- Todd, D., Mawhinney, K.A. e McNulty, S. (1992). Detection and differentiation of chicken anemia virus isolates by using the polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 30(7):1661-1666.
- Yuasa N. e Tezuka, H. (1985). Survey of antibodies against chicken anemia agent (CAA) by an indirect immunofluorescent antibody technique in breeder flocks and Japan. *Avian Pathol.* 14:521-530.

DNA

5'P indica a ligação fosfato (P) na posição 5 do anel da ribose

3'P indica a ligação fosfato (P) na posição 3 do anel da ribose

A, T, C, G indicam os nucleotídeos ligados à ribose

// Indicam as pontes de hidrogênio entre as duas fitas de DNA

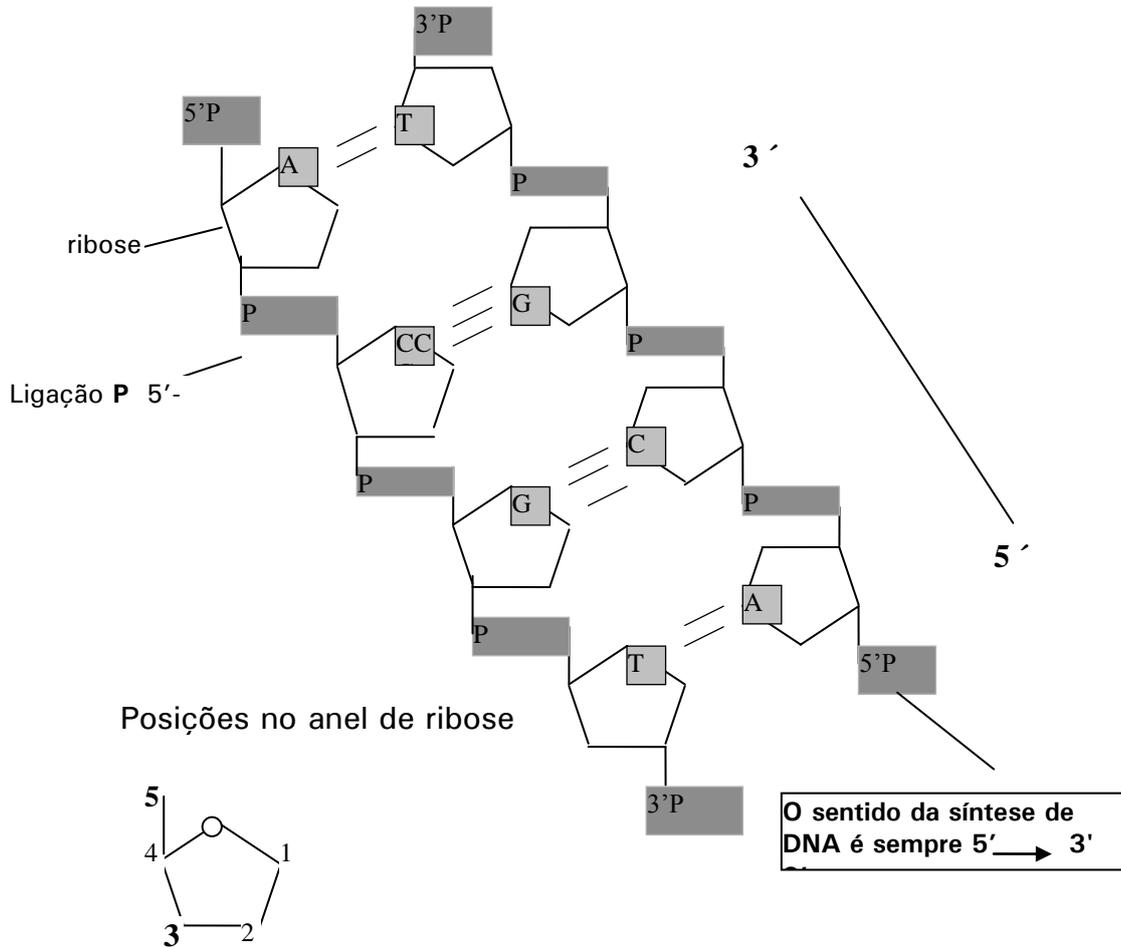


FIG. 1 - Estrutura (esquemática) do DNA.

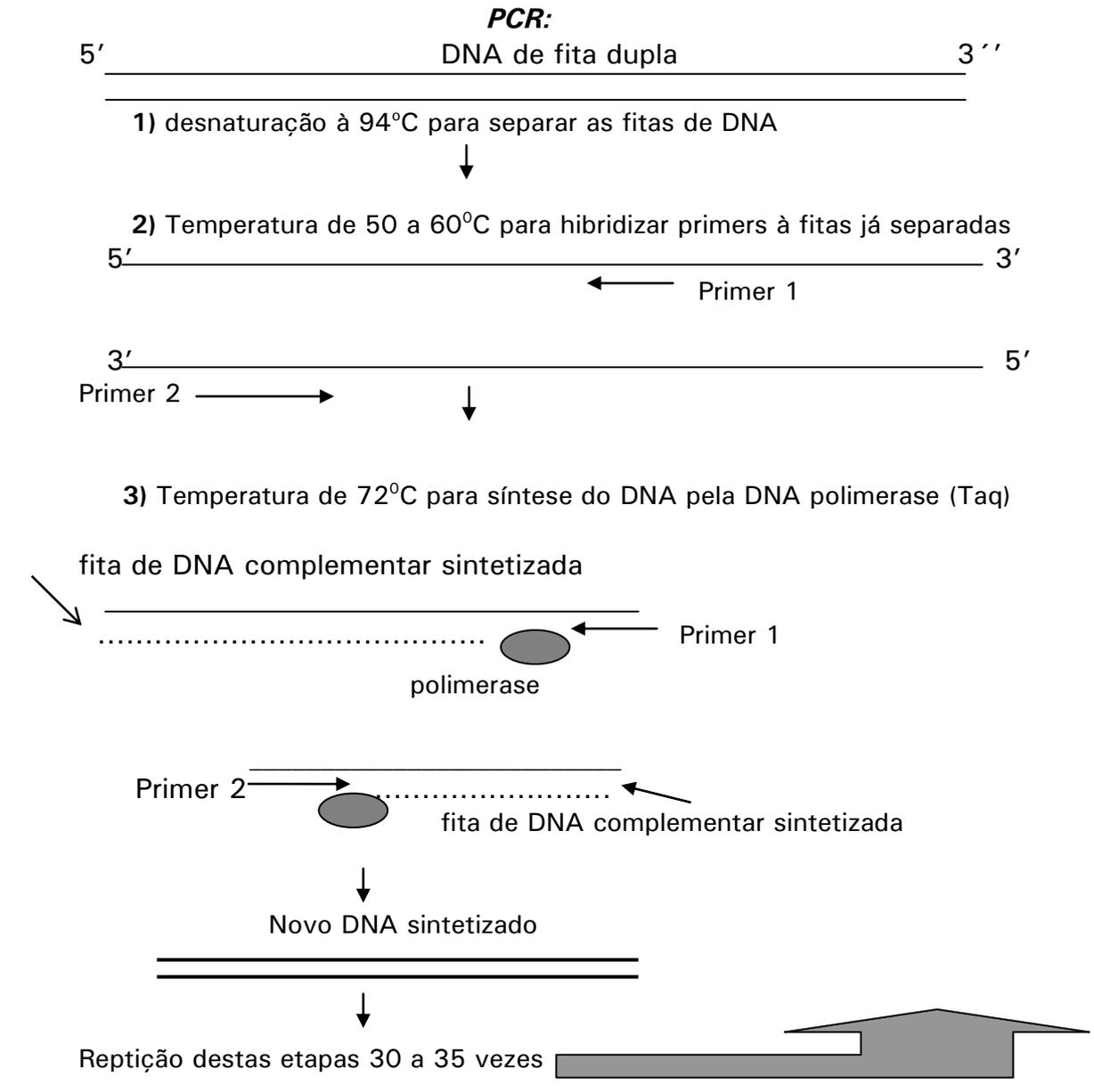


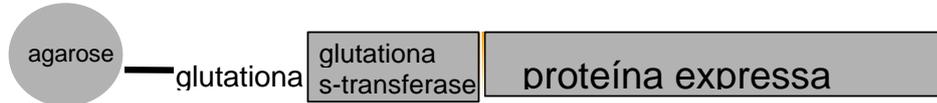
FIG. 2 - Diagrama da reação de PCR.

FIG. 3

SISTEMAS DE EXPRESSÃO *IN VITRO* DE PROTEÍNAS

PROCARIÓTICO: expressão em *E. coli* como proteína de fusão

Vantagens: - altos níveis de expressão
- purificação por afinidade via proteína de fusão (glut-S-transf.)



Desvantagens: - proteína usualmente insolúvel
- proteína pode não formar estrut. terciária correta
- não há modificações pós-tradução (glicosilação)

EUCARIÓTICO: - Tradução in vitro (ex. reticulócitos de coelho)
- Vetores eucarióticos de expressão transfectados em células mamíferas
- Vírus recombinantes (ex. baculovirus)

Vantagens: - expressão de proteínas em forma "nativa"

Desvantagens: - frequentes baixos níveis de expressão
- purificação pode ser mais complicada

FALHAS DE VACINAÇÃO: O PROBLEMA DAS CEPAS MUTANTES

Alberto Bernardino

Fort Dodge Saúde Animal Ltda., Assistência Técnica de Avicultura

Introdução

Muitos fatores afetam o sucesso da vacinação, variando desde a qualidade da vacina utilizada até o método e as circunstâncias nas quais ela foi administrada. Estes fatores serão discutidos de uma maneira geral, seguidos por exemplos relacionados às diferentes vacinas

1 - Problemas em relação à vacina

1.a- Desempenho superestimado

Não se deve esperar de nenhuma vacina uma proteção completa de todos os indivíduos vacinados contra uma doença, mesmo em condições ideais. Devemos levar em conta os riscos associados ao processo de vacinação e as variações individuais de cada organismo vacinado. A relação custo/benefício deve ser calculada mesmo quando a proteção se restringir a alguns efeitos da doença em relação à porcentagem de aves vacinadas. Contudo, nestes casos o desenvolvimento de produtos mais eficazes deve ser uma meta constante dos produtores de vacinas.

1.b- Massa antigênica inadequada

Devemos sempre nos certificar de que o título da vacina por dose aplicada esteja sempre dentro dos padrões mínimos necessários para a proteção da ave. Uma vacina produzida e testada por métodos não confiáveis deixa dúvida quanto a sua verdadeira massa antigênica.

A vacina pode deteriorar após a sua fabricação e a quantidade de antígeno poderá ser instável desde a sua fabricação até o seu vencimento, sendo assim, uma prova de estabilidade deve ser realizada para a liberação do produto. Esta estabilidade pode ser afetada pelo meio em que a vacina é produzida e liofilizada e também pela quantidade de umidade residual nos frascos. O processo de produção assim como a qualidade dos frascos e rolhas de borracha utilizados devem ser controlados. Para as vacinas oleosas a quebra da emulsão poderá ocorrer se as condições de estocagem forem inadequadas ou métodos de produção e/ou proporção dos componentes forem errôneos. É desejável que os produtos tenham certa resistência temporária mesmo frente a condições inadequadas de armazenamento.

Os diluentes utilizados para a reconstituição dos produtos devem garantir a estabilidade dos mesmos durante o tempo de uso, por isso é essencial a inclusão de estabilizantes para uma melhor performance.

1.c- Baixa imunogenicidade

É essencial demonstrar através de testes de laboratório e sempre que possível de campo que a vacina irá conferir proteção. Podemos esperar problemas quando a proteção satisfatória não for obtida nos testes de laboratório ou surtos inesperados da doença ocorrerem no campo. Por tanto devemos padronizar testes de titulação e eficácia das vacinas desde sua semente até o produto final a ser utilizado pelos avicultores.

As cepas vacinais - vacinas vivas- não devem ser muito atenuadas no sentido de se conseguir um produto com menor ou nenhuma reação vacinal pois irão perder cada vez mais seu potencial imunogênico. Também devemos respeitar o número de passagens de uma semente vacinal, pois ao mesmo tempo em que ganhamos título estamos perdendo imunogenicidade.

Alguns métodos de vacinação se baseiam em vacinar parte do lote ou mesmo no uso do fracionamento de doses, para que se obtenha sucesso nestas práticas é essencial que a cepa vacinal utilizada retenha uma capacidade de invasão suficiente que estimule uma boa resposta imune nas ave vacinadas diretamente e naquelas que se vacinaram por contato.

1.d- Variação antigênica

Dentre os diferentes organismos infecciosos há uma grande variação antigênica, sendo que algumas destas variantes surgem naturalmente num processo de evolução e adaptação enquanto outras podem ser "induzidas" pelo homem através de modificações do meio ambiente forçando assim o aparecimento das formas mais resistentes às novas condições, como exemplo podemos citar principalmente o grande número de variantes dos vírus de Gumboro e de Bronquite Aviária existentes atualmente.

O ideal para as vacinas e terem um amplo espectro de proteção e para isso poderão conter um ou mais organismos em sua composição. Normalmente o processo de clonagem torna uma vacina mais específica e menos abrangente para uma determinada doença. Em certos casos onde essas variantes aparecem em áreas restritas, a produção de vacinas especiais poderá ser uma solução.

As falhas vacinais devido ao problema dessas cepas mutantes podem ocorrer e para solucionar precisamos de um diagnóstico preciso para que se possa trabalhar em cima de vacinas mais eficazes.

2 - Problemas com a dose vacinal

2.1- Dose insuficiente

São muito comuns as falhas vacinais referentes ao manuseio inadequado das vacinas. A equipe envolvida no preparo (diluição, etc.) e vacinação deve ser

treinada e estar atenta ao processo de vacinação. As vacinas devem ser transportadas e armazenadas de acordo com as recomendações do fabricante e usadas até a data do vencimento. O calor exerce um efeito negativo, assim como a luz solar, diminuindo o título vacinal. O congelamento de vacinas inativadas oleosas provoca a quebra da emulsão e no caso de vacinas vivas pode afetar as rolhas de borracha permitindo a entrada de umidade no frasco e com isso estragá-las.

No caso de fracionamento de doses devemos nos assegurar do uso de um título mínimo indicado para a proteção das aves

A reconstituição da vacina deverá ser feita com o diluente apropriado e verificarmos o enxague dos frascos ("segunda lavagem"). Deve-se evitar a mistura de vacinas com outros produtos (antibióticos, etc.). O equipamento usado para a vacinação deve estar limpo, desinfetado e sem resíduos de desinfetantes ou detergentes. As dificuldades de reconstituição da vacina congelada de Marek foram ressaltadas por Siegmann *et al.*(2).

Falhas neste processo podem permitir o crescimento bacteriano o que teria um efeito deletério no antígeno.

Vacinas usadas na via água devem ser feitas de maneira a proporcionar uma chance a todos indivíduos entrarem em contato com a solução vacinal durante um período determinado. O uso de medicamentos que estimulem a sede poderá ser uma opção (3). O uso de corantes específicos para vacinação nos dá um resultado mais exato sobre o processo realizado (4). O leite em pó desnatado promove uma maior sobrevivência do vírus vacinal mesmo quando ainda existam traços de cloro na água utilizada (5).

Quando a administração for por spray o tipo de equipamento deve ser selecionado de acordo com o tamanho de partícula desejado. Os equipamentos elétricos não devem aquecer a vacina. O spray deve ser direcionado por cima da cabeça das aves.

Nas vacinas injetáveis todo equipamento deve ser checado; seringas reguladas para uma dose correta; agulhas com ponta e desinfetadas e a velocidade de vacinação deve permitir a inoculação adequada do produto no local correto.

3 - Problemas com o hospedeiro

3.1 - Inibição por anticorpos

Os anticorpos podem inibir ou atrasar a resposta às vacinações. A imunidade passiva interfere na vacinação de Marek e deve ser levada em conta para o fracionamento de doses. Levando-se em conta o coeficiente de variação podemos melhor programar a primo-vacinação e os reforços subsequentes para a maioria das vacinas. Devemos estar atentos para o período de susceptibilidade onde os anticorpos residuais não são suficientes para a proteção e a resposta ativa vacinal ainda não se formou completamente, pois nas condições de alto risco o agente da doença irá levar vantagem.

Num programa de múltiplas doses o intervalo entre as mesmas deverá ser bem planejado para uma resposta estável e uniforme.

3.2 - Alteração imunológica

Vários fatores podem interferir levando a uma baixa resposta imunológica. A imunocompetência da ave aumenta nas primeiras semanas de vida. Pintos de 1 dia podem não produzir resposta suficiente a um estímulo vacinal, porém em casos de alto risco da doença se faz necessária a vacinação nesta idade. O efeito dos extremos de temperatura, do impacto de estresse social e outros fatores ambientais têm sido estudados com maior interesse (6), e evitando-se estes fatores podemos melhorar a resposta às vacinações. Uma variedade de substâncias possuem um efeito adverso no sistema imune.

Como agentes infecciosos temos o vírus de Gumboro; Marek; Leucose (7, 8); Reticuloendoteliose(9); Anemia e Reovírus como agentes imunossupressores afetando diretamente o tecido linfóide da ave (e mielóide, no caso da Reticuloendoteliose) prejudicando a resposta vacinal.

Por outro lado, o estímulo não específico da resposta imune é um atrativo à vacinação. Várias substâncias são conhecidas por apresentarem tais efeitos mas o estudo do seu uso em aves não tem sido tão explorado. A incorporação de adjuvantes nas vacinas inativadas é prática comum e as emulsões oleosas têm superado em resultados o uso de gel de alumínio. O uso de tetramisol mostrou uma melhora nos títulos de aves vacinadas com Newcastle (10) e recuperou os títulos de anticorpos em perus imunologicamente suprimidos com antibióticos (11). Soppi *et al.* (12) mostrou que o tratamento com levamisole aumentou as respostas celulares e a produção de anticorpos, mas apenas para antígenos timo-dependentes

3.3 - Efeitos genéticos

Em alguns casos é sabido que a constituição genética de determinada linhagem tem um efeito marcante na sua susceptibilidade a uma doença, como por exemplo Leucose Aviária e Marek e um efeito similar pode ser visto na resposta à vacinação de Marek. Além disso, certas linhagens de aves tem uma capacidade superior de resposta imunológica em geral

4 - Outros problemas

4.1 - Superdesafio

Existe uma tendência a se prestar mais atenção no processo de vacinação, porém cada vez mais não se está dando a atenção devida aos processos de higiene (salvo raras exceções). O futuro caminha para biossegurança e prevenção, portanto pontos como desinfecção na granja (em geral); limpeza dos galpões e vazio sanitário; evitar sempre que possível criação em múltiplas idades e o contato de estranhos na granja são essenciais para se evitar um ambiente propício à disseminação de agentes infecciosos e até a emergência de agentes de virulência excepcional. Estes agentes são capazes de quebrar uma proteção adequada normal o que levaria a aves parcialmente protegidas por uma vacina. A

solução seria a evolução de cepas vacinais com maior espectro ou a inclusão destes agentes numa vacina.

4.2 - Prevenção apenas dos sinais clínicos

Em muitos casos, vacinas vivas ou inativadas não previnem a multiplicação e disseminação do agente da doença embora possa reduzi-las. O principal efeito é a eliminação ou melhora dos sinais clínicos da doença e o seu efeito adverso na produção.

Portanto estas aves vacinadas continuam sendo carreadores da doença e se discute se as aves parcialmente protegidas não seriam responsáveis pela seleção destas cepas mais fortes.

4.3 - Diagnóstico errôneo

Em alguns poucos casos, o uso de técnicas mais apuradas de diagnóstico se faz necessário para determinar a extensão de uma doença. Por exemplo, Marek deve ser distinguida de Gumboro ou mesmo Leucose e outras condições antes de uma falha vacinal ser proclamada.

4.4 - Falta de segurança

Uma breve consideração deve ser feita aqui para a possibilidade de surtos da doença logo após um processo de vacinação, e não devido a uma falha de proteção mas sim devido a vacina ter causado o problema. Um erro no processo de preparo da vacina pode levar a incorporação ou contaminação por outro agente virulento ou toxinas. Nesses casos é através do controle de qualidade das empresas produtoras, um teste de patógenos estranhos, que evitaríamos tais fatos.

O próprio vírus vacinal pode causar uma forma de doença se usado incorretamente:

- Aplicação por aerosol, com partículas finas, na presença de infecções intercorrentes levaria a um problema respiratório;
- Imunossupressão pode exacerbar reações vacinais;
- O uso de cepas vacinais mais fortes na primo-vacinação das aves;
- Possibilidade de reversão à virulência.

5 - Considerações

Dentre os vírus aviários devemos dar atenção especial ao vírus de Gumboro e ao vírus da Bronquite Infecciosa no que se refere ao problema das cepas mutantes. Esses dois vírus, em especial o de Bronquite devido a sua conformação antigênica têm maior facilidade para recombinações e com isso a formação de variantes. A pressão ambiental exercida pelo homem quando da criação intensiva de aves num espaço restrito, vários lotes seguidos e sem troca de cama (como o exemplo de Delmarva-USA onde se efetua uma única troca de cama a cada 2 ou 3 anos) é o fator principal para o surgimento de cepas

recombinantes. Estas por sua vez podem ser patogênicas ou não afetando com maior ou menor intensidade a resistência da ave.

O fato de se introduzirem vacinas de maneira clandestina também contribui, pois temos a inclusão de cepas variantes não permitidas legalmente e que podem se disseminar causando quebras no programa de vacinação contribuindo também para a formação de novos mutantes.

Atualmente tem sido diagnosticados pela técnica de RT-PCR (13) diferentes padrões de vírus de Gumboro e de Bronquite no Brasil que poderão ou não ser responsáveis por casos de falhas vacinais em diferentes regiões do país.

Sabemos que a resposta completa para qualquer complexo antigênico, seja ele vírus ou bactéria, é a soma de muitas respostas diferentes aos vários antígenos determinantes do organismo em questão. De fato uma bactéria pode estimular milhares de diferentes e independentes respostas imunes. A habilidade de montar uma resposta imune para cada epitopo individual depende de vários fatores. Uma vacina de amplo espectro pode ter melhor resultado que uma vacina clonada e um determinado programa de vacinação poderá ser modificado no sentido de ampliar uma resposta imune. Desta forma poderemos controlar por imunidade cruzada várias recombinações mutantes, porém se não for possível, uma saída emergencial seria a inclusão de novos sorotipos e/ou cepas nas vacinas utilizadas, desde que se prove a eficácia das mesmas.

6 - Conclusão

A investigação das falhas vacinais no campo é bastante complicada devido à dificuldade em se obter informações suficientes e amostras para se conduzir um exame. Às vezes não é possível identificar a cepa vacinal ou a partida da vacina utilizada outras vezes não se tem acesso ao manejo das mesmas e o problema pode estar nesta etapa. Todas as vacinas devem passar por um rigoroso controle de qualidade, para se evitar introdução, de produtos ineficazes ou contaminados, no mercado avícola.

Quando ocorre uma falha vacinal, a inclinação natural é de se culpar a vacina. Esta consideração é válida, porém devemos nos lembrar de investigar os outros fatores para confirmarmos a verdadeira causa.

Bibliografia

- Thornton, D. H. (1981). *Avian Immunology*, 1: 411-428.
Siegmann, O., Kaleta, E. F. and Schindler, P. (1980). *Avian Path.*, 9: 21-32.
McFerran, J. B., Young, J. A., Clarke, J. K. and Wright, C. L. (1972). *Vet. Rec.*, 90: 527-530.
Grieve, D. (1992). *Industria Avícola*, Maio 1994: 18-20.
Gentry, R. F. and Braune, M. O. (1972). *Poultry Science*, 56: 1609-1615.
Cheville, N. F. (1979). *Avian Disease*, 23: 308-314.
Dent, P. B. (1972). *Progr. Med. Virol.*, 14: 1-35.
Payne, L. N. (1970). *Proc Roy. Soc. Med.*, 63: 16-19.
Olson, L. D. (1967). *Am. J. vet. Res.*, 28: 1501-1507.

- Kulkarny, V. B., Mulbagal, A. N., Paranjape, V. L., Khot, J. B. and Manda, A. V. (1973). Indian Vet. Journal, 50: 225-227.
- Panigraphy, B., Grumbles, L. C., Millar, D., Naqi, S. A. and Hall, C. F. (1979). Avian Dis., 23: 401-408.
- Soppl, E., Lasilla, O., Viljanen, M. K., Lehtonen, O. P. and Eskola, J. (1979). Clin. Exp. Immunol., 38: 609-614 .
- Lunge, V. R., Fonseca, A. S. K., Verdi Filho, R., Oliveira, C., Chiaramonte, V. and Ikuta, N. (1997). Trabalhos de Pesq. APINCO-97: 46.

USE OF ENERGY AND WATER IN PROCESSING PLANTS

R.W.A.W. Mulder

DLO Institute for Animal Science and Health, P.º Box 65, 8200 AB Lelystad,
The Netherlands

Introduction

Artisan slaughtering may have existed for many thousands of year. In the early years of poultry processing products depending on the way defeathering and opening of the carcasses were produced and marketed under names as "New York Dressed" (defeathered, but not eviscerated), "Effilee" (defeathered and with removed intestines) and "Evisceree" (defeathered and completely eviscerated). Also now, in 1997, these artisan type of products are available on some local markets. On these products the upper epidermal layer of the skin is intact after scalding and defeathering. This is due to the low scalding (<54 Celsius) temperature applied. The presence of the epidermal layer is important with respect to shelf life. Products which were only defeathered and not opened showed a longer shelf life. Another reason for a prolonged shelf life is the minimal use of water during that type of production leading to the name "dry" slaughtered products, opposite to "wet" slaughtered products where water and ice chilling was used. Table 1 shows the developments in poultry processing during the last century.

The more industrialized form of poultry processing started with the introduction of transport chains with shackles and was continued through the development of scald tanks, plucking equipment and equipment for the mechanical evisceration of carcasses. Due to these developments it became possible the hygienic quality and shelf life of the products as a whole. At the same time more time more water and energy had to be used. Water to scald the birds and to chill them after evisceration and to remove the feathers after plucking. Energy because of the transport chains, scald tanks and plucking equipment, later followed by continuous evisceration procedures. More industrialization resulted in the application of high scald temperatures. At temperatures around 58 Celsius the upper epidermal layer of the skin is removed during defeathering and therefore poultry products treated in this way could not be marketed fresh as the absence of this layer causes discoloration and drying out of the products, but instead were sold deep-frozen. In the years 1970-1990 European processors changed from deep-frozen water chilled production to fresh air and/or evaporative chilled production. This change was incurred by an increasing consumer demand for fresh products. The change resulted in several consequences for the processing of poultry:

1. Refrigerated products need a lower scald temperature, another arrangement of pluckers as well as another type of chilling (although all processes can be applied to fresh, refrigerated products, the use of the very economical, but

from a water uptake point of view very questionable, immersion chilling in water, this treatment is replaced by air-chilling or evaporative air-chilling).

2. Refrigerated products need another packaging technology

From the changes mentioned it is evident that aspects of energy and water usage have gained importance. Shelf life of products is an important subject to processors and retailers, however, the government has put some extra burden on the poultry production chain in relation to human pathogenic bacteria present on poultry products. Human food-borne disease and therefore product safety has become more important. In the European Union this has resulted in the mandatory use of a washing (and disinfection) process for used transport crates or containers and eviscerated carcass (With specification of litres water to be used per kg of product) prior to chilling. In this respect the use of cleaning and disinfection procedures in the processing plant during and after processing hours should also be mentioned.

Hygiene and environment

Modern Poultry processing implies a high rate of throughput, Slaughter capacities of more than 6000 birds per hour are used and can only be realized with complete mechanized and automated processing lines. Depending on the degree of automation, the individual processing steps may or may not involve human labour. From a processing point of view several steps are critical in controlling the microbiological contamination of products and equipment. These critical steps include the conditions of catching, transportation and holding before slaughtering. These conditions are of enormous influence on the contamination of feathers and skin of the birds with fecal material. Cleaning and disinfection of transport crates or containers after each journey is therefore necessary and should be optimized in terms of use of energy, water and detergents. In terms of the Hazard

Analysis Critical Control Point concepts also the steps in processing following transport, scalding, defeathering and evisceration are considered critical. There are developments in poultry processing which influence the hygienic quality process and consequently the products. Developments such as multistage cleaning and scalding followed by defeathering and combined scalding and defeathering have reduced microbial counts for both carcasses and scald water. The application of this equipment also reduces the possibilities for cross contamination. Aspects of energy and water conservation are included in these developments. Developments in new evisceration technology and the automatic cleaning and disinfection of evisceration equipment also have a considerable impact on the microbiological quality of products.

Environment and hygiene

A Way of measuring the effect of processing on environment is the calculation of the total use of energy (electric, gas or oil) needed to produce poultry products. In relation to hygiene the use of water is a very important factor. Generally speaking, water is used as process/chill water, water is used to

clean and wash carcasses and to disinfect processing equipment and water is used as transport medium. The use of process water during poultry processing can be diminished by recirculation of water through application of closed systems. The feasibility of these systems together with its effect on the hygienic quality of the recirculated re-usable water will be discussed further.

Energy and water use in poultry processing

In poultry processing plants total energy use and the different energy sources used vary enormously. Depending on the execution of the different processes, production capacity and products to be produced. The change to fresh products, brought a decrease in energy costs : chilling and distribution of fresh products are less energy consuming than freezing and marketing of frozen products. Table 2 gives an estimate of the use of energy in Dutch poultry processing plants used for the production of fresh and frozen poultry products. It is logical that there exists a large variety in use of the different energy sources (electricity, gas or oil). The total usage however, with variations between 0,90 to 3,00 MJ/kg product, indicate that possibilities exist for a decrease in energy use. To produce deep frozen products approximately 30% more energy costs have to be made. Another observation is that in poultry processing plants more energy is needed for indirect purposes, (cleaning, heating and cooling of rooms etc, offal transport, offal water treatment etc) than for the direct production processes.

Table 3 gives some data for energy and water usage in different conditions in different plants.

It is evident that reductions in energy and water usage is possible during the processing of poultry. Examples of this will be presented. Hygienic aspects of processing, but also labour aspects, often are the reason for the high energy or water usage.

During this presentation examples will be discussed in relation to washing of transport crates, scalding and defeathering multistage scalding, recirculation of water and defeathering, evisceration, cleaning in place and the use of the inside/outside birdwashes.

With regard to water the re-use of this water is under discussion. Examples will be presented which show that not all water can be re-used without extremely expensive treatments. In some cases however there is no reason why not to re-use process water.

Table 1. Developments in poultry processing

1885	Transpor chain with shackles	Closed carcasses	Manual on the line
1905	Sticking/dry plucking air-chilling		
1915	Batteries with manure removal		
1925	Low scalding/in line scalding Rubber plucking fingers		
1935	Electric stunning/in line plucker	Eviscerated "cold"	Mechanisation of slaughter line
1945	High scalding/chilling in ice	Eviscerated "Warm"	
1955	Rotating pluckers/ Immersion chilling		
1965	Automatic evisceration		Mechanisation of evisceration line
1975	Evaporative chilling		Automation
1985	Air agitated multistage scalding	Aspects of water and Energy conservation	
1993	New evisceration technology		
1995	Gas stunning		
1997	Automatic hanging		

Table 2. Estimated use of energy in Dutch poultry processing

Area	Energy use (mJ/kg)	
	Fresh	Frozen
Arrival and slaughter	0,15	0,20
Evisceration	< 0,01	< 0,01
Chilling/freezing	0,20	0,50
Sorting, weighing, packaging	0,02	0,02
Cut-up	0,01	0,01
Storage	0,01	0,10
Additional (transport of offals, cleaning, Heating, lighting etc)	0,90	0,90
Total	1,29	1,73

Table 3. Examples of electrical energy and water usage in poultry slaughterhouses

	Capacity (Birds/hour)	Live weight	Total electrical (kW)	Water consumption (m ³ /hour)
Ex. 1 Broilers				
Defeathering	8000	1200-2500	90	10
Evisceration (including inside/ outside washer)	8000	1200-2500	10	14
Ex. 2 Broilers				
Defeathering	8000	1800	85	6
Evisceration (including inside/ outside washer)	8000	1800	25	19
Ex. 3 Ducks				
Defeathering	5000	2000-4000	235	7-12
Evisceration (including inside/ outside washer)	5000	2000-4000	16	13-22

COMMERCIAL IMPLEMENTATION OF POSTMORTEM ELECTRICAL STIMULATION

Dr. Alan Sams

Department of Poultry Science
Texas A&M University

Introduction

During recent decades, consumers have shifted their preference away from purchasing poultry as whole carcasses toward purchasing it as boneless meat and as further processed products. This trend reflects a willingness by the consumer to pay for the convenience and minimal waste associated with boneless meat. However, along with the willingness to pay a premium price comes a demand for maximum quality and consistency. With boneless meat, tenderness is a primary quality consideration.

In response to the continually increasing demand for boneless broiler breast meat, processors are constantly searching for methods to increase the efficiency of production. One such emerging technology is the postmortem electrical stimulation of broiler carcasses to accelerate the production of boneless meat by reducing or eliminating the need for the costly aging process. Electrical stimulation is not a new technique but has recently been adapted for use at commercial line speeds in broiler processing plants. This review will explore the justification for electrical stimulation, the mechanism by which it is thought to result in improved tenderness, and the current status of its commercial implementation. Postmortem electrical stimulation is a rather simple technique requiring uncomplicated equipment. However, the commercial implementation has raised a number of important issues regarding aging and tenderness management which will also be discussed.

Aging

Rigor mortis development

Aging is the practice of storing freshly slaughtered carcasses under refrigeration for a period of time to allow the development of rigor mortis. Meat that is deboned before the development of rigor mortis is objectionably toughened because the cutting and stripping provide physical stimulation which has been shown to toughen meat. The more rapid chilling rates that the boneless, skinless muscle is exposed to stimulates cold shortening which increases toughness. Finally, The lack of skeletal restraints to limit the shortening of the boneless muscle results in enhanced shortening and tougher meat. Together, these three factors help explain why meat is toughened if deboned before aging (*i.e.* before rigor mortis) is toughened. If rigor is only partially developed, then the meat is only partially affected and some

intermediate degree of toughening results. Processors must decide what degree of toughness and therefore what amount of aging is necessary for their market and customer.

Aging time

Several studies have attempted to determine the optimum amount of aging needed before deboning of broiler breast meat. Stewart et al. (1984), Lyon et al. (1985), and Dawson et al. (1987) all reported that some time between 2 and 4 hours postmortem was the critical period after which deboning did not cause toughening. This was the origin of the recommendations to store intact carcasses at refrigerated temperatures (<4 C) for at least 4 hours prior to deboning. For a safety margin or for logistical reasons such as shift changes, many processors store the carcasses or breast halves for 6-8 h. Because carcasses usually exit the immersion chiller at about 1.5 hours postmortem, that the carcasses need to wait an additional 2.5-4.5 hours in refrigerated storage before deboning. It should be noted that this minimum aging time evolved as the time needed to prevent any statistically detectable change in shear value. This is not to say that it is the minimum time needed to produce meat that would be considered "tender" to consumers. This is because there are many degrees of tenderness (Lyon and Lyon, 1990a,b; 1991) and the definition of tender meat varies between cultures and geographic regions.

Costs of Aging

Hirschler and Sams (1997) surveyed a "typical" commercial broiler processing plant to determine the cost of aging as a means of justifying its elimination by electrical stimulation. The results of this study indicated that deboning breast fillets at 2 hours postmortem would increase meat yield by 3.4% compared to deboning at 11 hours post-mortem (9 hours of aging), but only if the deboning was manual. This gain in meat yield was due primarily to reduced drip loss occurring during aging, but also softening of the muscle during aging that caused it to tear upon harvesting. This tearing left some residual meat on the skeleton during deboning. The mechanism for the softening of muscle tissue probably involves postmortem myofibrillar proteolysis (Etherington, *et al.*, 1987; McKee, *et al.*, 1997) or weakening of the connective tissue network (Stanton and Light, 1987; 1988; Nishimura *et al.*, 1995).

The cost analysis of the aging period indicated that although labor was a substantial cost, drip loss and reduced meat yield were the largest expenses that could be saved by eliminating the aging period before deboning. As an example, the test plant processed 1.3 million broilers per week. The labor costs that could be saved by the elimination of aging was approximately US\$ 210,000 annually. It was determined that the cooler space was inconsequential as it was small relative to the overall space in the plant and would be readily used for another purpose. This also negated the energy savings from eliminating aging. However, it was estimated that using the processing volume, bird size, and meat yields measured in the study, the plant would produce an additional 45,000 kg

of boneless breast meat per week. At US\$ 2.2 per kg, this added yield would multiply to US\$ 5,200,000 in additional revenue for this single plant each year. Clearly, aging is an expensive process with the majority of the costs being associated with the loss in meat yield, not labor and energy. The additional revenue gained should justify any capital outlay needed for implementing electrical stimulation.

Electrical stimulation

Background

Postmortem electrical stimulation (ES) of meat carcasses was first commercially used by the red meat industry in the 1970's (Pearson and Dutson, 1985). Electrical stimulation pulses electricity through a carcass immediately after death, causing generalized muscle contractions throughout the carcass. These contractions serve to exercise the muscles and can therefore affect rigor mortis and toughness development. Cross (1979) reviewed three theories by which post-mortem ES may tenderize meat. First, ES accelerates ATP depletion, resulting in the prevention of cold shortening and improved tenderness. Secondly, ES hastens the decline of post-mortem pH while muscle temperatures are still high, possibly enhancing the action of endogenous proteases responsible for tenderization during the aging process. Finally, ES can tenderize meat by inducing physical disruption of muscle fibers.

Systems

Many methods of using ES with poultry, with varying degrees of effectiveness, have been reported in the literature (Li, *et al.*, 1993). ES systems that use "low" amperages of 0 - 200 mA per bird induce contractions, exercise the muscle, and accelerate rigor mortis development. Although rigor is accelerated and the toughening of the resulting meat is significantly reduced, it is not reduced to a sufficient degree to allow the elimination of aging. These systems only allow some abbreviation of the aging period and the meat is tough or only "slightly tender" (Thompson, *et al.*, 1987; Lyon, *et al.*, 1989; Sams, 1990; Lyon and Dickens, 1993). These systems are in commercial use in the U.S. but are usually used in combination with other techniques such as high temperature conditioning or extended chilling.

ES systems using "high" amperages of 350-500 mA per bird induce such forceful contractions that the muscle not only exercises to accelerate ATP depletion, but tears itself. This physical disruption tenderizes the meat while the rigor mortis acceleration from the exercising prevents toughening. The combination of these two mechanisms has generally made high amperage ES more effective at reducing the need for the aging period. While low amperage ES results in statistically significant reduction in toughness, high amperage ES results in sufficient reduction in the toughening to produce meat deboned immediately after chilling (1.5 h postmortem) that would be considered "slightly to moderately tender" to consumers (< 8 kg/g) (Birkhold *et al.*, 1992; Birkhold

and Sams, 1993). High amperage ES systems are in commercial use in the U.S. and Brazil. One final advantage to high amperage ES is that it requires only 15 seconds of kill line space whereas the low amperage system requires from one to fifteen minutes of kill line space. This distinction can be critical in the cramped confinement of many kill/bleed rooms.

Very little empirical data has been generated on the precise electrical characteristics or requirements involved in postmortem electrical stimulation of broilers. In general, the resistance of the bled broiler carcass is between 1000 and 1500 ohms (Schutt-Abraham *et al.*, 1983; Kettlewell and Hallworth, 1990; personal observations) with resistance decreasing as bird size increases. Therefore with a constant voltage, the amperage passing through the carcass varies with the size of the bird according to Ohm's law:

$$\text{current} = \text{voltage} \div \text{resistance}$$

Fortunately, the variation in resistance between the bird sizes normally found **within** a flock is minimal so that the voltage has been the traditional parameter to be controlled. Despite this trend, it should be remembered that the amperage is the electrical characteristic producing the muscle stimulation and tenderization. Adaptation of constant current stunning technology to ES systems should increase the uniformity of stimulation currents between birds.

The minimum effective duration of stimulation decreases as voltage (or amperage) increases. This is why low voltage systems are longer than high voltage systems. Finally, there are as many different pulsing schemes (on:off durations and pulse number) as there are people conducting ES. Usually, the current is pulsed on for 0.5-1 sec and off for 0.5-2 sec. Determining the physiological implications of these pulse characteristics to muscle metabolism and meat tenderness is the subject of ongoing studies.

Early broiler electrical stimulation devices have been designed and constructed in-plant (Sams, 1994; 1995). They all basically consisted of a charged plate or bar contacting the head or breast with the shackle serving as the ground. Shear value and sensory evaluation results from one of these devices indicate that with ES, breast meat considered "slightly to moderately tender" could be harvested immediately after chilling (2 hr postmortem). Furthermore, injection of this meat with phosphates following deboning resulted in the tenderness equivalence of 8 hr of aging. Simmons Engineering, a U.S. manufacturer of poultry processing equipment has recently developed the first commercial electrical stimulator for poultry. The device sells for under US\$ 15,000 and has variable settings for voltage and pulse durations but is primarily directed for use with the short durations of high voltage ES. Several of these units have been installed in U.S. plants.

Practical considerations

Most of the published research on ES has been conducted using immersion chilling. Because air chilling can have slower muscle cooling rates, there is a potential for the accelerated metabolism, creating a low pH/high temperature

environment which may increase heat shortening of sarcomeres and proteolytic activity, all of which may impact the effectiveness of ES. A recent study in our laboratory suggested that when followed by air chilling, high amperage ES accelerated post-mortem metabolism, reducing sarcomere shortening and the need for aging by up to 50% (Sams, unpublished data).

Broiler processing has been the focus of much of the ES research thus far. However, using the same amperage and pulsing as is effective in broilers, ES was not effective in reducing the need for aging in turkeys (Owens and Sams, 1997) or ducks (Sams, unpublished data). Differences in muscle fiber type and metabolism (Smith and Fletcher, 1993; Walker et al., 1996) may account for the differing response to ES between species.

Because ES induces an accelerated pH decline at a postmortem time when the muscle temperature has not yet cooled, ES has the potential to cause protein damage that may reduce water holding capacity (WHC) and therefore increase drip and cook losses. Results on this effect have been mixed. Young and Lyon (1997) reported that low voltage ES reduced WHC of marinated breast fillets while two studies from our laboratory have indicated that high voltage ES did not affect drip loss or cook loss (Sams, unpublished data). The difference in these results may result from the differing mechanisms of action of the two ES systems. Low voltage ES seems to depend more on metabolic acceleration (pH decline) while high voltage ES operates more through myofibrillar fragmentation.

The accelerated rigor mortis development with ES also results in a stiffer carcass during processing. We have observed that this can interfere with the operation of automated evisceration equipment. However, in all cases the problem has easily been solved by adjusting the equipment for a different orientation of the carcass.

Tenderness management

It seems unlikely that ES will ever completely eliminate the need for aging for the processors demanding maximum tenderness (ie. equivalent to 24 or more of aging on the skeleton before deboning). However, it is very likely that for processors that only require their meat to be moderately tender that ES can completely eliminate their need for aging. Some processors are somewhere between these two extremes. For these processors there may still be the need to age after ES, but only for some abbreviated time to achieve their desired level of tenderness (while still reducing the yield losses associated with aging). To reduce the water loss during the shortened aging period, the carcass may be left in the immersion chilling tanks.

It is obvious from this discussion that in evaluating ES for their plants, they must first decide what their target level of tenderness is and what their tolerance for deviation from this target will be. This will also require processors to reevaluate their specifications and how they stand behind their product. Instead of simply stating that a carcass has been aged under refrigeration for 6 hours before deboning, they may now state that it has a tenderness equivalent of 6 hours of aging on the carcass. This then largely depends on 1) getting

customers and sales people convinced that this equivalency actually exists and
2) the reliability of the tenderness monitoring program to back it up.

Conclusion

Electrical stimulation is not a new technique. However, it has only recently been adapted for use with poultry. We now have a scientific understanding of how it works and the necessary equipment to apply it in commercial plants. Maximizing the benefit gained from ES will depend on a common set of goals between sales, marketing, production, and quality assurance. This may require a revision of the corporate view of tenderness.

References

- Birkhold, S.G. and A.R. Sams, 1993. Fragmentation, Tenderness, and Post-Mortem Metabolism of Early-Harvested Broiler Breast Fillets From Carcasses Treated With Electrical Stimulation and Muscle Tensioning. *Poultry Sci.* 72:577-582.
- Birkhold, S.G., D.M. Janky, and A.R. Sams, 1992. Tenderization of Early-Harvested Broiler Breast Fillets By High-Voltage Post-Mortem Electrical Stimulation and Muscle Tensioning. *Poultry Sci.* 71:2106-2112.
- Cross, H.R., 1979. Effects of Electrical Stimulation on Meat Tissue and Muscle Properties--A Review. *J. Food Sci.* 44:509-512, 514, 523.
- Dawson, P.L., D.M. Janky, M.G. Dukes, L.D. Thompson, and S.A. Woodward, 1987. Effect of Post-Mortem Boning Time During Simulated Commercial Processing on The Tenderness of Broiler Breast Meat. *Poultry Sci.* 66:1331-1333.
- Etherington, David J., Mark A.J. Taylor, and Eric Dransfield, 1987. Conditioning of Meat from Different Species. Relationship between Tenderising and the Levels of Cathepsin B, Cathepsin L, Calpain I, Calpain II, and β -glucuronidase. *Meat Sci.* 20:1-18.
- Hirschler, E.M., and A.R Sams, 1997. Commercial-Scale Electrical Stimulation of Poultry: The Effects on Tenderness, Breast Meat Yield, and Production Costs. *J. Appl. Poultry Res.* (In Press).
- Kettlewell, P. J., and R. N. Hallworth, 1990, Electrical Stunning of Chickens. *J. Agric. Eng. Res.* 47:139-151.
- Li, Y., T.J. Siebenmorgen, , and C.L. Griffin, 1993. Electrical Stimulation in Poultry: a Review and Evaluation. *Poultry Sci.* 72:7-22.
- Lyon, C.E., and J.A. Dickens, 1993. Effects of Electric Treatments and Wind Restraints on The Rate of Post-Mortem Biochemical Changes and Objective Texture of Broiler *Pectoralis Major* Muscles Deboned After Chilling. *Poultry Sci.* 72:1577-1583.
- Lyon, B.G. and C.E. Lyon, 1990a. Texture Profile of Broiler *Pectoralis major* as Influenced by Post-Mortem Deboning Time and Heat Method. 69:329-340.

- Lyon, B.G. and C.E. Lyon, 1991. Shear Value Ranges by Instron Warner-Bratzler and Single-Blade Allo-Kramer Devices that Correspond to Sensory Tenderness. *Poultry Sci.* 70:188-191.
- Lyon, C.E., and B.G. Lyon, 1990b. The Relationship of Objective Shear Values and Sensory Tests to Changes in Tenderness of Broiler Breast Meat. *Poultry Sci.* 69:1420-1427.
- Lyon, C.E., C.E. Davis, J.A. Dickens, C.M. Papa, and J.O. Reagan, 1989. Effects of Electrical Stimulation on The Post-Mortem Biochemical Changes and Objective Texture of Broiler *Pectoralis* Muscle. *Poultry Sci.* 68:249-257.
- Lyon, C.E., D. Hamm, and J.E. Thomson, 1985. pH and Tenderness of Broiler Breast Meat Deboned at Various Times After Chilling. *Poultry Sci.* 64:307-310.
- McKee, S.R., E.M. Hirschler, and A.R. Sams, 1997. Physical and Biochemical Effects Associated with Tenderization of Broiler Breast Fillets During Aging After Pre-Rigor Deboning. *J. Food Sci.* 62:959-962.
- Nishimura, T., A Hattori, and K. Takahashi, 1995. Structural Weakening of Intramuscular Connective Tissue During Conditioning of Beef. *Meat Sci.* 39:127-133.
- Owens, C.M. and A.R. Sams, 1997. Muscle Metabolism and Meat Quality of Pectoralis from Turkeys Treated with Postmortem Electrical Stimulation. *Poultry Sci.* 76:1047-1051.
- Pearson, A. M., and T. R. Dutson, 1985. *Advances in Meat Research*, vol.1: Electrical Stimulation. AVI Publ., Westport, CT.
- Sams, A.R., 1990. Electrical Stimulation and High Temperature Conditioning of Broiler Carcasses. *Poultry Sci.* 69:1781-1786.
- Schutt-Abraham, I., H. J. Wormouth, and J. Fessel, 1983. Electrical Stunning of Poultry in View of Animal Welfare and Meat Production. Pages 187-196 in: *Stunning of Animals for Slaughter*. G. Eikelenboom, ed. Martinus Nijhoff Publ., Boston, MA.
- Smith, D. P., D. L. Fletcher, R. J. Buhr, and R. S. Beyer, 1993. Pekin Duckling and Broiler Chicken Pectoralis Muscle Structure and Composition. *Poultry Sci.* 72:202-208.
- Stanton, C., and N. Light, 1987. The Effects of Conditioning on Meat Collagen: Part 1--Evidence For Gross *in situ* Proteolysis. *Meat Sci.* 21:249-265.
- Stanton, C., and N. Light, 1988. The Effects of Conditioning on Meat Collagen: Part 2--Direct Biochemical Evidence For Proteolytic Damage In Insoluble Perimysial Collagen After Conditioning. *Meat Sci.* 23:179-199.
- Stewart, M.K., D.L. Fletcher, D. Hamm, and J.E. Thomson, 1984. The Influence of Hot Boning Broiler Breast Muscle on pH Decline and Toughening. *Poultry Sci.* 63:1935-1939.
- Thompson, L.D., M.D. Janky, and S.A. Woodward, 1987. Tenderness and Physical Characteristics of Broiler Breast Fillets Harvested At Various Times From Post-Mortem Electrically Stimulated Carcasses. *Poultry Sci.* 66:1158-1167.

- Walker, L.T., S.G. Birkhold, I. S. Kang, E. M. Hirschler, and A.R. Sams, 1996. The Effects of Postmortem Electrical Stimulation and Muscle tensioning in Teo Broiler Muscles. *Poultry Sci.* 75:1118-1120.
- Young, L. L., 1997. Effect of Post-Chill Deboning On Tenderness Of Broiler Breast Fillets. *J. Appl. Poultry Res.* 6:174-179.
- Young, L.L., and C.E. Lyon, 1997. Effect of Electrical Stimulation in Combination with Calcium Chloride or Sodium Chloride Treatments at Constant Ionic Strength on Moisture Binding and Textural Quality of Early-Harvested Breast Fillets. *Poultry Sci.* 76:1446-1449.

THE INFLUENCE OF FLOCK MANAGEMENT ON BROILER CARCASS QUALITY

S. F. Bilgili. Ph.D.

Professor and Extension Scientist,
Department of Poultry Science, Auburn University
Auburn, AL 36849-5416

The broiler industry world-wide and especially in the United States (US), has experienced tremendous growth and expansion during the last 50 years. As consumer demand for further-processed and value-added products continued to increase, chicken has become the most popular meat in many countries. In the US, per capita broiler meat consumption nearly tripled from 1960 (24 Lbs) to 1996 (est. 75 Lbs). Poultry meat now accounts for nearly 40% of total meat consumption in the US.

Consolidation in commercial broiler production, through vertical integration of all the phases necessary (pullet and breeder flocks, hatchery, broiler grow-out farms, feed mill, processing plant, procurement, sales, marketing, and distribution), has allowed centralization of the decision making process, and thus has been credited for continuous, reliable, efficient, and low cost production of broiler meat. Advances in genetics, nutrition, management and health programs in the live production phase, and automation, further-processing, innovation, and marketing in the processing phase, all have contributed significantly to the continuing success of this agribusiness.

Broiler production

Broiler production practices have been traditionally determined by economic considerations (i.e., least-cost production). Hence, field or grow-out performance of broilers, as measured by growth rate, feed efficiency, and livability, is often used as the primary decision-making criteria. Tremendous amount of product is lost each year, either totally due to whole carcass and parts condemnations resulting from disease causes (i.e., septicemia/toxemia, airsacculitis, leukosis, synovitis, tumors, bruises, cellulitis) and dead-on-arrivals (DOA), or downgraded due to presence and trimming of carcass defects (i.e., bruises and hemorrhages, discoloration's, skin defects, broken/dislocated bones, exposed flesh) during slaughter and processing.

Research and field observations have identified numerous live production and 1. processing factors that contribute to carcass condemnations and downgrading in broilers.

1. Genetics (Breed/strain-cross): Growth-rate, maturity at a given market age, temperament, feathering rate, conformation and uniformity.

2. Environment and flock management: Farm size, house design and equipment, ventilation system and its management, brooding system and conditions, litter type, quality and moisture, down-time between the flocks, bird placement density, and flock management and supervision.
3. Nutrition, feeds and feeding programs: Nutrient specifications and imbalances, calorie-protein ratio, ingredient sources and quality, milling, pellet quality, feeding programs, mycotoxin contamination, selection and use of non-nutritive feed additives.
4. Flock health programs: Chick quality, immunosuppression, level of exposure to bacterial, zoonotic, and viral agents, breeder and broiler vaccination programs, sanitation and biosecurity.
5. Bird handling: Feed withdrawal program, house preparation prior to catching, bird handling speed and technique, crating system, transportation conditions and distance, number of birds per load.
6. Processing conditions: Holding shed design and environmental control, holding time, bird unloading, kill and evisceration line speeds, scald temperatures, picking stress, and overall equipment and operating conditions from stunning, killing through chilling.

Although the influence of these factors on end-product quantity and quality is easy to demonstrate on an individual basis, most of these factors often have an additive or synergistic effect under commercial conditions. In a recent field study, the feasibility and value of monitoring the production and processing process as a management tool was demonstrated. Over a period of one year, live production and processing data was collected in a vertically integrated broiler complex. Data representing 16 million broilers processed were analyzed to identify significant flock management factors affecting carcass condemnations and downgrading.

Carcass condemnations

Whole carcass condemnations were significantly affected by environmental conditions. Septicemia/toxemia, tumors and airsacculitis incidence was highest in fall/winter, whereas cellulitis condemnations peaked during the spring/summer months. A significant and a positive correlation was observed between whole carcass and parts condemnations. Whole carcass and parts condemnations increased with flock age and market weight. In general, livability decreased and DOA's increased with flock age and market weight. Whole bird condemnations due to tumors (primarily squamous cell carcinomas) showed substantial decrease with flock age. Plant holding time prior to slaughter correlated positively with DOA's. Down-time between the flocks correlated significantly with whole carcass and parts condemnations. Flock placement density (Lbs/sq.ft), number of flock reared on build-up litter, and number of birds per drinker were identified as significant management practices influencing condemnations.

Carcass quality and downgrading

Flock age and market weight showed a negative correlation with proportion of post-chill "A-Grade" carcasses. Breast blisters and leg problems were the primary defects contributing to downgrading with older or heavier birds. Flock placement density (measured either as sq.ft/bird or Lbs/sq.ft), feeding program, plant holding time, and house temperatures were the primary factors affecting the incidence of breast blisters and skin lesions (sores, scabs, scratches). Starter feed (as proportion of total feed consumed) was consistently and inversely correlated with feed conversion, and carcass quality attributes (breast blisters, field and plant downgrades, skin lesions, and grade). Placement density (breast blisters and skin lesions), number of flocks on build-up litter (breast blisters), partial house brooding (skin lesions), and ventilation system (skin lesions) used also influenced carcass quality in the plant.

It is well established that live production conditions and practices have a major influence on the quality of birds in the processing plant. Although the continued emphasis of production traits (i.e., weight gain and feed efficiency) can be justified economically, it is the quality and yield of marketable products that will ultimately determine the profitability of an operation. Field observations indicate that financial and operational constraints frequently dictate design and implementation of management programs. Systematic identification, objective assessment, proper documentation, analysis, and interpretation of causes of condemnations and downgrading defects can be invaluable tools for process improvement.

References

- Benoff, F. H., 1981. Practical tips on reducing downgrades. *Broiler Industry*, June, pp.91-93.
- Bilgili, S. F., 1993. Factors contributing to broiler carcass yield and quality from live production through processing. *Proc. Int. Poultry Congress, Istanbul, Turkey*, pp.26-37.
- Bilgili, S. F., 1993. Broiler carcass quality: Seven year survey. *Broiler Industry*, June, pp.32-42.
- Bilgili, S. F., and E. T. Moran,, Jr., 1993. Carcass quality of broilers as influenced by strain-cross and nutritional programs. *Proc. European Symp. On the Quality of Poultry Meat, Tours, France*, pp.15-25.
- Bilgili, S. F., and A. B. Horton, 1995. Influence of production factors on broiler carcass quality and grade. *proc. European Symp. On the Quality of Poultry Meat, Zaragoza, Spain*, pp.13-20.
- Bilgili, S. F., and A. B. Horton, 1996. Influence of production factors on broiler condemnations. *Proc. 45th Western Poultry Disease Conference, Cancun, Mexico*, pp.94-96.
- Bremner, A. S. 1980. Downgrading and condemnation in carcasses following inspection. In: *Meat Quality in Poultry and Game Birds*, eds. G. C. Mead and B. M. Freeman, pp.134-149.
- Griffiths, G. L., and M. E. Nairn, 1984. Carcass downgrading of broiler chickens. *Br. Poultry Sci.* 25:441-446.

Veerkamp, C. H., 1980. Commercial aspects of mechanical processing and downgrading of carcasses. In: Meat Quality in Poultry and Game Birds, G. C. Mead and B. M. Freeman, pp.151-158.

**Partially presented at:
Georgia Poultry Conference, Athens, GA.*

CARBON DIOXIDE STUNNING OF POULTRY

Dr. Alan Sams

**Department of Poultry Science
Texas A&M University
College Station, Texas USA 77843-2472**

Voice: 409-862-1518

Fax: 409-845-1921

E-mail: asams@poultry.tamu.edu

Introduction

Poultry is usually stunned prior to killing to immobilize the bird for easy mechanical killing and to provide a humane death for the animal. Depending on the relative importance of these factors, stunning is required by law in many countries. However, even if it is not required by law, it is almost universally practiced for automated killing. In general, stunning should make a bird unconscious, unable to sense pain, and unable to move for a sufficient period of time for the neck to be cut and for sufficient blood loss to occur to prevent recovery of consciousness. Although electric shock has traditionally been the preferred method, gas stunning is now being used by commercial processors. There are a variety of gas stunning methods, with all of them using carbon dioxide (CO₂) as either the only gas or as part of a gas mixture. With all gas stunning systems, the birds are placed in the modified atmosphere for a sufficient time to achieve the desired state of unconsciousness.

Reports of the anesthetic properties of CO₂ date to the early 1800's when CO₂ was used as the first inhaled anesthetic. Carbon dioxide easily crosses the blood-brain barrier to cause a decrease in the pH of the cerebral spinal fluid and rapid unconsciousness. Loss of consciousness occurs at about 20 seconds following exposure of a broiler chicken to 90% CO₂. This effect seems to be independent of the lack of oxygen as approximately 40 seconds are required for loss of consciousness by a broiler exposed to 90% of an inert gas such as argon or nitrogen (Poole and Fletcher, 1995). Obviously, the reduced oxygen concentration in a carbon dioxide atmosphere will also contribute to the unconsciousness resulting from the anesthetic properties of CO₂.

Gas stunning methods

Of the many commercial gas stunning systems, there are many differences that are largely the result of the laws of the country and practices industry using them. In the United States, the birds are not required to die from the stun. Processors want the bird to be alive and able to recover from the stun. Unconsciousness should only last 1-2 minutes, long enough for the neck to be cut and most of the bleeding to occur. Full recovery should be possible if the neck is not cut. This has traditionally been achieved by using a weak electric shock (12-24 mA per bird for 7-10 sec). In Europe, the law requires that

chickens be irreversibly stunned prior to killing. This has traditionally been done by a strong electric shock (100-125 mA per bird for 4-6 sec) to kill the bird. The blood is then drained from the bird which would have never regained consciousness. Most of the South American countries seem to be intermediate between these two extremes depending on their own regulations and those of the country to which they may be exporting.

Carbon dioxide stunning systems reported in the literature can generally be separated into two groups: a continuous flow, shackle-line method to achieve a reversible stun and a continuous flow, coop stunning method to achieve an irreversible stun. Both of these methods (or a modification of them) are being used in commercial plants. In the studies of the shackle-line method, birds are hung on shackles which travel through a tunnel containing a gradient of increasing concentration of carbon dioxide. The initial concentration is 10-40% (CO₂ in air) which increases to a final concentration of 40-60% at the exit of the tunnel. Exposures in the tunnel have been 30-90 sec. The commercial tunnel stunner of this type uses a 10-40% gradient and an exposure time in the tunnel of about 90 seconds. In contrast, the coop method places the coops (containing the birds) on a conveyor belt that travels through a tunnel containing 90% CO₂ (in air) for 2-2.5 minutes to insure that the birds are dead. Because the birds are unconscious/dead when they are uncooped, the coop method also improves the working conditions for the hangers who no longer have to hang struggling chickens. The birds are also less prone to be injured during the hanging process. This advantage does not exist for the shackle-line system because the birds are already in the shackle when stunned. It is important to note that these methods evolved in response to specific, different sets of legal and production constraints and neither is necessarily better than the other.

Effects on the birds and meat

Birds that are stunned with carbon dioxide are generally flaccid, limp, and may exhibit some degree of cyanosis (blue coloring) in their comb and wattles. The initial rate of blood loss is generally slower for CO₂-stunned birds but equals that of electrically stunned birds by 90-120 sec after neck cut (Mohan Raj et al., 1990; Mohan Raj and Gregory, 1991; Kang and Sams, 1994). Because the CO₂ stunning does not involve the violent muscle contractions associated with electric stunning, CO₂-stunned birds have been observed to have less damage from stunning. Hirschler and Sams (1993) reported that birds stunned in their coops with 40% CO₂ (in air) for 60 sec had a lower incidence of superficial breast hemorrhages and broken furcula (wishbone, clavicle or collarbone) than birds stunned with electricity (47 mA per bird for 5 seconds). Later, Kang and Sams (1995) reported that birds stunned with a 40-60% CO₂ gradient for 30 sec had a lower incidence of superficial breast hemorrhages and broken furcula than birds stunned with electricity (35 mA per bird for 7 sec). Mohan Raj et al. (1990) reported that birds stunned/killed with 45% CO₂ (in air) for 2 minutes had a reduced incidence of damage to the coracoid and scapula (collarbones associated with the shoulder), no difference in furcula damage, a reduction in deep breast muscle hemorrhaging, and no difference in superficial breast muscle

hemorrhaging when compared to stunning with electricity (107 mA per bird for 4 sec).

These studies generally observed a reduction in carcass damage with CO₂ stunning when compared to their respective electrical stunning method. However, all electrical stunning methods used were in excess of the amperage recommended for use in U.S. plants to minimize carcass damage. Personal observations in commercial U.S. plants using the recommended 12-24 mA for 10-12 sec have suggested that these lower amperages would result in less carcass damage, reducing the potential benefit for CO₂ stunning.

In addition to the potential benefit of reduced carcass damage, the anesthetic properties of CO₂ and the reduced oxygen concentrations inhaled during CO₂ stunning have the potential to affect rigor mortis development and meat quality. Mohan Raj et al. (1990) reported a small acceleration in rigor mortis development from stunning/killing broilers with 45% CO₂ (in air) for 2 minutes when compared to electrical stunning/killing (107 mA per bird for 4 sec). Kang et al. (1995) and Kang and Sams (1995) reported that birds stunned with a 40-60% CO₂ gradient for 30 sec had a rigor mortis development rate and meat tenderness (deboned 1 hour after death) that did not differ from birds stunned with electricity (35 mA per bird for 7 sec). Furthermore, Kang and Sams (1995) observed no difference in rigor mortis development or meat tenderness when comparing a CO₂ stun (40-60% gradient for 30 sec) to a CO₂ kill (80% CO₂ for 2 min). Mohan Raj et al. (1990) and Kang and Sams (1995) also did not observe any effect of the CO₂ method on the color (lightness or L value) or the cook loss when compared to their electrical methods.

Because of the relaxing properties of anesthetic gases like CO₂, they have the potential to loosen the muscular attachments to feathers and make feather removal easier or allow a more mild scalding procedure. A recent, unpublished study in our laboratory utilizing the commercial CO₂ method of 15-40% CO₂ for 90 sec confirmed previous reports that CO₂ stunning has no effect on rigor mortis development or the tenderness of meat deboned at 1.5 hr after death when compared to electrical stunning (35 mA per bird for 7 sec). This study also determined that CO₂ stunning has no effect of the feather release force when broilers were soft scalded (53 C for 120 sec) or scalded with milder conditions (53 C for 90 sec).

Stunning with gas mixtures

It was eventually determined that the birds exhibited aversive behavior to the CO₂ gas in concentration exceeding 40% because it was acidic. The CO₂ formed carbonic acid when it contacted the wet respiratory membranes. This caused the European regulators and poultry industry to shift from high concentrations of CO₂ to mixing 35% CO₂ with inert gases such as argon to achieve a similar but more humane stun. Carbon dioxide is included in these mixtures to use its anesthetic properties to achieve a more rapid state of unconsciousness than could be achieved with the inert gas alone.

Gas stunning of poultry with CO₂ and argon mixtures have been approved in the U.K. and are being commercially used. Studies on argon stunning have

indicated that it is similar to CO₂ stunning in its effect on blood loss (Mohan Raj and Gregory, 1991). Stunning with mixtures of CO₂ and argon has been observed to reduce the incidence of carcass damage when compared to electrical stunning at 120 mA for 4 sec (Mohan Raj et al., 1992). An additional advantage to stunning with mixtures of CO₂ and argon is that Raj (1994) reported that meat from these birds had an accelerated rigor mortis development and therefore more tender meat when deboned at 2 hr after death when compared to an electrical stun (120 mA for 4 sec).

This rigor mortis effect may result from the high amperage stun slowing rigor mortis development instead of an acceleration effect from the gas stun. Craig and Fletcher (1995) reported that high amperage electrical stunning (100-125 mA per bird) as used in Europe results in a slower rigor mortis development than a low amperage stun (12-24 mA per bird) as used in the U.S. However, Dzuik and Sams (1996) reported that stunning/killing birds with 90 % argon (<2% oxygen) for 2 min accelerated rigor mortis development and resulted in more tender meat deboned at 1 hr after death compared to an electrical stun (35 mA for 7 sec) more like a low amperage U.S. stun than that used by Raj (1994). This continues to be an active area of research because rigor mortis acceleration would be a valuable marketing advantage for gas stunning.

Conclusions

Stunning poultry with carbon dioxide is not a new idea. Our ability to do it efficiently has improved in recent years due to equipment developments. Also, the market conditions for poultry meat products and the changes in the processing methods needed to efficiently produce those products further increase our justification for examining alternate stunning methods. Carbon dioxide stunning, alone or with other gases, has advantages in reducing carcass damage, but this effect is probably greater when compared to a European, high amperage electric stun. There is the additional possibility that rigor mortis may be accelerated by stunning with gas mixtures reducing the need for aging carcasses before deboning. However, this is not clear and may also depend on the electric stunning conditions to which it is compared. In conclusion, the benefits from CO₂ stunning and the decision to use it will depend on a plant's regulations, products, and customers.

References

- Hirschler and Sams, 1993. Poultry Science 72(suppl. 1 abstract):143.
- Kang, Hirschler, and Sams, 1995. Poultry Science 74(suppl. 1 abstract):197.
- Kang and Sams, 1995. Poultry Science 74(suppl. 1 abstract):79.
- Craig and Fletcher, 1995. Poultry Science 74(suppl. 1 abstract):30.
- Dzuik and Sams, 1996. Poultry Science 75(suppl. 1 abstract):21.
- Poole and Fletcher, 1995. Poultry Science 74:1218-1223.
- Mohan Raj, Gregory, and Wilkins, 1992. The Veterinary Record 130:325-328.
- Mohan Raj and Gregory, 1991. The Veterinary Record 128:127-128.

Mohan Raj, Grey, Audsley, and Gregory, 1990. *British Poultry Science* 31:725-733.

Raj, 1994. *British Poultry Science* 35:77-89.

STRESS FACTORS OF THE PERIOD PRIOR TO SLAUGHTER AND EFFECT ON THE MICROBIOLOGICAL QUALITY OF POULTRY

R.W.A.W.Mulder

DLO Institute for Animal Science and Health, P.O Box 65, 8200 AB Lelystad,
The Netherlands

Abstract

Human food poisoning is in many countries of the world caused by Salmonella and other pathogenic bacteria. Products of animal origin, including poultry products are often involved in cases of human food poisoning. These organisms can frequently be isolated from the intestinal tract of clinically healthy animals including poultry. Poultry harbours these organisms in their digestive tract and excrete them, intermittently in the faeces. The meat of clinically healthy broilers has never been found contaminated with these organisms. Contamination of the products mostly becomes evident after slaughter and evisceration, although because of the natural defence system of the carcass tissues growth and penetration of the organisms is unlikely to occur. There are indications that stress increases, not only the incidence of Salmonellosis, but also the carrier state of the broilers. The occurrence of stress in broilers during fattening, catching and transport including holding at the slaughterhouse can explain why preventive measures to control pathogenic micro-organisms do not work. This paper aims to contribute to the discussion on the importance of stress factors in relation to contamination. Husbandry and nutrition factors aiming at the economical production of poultry may be in conflict with the industry's aim to produce consumer ready products without potentially pathogenic bacteria.

Introduction

The future of the poultry industry looks bright as production and consumption data increase world-wide (Tables 1 and 2) and on the other hand scandals with BSE and Escherichia coli O157H7 in beef and classical swine fever with porcine get far more attraction from the international press than the contamination of poultry and poultry products with Salmonella and Campylobacter bacteria. Despite this quality and safety of products, together with low cost and production, not affecting environment are the issues of the future for the poultry industry.

In case of quality and safety of production and products industries have introduced total quality control programmes to be better able to provide guarantees to retailers and consumers. Nevertheless the problem of the

presence of pathogenic bacteria as Salmonella, Campylobacter, Listeria and others still exists and makes production vulnerable. Data on prevalence of pathogenic bacteria on poultry meat are presented in Table 3. Worldwide people may become ill after consumption of contaminated food products. Meat and poultry meat products are often involved in human foodborne disease, as can be seen from Table 3 with regard to the rather high contamination of the products with potentially pathogenic bacteria. Foodborne disease costs the society yearly an enormous amount of money, due to hospitalisation, including medical costs and lost wages and less labour. Costs for food-borne disease in the US are estimated to be US \$ 22 billion per year.

It is evident that preventive measures, including monitoring programmes, to reduce the numbers of Salmonella and other pathogens during the grow out period, should focus on the change of husbandry practices as well as on the use of technologies and products that have shown to be effective against the colonization of these organisms. Despite this the processing industry has to cope with contaminated flocks coming to the slaughterhouses, where it is expected that the contamination will not be spreaded over other carcasses or flocks. This paper concentrates on (stress) factors occurring in the period prior to slaughtering the birds, which have an influence on the spreading of potentially pathogenic bacteria and influence in that way the microbiological quality of the consumer ready product. The underlying mechanisms of spreading of bacteria due to external or internal influences are not clear and therefore some explanation on the role of the intestinal microflora is given. The distribution and composition of the intestinal tract and the factors which influence the intestinal microflora are presented in Tables 4 and 5.

Stress factors

Stress is the word often used in those situations which are too complex to be understood, and it is often used to explain why preventive measures to control spreading of pathogens in live animals do not work. Stress is regarded as a harmful condition arising from the bird's inability to maintain its normally body functions under certain environmental conditions.

Stress factors are observed during fattening, catching and loading, transport and conditioning. Stress can, among others be accompanied by symptoms such as damage to the intestinal tract and a lower capacity of the immune system. Stress factors influencing the intestinal microflora are presented in Table 6, although the effects on the microflora are not well understood. A disturbance of the microflora can occur, changing the incidence of the microorganisms present and lowering resistance to infection. These changes can be readily detected in the upper part of the small intestine where the composition of the microflora is more aerobic (Table 4). Another consequence of stress is an increase in shedding of caecal material and therefore an increased spreading of bacteria, contributing to the external contamination of the birds.

The influence of stress on the immune system is complex and depends on a number of factors. Among these are: the stressor, genetics, nutrition, antigen concentration. Some stressors are believed to positively influence the resistance

to infection of pathogens. Examples are some forms of social stress, which seem to increase resistance against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* infections. On the other hand, other social stressors, for example mixing pigs from different herds together at transport, have resulted in higher rates of contamination. With poultry it is described that when the time between crating and holding before slaughter increased the final products are more contaminated, but as shown in another study crating and transport did not influence antigen production in live birds against Newcastle disease. Anyway in the context of this paper the spreading of pathogenic bacteria is of concern and the previous examples show that due to external/internal factors faecal material is spread over animals, causing additional contamination of the final products.

The number of hours of feed withdrawal prior to crating also influences excretion of pathogens. Normally chickens empty their caeca every 24 hours, but because of the change in environmental conditions the excretion pattern changes. In the literature most data relate to spreading/shedding of *Salmonella* bacteria. Although *Campylobacter* seems to cause more problems with regard to human public health this prominent position is not reflected in the literature on this subject.

Examples

Stress in poultry is accompanied by a series of symptoms. The increased corticosteroid levels in blood plasma and the occurrence of damage to the intestinal tract, heart and blood vessels are of major importance. Decreased shear strength of the intestinal tract may result in gut breakage during processing, which is responsible for further spreading of bacteria over carcasses and equipment.

▪ Husbandry factors

The number of birds per square meter and the temperature during fattening, together with the diet and feed additives and coccidiostats applied are known to be stress factors. Results from experiments, however, are not available to underpin these statements. Also no evidence was found that management practices are involved.

▪ Diet and feed additives

In general the adult microflora is resistant to changes, but dietary changes may affect the population levels of important bacteria. Addition of meat and bone meal to the diet stimulated *C. perfringens* and early studies on feeding whole wheat-grain reduced the susceptibility of the birds to oral infection with *S. gallinarum*. No data could be found on recent research including serotypes as *S. enteritidis* and *S. Typhimurium*.

Antimicrobial compounds are commonly used. A large variety of products can be applied or as growth promoter, prophylactic or therapeutic agent. The effect of these compounds on excretion of pathogens is mainly caused by their

effects on the total gut microflora. Sometimes effects are compensated to normal after stopping the treatment.

- **Feed and water withdrawal**

Feed and water withdrawal prior to transport, influences gut contents and the emptying of the digestive tract of broilers. Literature data suggest that feed withdrawal 8-12 hours before slaughtering minimizes the fecal contamination of carcasses and that stressing chickens under conditions simulating the practice of feed withdrawal and live haul results in a delayed caecal retention of another 24 hours.

Feed and water withdrawal may result in gut breakage during processing, causing contamination of carcasses and the slaughter environment.

- **Transport**

The increase of Salmonella contamination of slaughtered broilers after transport has been described by several authors using artificial infected birds as well as measuring under natural contamination circumstances. Salmonella stereotypes on slaughtered products were similar with those estimated in the live birds, indicating intestinal origin. The important factors were the time between crating and holding before slaughter as well as number of birds per square meter in the crate, possibilities for movement and the temperature during transport. Some studies even with excessively prolonged transportation times showed no effect on the intestinal carrier rate of pathogenic bacteria, e. g. Salmonella, although the organisms were more often isolated from the liver and body cavity, suggesting an increased susceptibility to systemic infection from the gut.

- **Feed and water withdrawal, holding time and transport**

In the literature most data relate to spreading or shedding of Salmonella bacteria. Therefore a study to demonstrate the influence of feed withdrawal, holding time transport and slaughter on Campylobacter contamination of birds and consumer ready products is worthwhile mentioning. The results of this study are presented in Tables 7 and 8.

Conclusions

With regard to the spread of potentially pathogenic bacteria on carcasses because of stress factors during fattening, catching, transport and holding prior to slaughter the literature data are not consistent.

Feed withdrawal seems to be a stressor which can be used to decrease contamination with Salmonella of the final product. Results are not available with regard to other pathogens as Campylobacter and Escherichia coli, probably because there is no economical reason for the research.

Pre-slaughter conditions in handling live birds influence the contamination rate of the slaughtered product. This has become clear from the literature as well as from observations in actual practice. Therefore preloading activities in the shed, the loading procedure, the transport, the holding time and conditions at slaughter and the slaughter process itself should be given more care.

Table 1 – Top ten poultry meat producing countries in 1995.

Country	Production (x 1000 tonnes)
USA	11.633
China	6.755
Brazil	3.800
Japan	1.280
France	1.197
Russian Fed.	1.142
Mexico	1.070
UK	965
Italy	803
Thailand	750

Table 2 - Consumption of poultry meat in 1992 (kg per capita)

	Consumption	Population (x 1000)(est. 2000)
Africa	3.1	831.595
N-America	31.0	483.924
S-America	15.3	346.231
Asia	3.8	3.658.821
Europe	15.3	511.042
Oceania	19.9	30.650
Russia Fed	9.3	295.815

Table 3 – Prevalence of pathogenic bacteria on poultry meat

Organism	Prevalence(%)	Reference
Camp. Jejuni	0-100	Bryan and Doyle, 1995
C. perfringens	63	Roberts, 1972
C. botulinum	0.3	Anon, 1971
E. coli O157H7	1.5	Doyle and Schoeni, 1987
L. monocytogenes	5 (> 100)	De Boer et al., 1991
Salmonellae	0-100	Bryan and Doyle, 1995
St. Aureua	29	Isigidi et al., 1991
Y. enterocolitica	8(non-path)	De Boer et al., 1991

Table 4 – Distribution and composition of the intestinal tract

Duodenum & jejunum	Aerobic	Streptococcus Lactobacilli
Ileum & Coecum	Microaerophilic	Enterococcus Bifidobacterium Bacteroides Clostridia
Colon	Anaerobic	Bacteroides Bifidibacteria Fusobacteria etc

Table 5 – Factors which influence the intestinal microflora

Endogenous	Exogenous
Peristaltic	Nutrition
Secretion of acids	Medication
Antagonists	Competition
Sulphur-dioxide	Nutrients
Hydrogenperoxide	Oxigen
Organic acids	
Bacteriocins	
Nutrients	

Table 6 – Factors causing the un-balance of the intestinal microflora

Deprivation/fasting	Antibiotics
Consumption of spoiled feed	Malabsorption
Change of feed	No secretion of acids
Stress	Insufficient peristaltic activity

Table 7 – Campylobacter (log cfu/g, standart deviation) in ceacal contents of broilers without or with feed withdrawal, before and after transport

Before transport			After transport	
Flock	Ad lib feed	No feed	Ad lib feed	No feed
A	NE	NE	7.5 (0.75)	7.8 (1.04)
B	NE	NE	6.6 (1.27)	7.7 (1.09)
C	7.6 (0.30)	7.9 (0.78)	8.1 (0.63)	7.1 (0.90)
D	7.5 (0.48)	8.0 (0.72)	7.8 (0.65)	8.3 (0.50)

NE = not estimated

Table 8 – Campylobacters (log cfu/g, standard deviation) in feacal material in transport crates from broilers without or with feed withdrawal.

Flock	Ad lib feed	No feed
A	6.2 (0.35)	6.9 (0.07)
B	5.1 (0.21)	8.0 (0.07)
C	6.7 (0.21)	5.9 (0.21)

D

6.2

6.4 (0.42)

References

In preparing the text the following publications, and preferences cited there, were used:

Jacobs-Reitsma, W.F., N.M. Bolder and R.W.A.W. Mulder (1997). The influence of pre-slaughter stresses on the incidence and extent of *Campylobacter* in poultry and poultry products (in press).

Mead, G.C. (1983). Significance of the intestinal microflora in relation to meat quality in poultry. Proceedings of the 6th European Symposium on Quality of Poultry Meat, Ploufragan, France pp.107-122.

Mulder, R.W.A.W. (1995). Impact of transport and related stresses on the incidence and extent of human pathogens in pigmeat and poultry. *Journal of Food Safety* 15, 239-246.

Mulder, R.W.A.W. (1997). Safe poultry meat production in the next century. *Acta Veterinaria Hungarica*-45, 307-315.

POULTRY INSPECTION SYSTEMS AND IMPLEMENTATION OF PATHOGEN REDUCTION PROGRAM IN BROILER PROCESSING PLANTS

S. F. Bilgili, Ph.D.

Professor and Extension Scientist
Department of Poultry Science
Auburn University
Auburn, Alabama 36849-5416, USA

The Food Safety and Inspection Service (FSIS) is a branch of the United States Department of Agriculture (USDA) that is responsible by law for administering poultry inspection activities in the U.S. Poultry inspection involves examination of each bird to determine its wholesomeness and fitness for food, maintenance of pre-described sanitary standards, and supervision of the preparation, slaughter, processing, packaging, and labeling of poultry products at approved facilities. Inspection of poultry destined for interstate or foreign commerce is mandatory and the associated costs are covered by the USDA. The inspection mark confirms that the poultry has passed examination by a qualified USDA veterinarian or trained inspector during slaughter and processing.

Sanitation Standard Operating Procedures (SSOP), Zero-fecal tolerance and pathogen testing regulations of the USDA's Pathogen Reduction Program is currently being implemented. The Hazard Analysis Critical Control Points (HACCP) program will be soon be an important part of the inspection regulations in broiler plants.

Poultry Inspection Systems

The Food Safety and Inspection Service (FSIS) is the public health branch of the U.S. Department of Agriculture (USDA) that assures that meat and poultry products are safe, wholesome, and properly labeled. Poultry Products Inspection Act (1957) and the Wholesome Poultry Products Act (1968) are the two major federal laws that authorize FSIS to implement inspection programs. The FSIS, through its national network of veterinarians and inspectors, inspects all meat and poultry that will be sold in interstate or foreign commerce, including imported products. The FSIS also monitors the state inspection programs which inspect poultry products that will be sold in intrastate commerce, to assure equivalency in inspection standards.

Before a plant can begin operating, FSIS first must approve its plans for facilities, equipment, and operational procedures to make sure the slaughter and processing areas and process are sanitary. Floor plans, equipment lay-out, water supply, lighting, and waste disposal systems must be approved to assure cleanability and sanitation. Packaging materials and labels must also receive FSIS approval.

There are eight primary public health related inspection activities that are conducted by the FSIS in processing plants:

1. Antemortem inspection
2. Postmortem inspection
3. Condemnation and final disposition
4. Sanitary slaughter and dressing
5. Poultry chilling
6. Plant sanitation
7. Carcass reinspection
8. Residue monitoring

1. Antemortem Inspection: The FSIS inspectors examine and observe the animals, on a discretionary basis, prior to slaughter for signs of disease and other abnormal conditions. Most producers augment this process by providing the FSIS early data on probable disease conditions that may be present on market age flocks. Suspect flocks are segregated from healthy poultry and slaughtered under separate arrangements. Dead and dying animals are prevented from being slaughtered during antemortem inspection. The antemortem inspection accounts for small portion of the FSIS inspection activities, since through vertical integration, nearly all broilers produced in the U.S. are reared under closely monitored conditions.

2. Postmortem Inspection: Bird-by-bird inspection of carcasses is required by law for all poultry slaughtered in a federally inspected establishment. The FSIS line inspectors examine external and internal surfaces of the carcasses and internal organs after evisceration for disease conditions and contamination that would make all or part of the carcass unfit for human consumption. Veterinarians supervise the line inspectors to assure uniformity in the inspection process and to provide expertise in detecting disease conditions.

There are currently three inspection systems available for broiler processing plants:

a. Streamlined Inspection System (SIS): Allows maximum evisceration line speeds of 70 birds per minute (bpm), with two line inspectors per evisceration line.

b. New Enhanced Line Speeds (NELS): Maximum evisceration line speed is 91 bpm, with three inspectors per evisceration line.

In both systems, mechanical devices called selectors thrust every second or third carcass and associated viscera for an individual line inspector to examine. To achieve and maintain maximum operating evisceration line speeds, the carcass and the visceral organs must be properly presented for inspection. To facilitate inspection, plant workers (presenters) complete the mechanical evisceration process by separating the viscera from the adhering fat tissues and by opening the body cavity for ease of inspection.

c. Recently, new evisceration systems have been introduced in the US, where the viscera is physically separated from the carcass during evisceration and presented in parallel with the carcass for inspection. One such currently USDA approved system allows evisceration line speeds of 140 bpm, with four line inspectors per line. This system does not require presenters for each inspector and provide significant labor savings.

Each line inspector is also provided with a plant helper for removing condemned carcasses, viscera and parts from the evisceration line, retaining questionable carcasses for veterinary disposition, segregating contaminated carcasses (ingesta, fecal, retained yolk, bile) and those carcasses for off-line salvage, marking trimmable lesions for later trim by plant workers down the line, and for recording condemnation number by cause on inspection sheets for each lot. Carcasses and viscera that are allowed to remain on the evisceration line are assumed provisionally inspection passed. After automatic or manual giblet (heart, liver, and gizzard) separation, the carcasses pass through final plant trim station, where plant employees remove defects such as, breast blisters, broken or dislocated bones, blood splashes and bruises, skin sores and scabs, etc.

The inspection regulations provide detailed description of conditions (i.e., physical lay-out of inspection stations, line speed control mechanisms, proper carcass presentation techniques, hand-washing and recording facilities etc.) under which post-mortem carcass inspection is conducted.

3. Condemnation and final disposition: Based on postmortem bird-by-bird examination by line inspectors, carcasses are classified as:

- a. Inspection passed
- b. Trimmed/salvaged/washed and passed
- c. Retained for disposition by the veterinarian
- d. Condemned as whole for any one of the following field and plant related causes:

I. Field causes of whole bird condemnations:

- Tuberculosis
- Leukosis
- Septicemia/Toxemia
- Airsacculitis
- Synovitis
- Bruises

II. Plant causes of whole bird condemnations:

- Cadavers
- Contamination/Mutilation
- Overscalding

4. Sanitary slaughter and dressing: Preventing fecal contamination of the carcasses from spillage of digestive tract contents or smearing of fecal material on edible meat surfaces is the single most important aspect of sanitary slaughter and dressing regulations. The FSIS inspectors monitor picking and evisceration operations to assure minimal contamination of the product. Carcasses contaminated with extraneous material are removed from the evisceration line at the inspection stations and sent to a separate station for reprocessing. Such carcasses are then cleaned by a combination of vacuuming, trimming and washing with water containing 20 ppm chlorine and reinspected prior to chilling. The FSIS has recently introduced "Zero Fecal Tolerance" regulations for carcasses entering the chiller.

5. Poultry chilling: After inspection, giblet harvest and trim, the carcasses classified as ready-to-cook (rtc) are promptly cooled to inhibit bacterial growth in immersion chillers. Depending upon the size of the birds, the internal temperature

of the meat must be reduced to below 4 C within 4 hours (for 2 kg broiler) for fresh product. Similarly, giblets (heart, liver, gizzard, and necks) are chilled in separate immersion chillers to <4 C within 2 hours. The FSIS also monitors scalding and chiller water overflow (1 and 2 liters per bird, respectively), chill water and chilled product temperatures, and regulates the extent of moisture uptake.

6. Plant sanitation: The FSIS inspectors constantly monitor the facilities and equipment for proper sanitation. Sanitation activities include preoperational inspections, as well as maintenance of sanitary conditions during slaughter and processing.

7. Carcass reinspection: After the standard postmortem inspection and trim/salvage operations, samples of carcasses are systematically reinspected (prechill and postchill) by the plant and FSIS inspectors. Evisceration, carcass trim, chilling efficiency, and fecal contamination are evaluated with separate on-line tests under the Finished Product Standards (FPS) system.

8. Residue monitoring: The FSIS inspection activities also include monitoring for drug and chemical residues in animal tissues resulting from the improper use of or accidental exposure to pesticides, herbicides, animal drugs and controlled feed additives, as well as from industrial accidents which may contaminate animal feeds or the environment. Under the umbrella of National Residue Program, the FSIS, Food and Drug Administration (FDA) and Environmental Protection Agency (EPA) cooperate in determining the presence and the level of chemicals found in poultry products. The FDA and EPA prescribe the conditions under which approved chemicals and drugs are approved and used in the poultry production system. Tissue samples are randomly utilized to screen for number of chemicals on the basis of their documented toxicity, exposure and persistence levels.

The FSIS also utilizes plant-operated voluntary Total Quality Control (TQC) programs to monitor further processing facilities, since many companies utilize various process control systems to assure consistency in their products, to comply with the FSIS requirements, and to adhere to their own quality standards.

In addition to in-plant inspection activities, FSIS monitors the meat and poultry supply for wholesomeness and labeling accuracy throughout the food chain (warehouses, brokers, distributors, retail chains etc.). Products unsafe for human consumption are removed from the marketing chain through detention, seizure or recalls. Although vast majority of the plants regulated by FSIS comply with the inspection laws, FSIS uses several enforcement tools (warning letters, criminal prosecution, injunctions, withdrawal of inspection, and plant closing) when violations occur. The FSIS is also responsible for assuring the safety of imported meat and poultry, which must meet the same standards as domestic products. For a country to be eligible to export to US, it must impose inspection requirements at least equal to those enforced in the US. Finally, imported products are re-inspected by FSIS when they enter the US.

In 1996, the FSIS/USDA has introduced the Pathogen Reduction Program. This program introduced four major changes in the meat and poultry inspection programs:

1. Sanitation Standard Operating Procedures (SSOP's): Plants are required to develop SSOP's which itemizes daily pre-operational and operational sanitation tasks, identifies responsibilities, and dictates maintenance of verification records.

2. Pathogen Testing Program: The FSIS has established E.coli performance criteria (tests conducted by the plant) and salmonellae performance standards (tests conducted by the FSIS) for processing plants. The tests will be conducted on whole carcasses after chilling. The performance criteria for E.coli is <100 CFU/ml of rinse fluid (400 ml is used to rinse the whole carcass). Whereas, the performance standard for salmonellae is 20% incidence (determined based on presence or absence of salmonellae per carcass).

3. Zero-fecal tolerance: Presence of fecal material on pre-chill carcasses, originally monitored and tolerated by FPS, is considered unacceptable. The current regulations require two separate pre-chill tests per shift to monitor the presence of fecal material on interior and exterior surfaces of the carcasses.

4. Hazard Analysis Critical Control Points (HACCP) Program: Each plant must develop and implement product specific HACCP plans beginning 1998. HACCP plans must include the 7 steps: hazard analysis, identification of critical control points in the process, critical limits and monitoring procedures, corrective actions, record keeping, and verification. A number of federal, state, and local regulations and guidelines must be incorporated into a HACCP prerequisite programs (Good Manufacturing Programs, Standard Operating Procedures, Food Codes, other policies and procedures) to include personnel and personal hygiene, building and facilities, equipment and utensils, and production and process controls.

References

- Brant, A. W., J. W. Goble, J. A. Hamann, C. J. Wabeck, and R. E. Walters, 1982. Guidelines for establishing and operating broiler processing plants. USDA, Agriculture Handbook No.581.
- Poultry Inspection, 1987. The basis for a risk-assessment approach. Food and Nutrition Board, National Research Council, Washington, DC.
- Meat and Poultry Inspection, 1991. Report of the Secretary of Agriculture to the U.S. Congress, Food Safety and Inspection Service, USDA, Washington, DC.
- Bilgili, S. F., 1993. Poultry Inspection and Grading in the U.S. In: Proc. Int. Poultry Congress, Istanbul, Turkey, 13-14 May. pp.75-81.
- Bilgili, S. F., 1997. Poultry Inspection and grading systems for assuring product wholesomeness and quality in the United States. Proc. European Symp. On the Quality of Poultry Meat, Poznan, Poland, pp. 553-561.

USO DE EMBALAGEM EM ATMOSFERA MODIFICADA PARA CARNE DE AVES

Cibele Omati

Eng^a. de Alimentos, AGA S.A., São Paulo – SP

1. Histórico

Os consumidores modernos são muito exigentes. Eles querem a conveniência de poder escolher nas prateleiras dos supermercados dentre uma gama de produtos frescos, apetitosos e atrativos e ao mesmo tempo não querem que o alimento contenha aditivos ou preservantes.

Estas demandas expressas aqui muito simplesmente, são fatores importantes para o desenvolvimento de embalagem de atmosfera modificada que foi chamada de “o método para preservar a qualidade inerente dos alimentos de crescimento mais rápido”.

Considera-se que o real desenvolvimento para embalagem de atmosfera modificada aconteceu quando a companhia britânica Mark & Spencer lançou carnes embaladas em atmosfera modificada, em 1979. Diferente da carne congelada, os consumidores podiam realmente ver o que eles estavam comprando e diferente também da embalagem à vácuo, a carne estava solta dentro da embalagem e não estava deformada. O lançamento foi um grande sucesso e no prazo de dois anos a linha de produtos deles embalados em atmosfera modificada foi estendida para incluir bacon, costelas, carne cozida fatiada, peixe fresco e defumado e marisco cozido.

Deste começo, o uso da embalagem com atmosfera modificada para produtos resfriados cresceu enormemente, inicialmente na Europa mas depois também em outras partes do mundo, e também diversificou dramaticamente a gama de produtos. Paralelo à este desenvolvimento houve um aumento considerável no uso da técnica de atmosfera modificada para a embalagem de transporte de produtos para o atacado. MAP está também sendo usado para embalagens especificamente preparada para consumo institucional.

A AGA participa do desenvolvimento de embalagem de atmosfera modificada desde princípios dos anos 80 e tem desenvolvido projetos junto com clientes, institutos de pesquisas de tecnologia para alimentos, assim como também com fornecedores de máquinas e material para embalagem.

1. Tecnologia MAP

Todo gênero alimentício começa a deteriorar tão logo sejam colhidos/preparados, ou diretamente após o abate no caso de carnes. Esta perda de qualidade é primariamente causada por deterioração microbiológica e química/bioquímica.

É sabido que trocando-se a atmosfera que envolve o alimento na embalagem, é possível inibir, ou retardar, o processo de deterioração natural, desta forma, aumentando a vida útil daquele produto.

A tecnologia MAP é a reposição da atmosfera que circunda o produto numa embalagem, por um gás, ou mistura de gases, designada a preservar a alta qualidade inerente do produto, por um certo período.

Deterioração microbiológica

A velocidade com que a bactéria se multiplica é influenciado pela temperatura.

A 25-35°C a taxa de crescimento é ótima mas à medida que a temperatura reduz, também se diminui este crescimento. Isso significa que a armazenagem de produtos à temperaturas reduzidas irá limitar o desenvolvimento da maioria das bactérias apesar de existirem bactérias que continuam a crescer mesmo em temperaturas reduzidas.

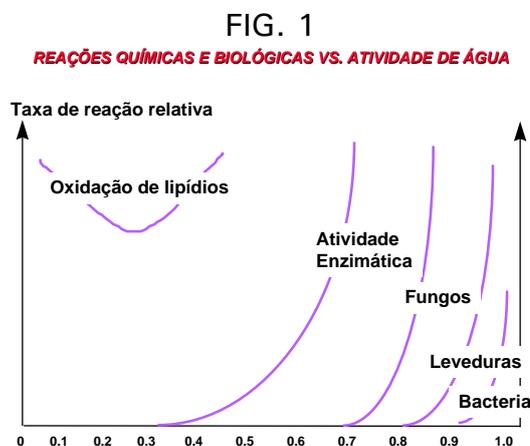
A presença de CO₂ na atmosfera da embalagem inibe o desenvolvimento de *Pseudomonas* e enterobactérias psicrotolerantes, que dominam a microbiota em condições anaeróbicas e sob temperaturas de refrigeração de frango resfriado. Esse mesmo meio propicia o desenvolvimento dos lactobacilos microaerófilos que produzem o ácido láctico.

O ácido láctico além de provocar o abaixamento do pH apresenta efeito inibitório à microbiota proteolítica competitiva.

Reações químicas / bioquímicas

A reação química principal é a oxidação dos ácidos graxos insaturados em gêneros alimentícios tais como castanhas, leite em pó e também em peixe com alto teor de gordura, tornando-os rançosos. O oxigênio pode também quebrar certas vitaminas tais como ácido ascórbico, ou influenciar a atividade enzimática.

Todas estas reações bioquímicas mudam com a chamada atividade de água a_w.



As relações entre atividades de água e as taxas das várias reações químicas e biológicas são mostradas na Fig. 1.

2.1. Fatores intrínsecos da deterioração de produtos alimentícios

Carga microbiana inicial

É importante iniciarmos o processo com uma matéria prima de baixa contagem inicial. Portanto deve-se manter o mais alto padrão de higiene por toda cadeia do processo de forma a limitar o número de bactérias no alimento a ser embalado.

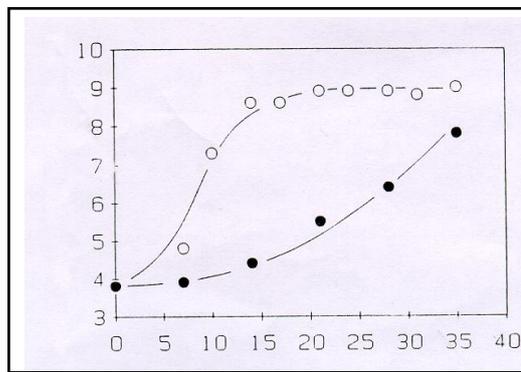


FIG.2 - O efeito de 80% de CO₂ (.) ou ar (o) na contagem microbiana em quartos de galinhas estocados em embalagem alta barreira a 35°F (de Hotchkiss et al. 1985).

pH

Todos os produtos à base de carne, como aves ou carne bovina, suína ou peixe têm um valor de pH natural por volta de 5.0. Um pH mais alto pode ser causado por stress no pré-abate ou pode ser uma indicação de que alguma deterioração já ocorreu. Uma recomendação geral é que carnes com pH de 6,0 ou acima, nunca deve ser considerada para embalagem de atmosfera modificada.

Composição Alimentícia

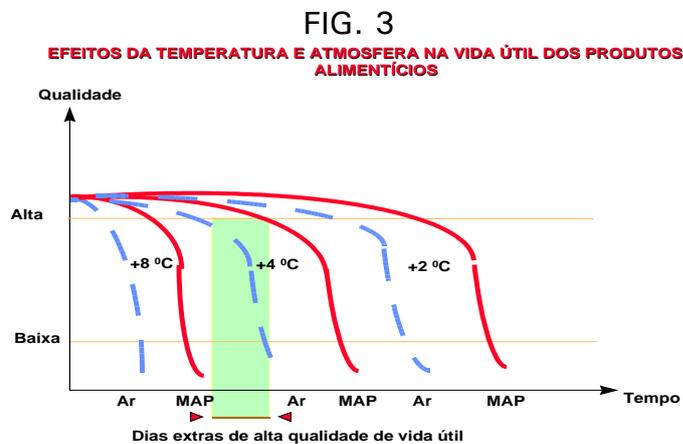
Ao determinar as condições ótimas de embalagem de um produto, um número de fatores relativo ao produto tem que ser levado em conta. Isso inclui o tipo de produto, conteúdo de gordura, conteúdo de água, atividade de água, o tipo de micro-organismos envolvidos e também a vida útil esperada. As condições propostas podem, em alguns casos, refletir o compromisso entre as necessidades conflitantes de diferentes fatores, mas deve sempre fornecer ótimas condições para o produto em questão.

2.2. Fatores Externos da Deterioração de Alimentos

Temperatura

A temperatura é um dos fatores mais importante na extensão da vida útil de qualquer alimento perecível. Se a temperatura correta de armazenagem dos produtos refrigerados não for mantida, ocasionará uma taxa de crescimento microbiológico acelerada, não somente de bactérias deteriorativas mas também possibilitará o crescimento de bactérias patogênicas.

Mesmo quando embalado em atmosfera modificada, a maioria dos produtos alimentícios precisam ser refrigerados e as temperaturas ótimas de armazenagem têm que ser estabelecidas. A próxima figura mostra os efeitos da temperatura de armazenagem na qualidade do produto embalado em ar, e também os dias extras de vida útil ganhos com embalagem de atmosfera modificada.



Produtos MAP que devem ser armazenados à temperaturas de +2 a +6°C dependendo do produto.

3.0. Embalagem de Atmosfera Modificada

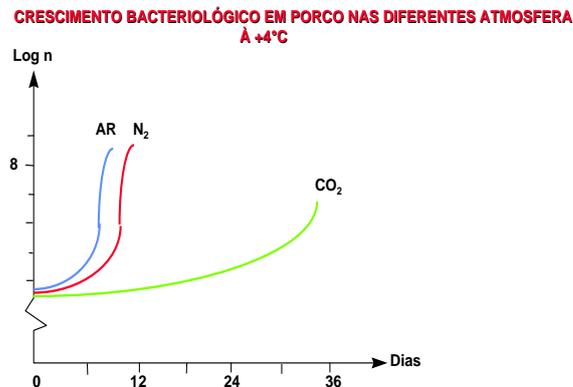
3.1. Gases

Os gases normalmente usados em atmosfera modificada gerada são dióxido de carbono e nitrogênio apesar de que em alguns casos o oxigênio também é usado. Argônio (Ar), hélio (He) e óxido nitroso (N₂O) são aprovados também, e dentro destes, o argônio pode ter uso prático em MAP.

Dióxido de Carbono

Dióxido de carbono é o gás mais importante para MAP já que ele tem um efeito inibidor sobre a taxa de crescimento de bactérias aeróbicas mais comuns, e fungos e leveduras. Sua habilidade de inibir o crescimento bacteriológicos em carne suína comparado com ar e nitrogênio é mostrado na figura seguinte.

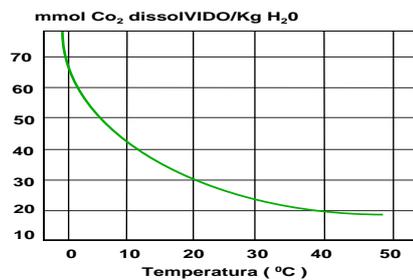
FIG. 4



O mecanismo inibidor ainda não é totalmente entendido, mas pensa-se que isso ocorre devido a dissolução do CO₂ dentro da fase líquida do alimento, reduzindo seu pH e penetrando as membranas biológicas causando mudanças na permeabilidade e função. Desde que a solubilidade do CO₂ aumenta com a diminuição da temperatura como mostra a fig. 4, o gás torna-se mais efetivo em temperaturas de armazenagem reduzida.

FIG. 5

CO₂ SOLUBILIDADE EM ÁGUA



Nitrogênio

Nitrogênio é inerte e tem uma baixa solubilidade em água e gordura. Seu maior uso é deslocar o oxigênio da embalagem de modo a adiar a oxidação.

Previne rancidez oxidativa em produtos com conteúdo de gordura alto, e retarda o crescimento de bactérias aeróbicas. É também usado como gás de preenchimento para prevenir colapso na embalagem.

Oxigênio

Em embalagens de atmosfera modificada os níveis de oxigênio são normalmente mantidos tão baixos quanto possível para inibir o crescimento dos microrganismos deteriorativos e reduzir a velocidade da deterioração oxidativa dos alimentos.

Entretanto há exceções como pois ele é necessário para a respiração de frutas e verduras, manutenção da cor vermelha em carnes e para evitar condições anaeróbicas em pescados.

3.2. Materiais de embalagens

Corretamente selecionados os materiais são de suma importância na embalagem de atmosfera modificada. Deve-se consultar os fornecedores de filmes apropriados a esta tecnologia para informações à respeito das necessidades e condições de uso destes materiais.

Essencialmente existem dois requisitos principais: os materiais devem estar aptos a manterem estáveis as condições dentro da embalagem para maximizar a vida útil, mas eles devem permitir também que o produto seja exposto de um modo atrativo.

Na maioria dos casos, a melhor exposição de produtos significa que o filme transparente deva ser usado, com exceção de produtos com alto conteúdo de gordura. A razão disso é que a velocidade da luz aumenta a oxidação de gorduras e assim, filmes metalizados são indicados para estes produtos.

O filme transparente utilizado para selar muitas embalagens pode parecer simples mas, na verdade, é um produto de alta tecnologia que pode consistir de distintas camadas selecionadas de forma à preencher os requisitos de embalagem de determinado gênero alimentício. Novas tendências são para o uso de camadas de filmes cada vez mais finos.

De suma importância é a permeabilidade a gases e vapor de água do filme. Na maioria dos casos o filme não deve ser permeável e agir como barreira enquanto em alguns casos ele deve permitir a passagem de gases selecionados ou vapores de água ambos de dentro e para fora da embalagem. Para produtos que geram uma grande quantidade de vapor de água como carne de aves e seus derivados, o filme deve ter capacidades "anti fog", de forma que o produto possa ser claramente visto.

Requisitos de qualidade de embalagens MAP devem considerar uma boa termoselabilidade, permeabilidade a gases e vapor de água adequada ao produto, atender às necessidades do ao mercado e finalidade, e ainda deve apresentar resistência mecânica, preservando suas características durante armazenagem, distribuição e manuseio.

3.3. Máquinas de embalagens

Existe dois tipos de máquinas de embalagem: máquinas de diluição gasosa e as conhecidas máquinas de vácuo compensado.

Com as máquinas de diluição gasosa, a atmosfera modificada é injetada imediatamente antes de ser selada a embalagem. Isso permite que a máquina opere numa taxa de produção alta mas a diluição não pode remover o ar totalmente da embalagem, assim, alguns resíduos de oxigênio atmosférico estará presente na embalagem.

Nos outros tipos de máquinas, a embalagem é submetida a vácuo e então a mistura de gases ideal é injetada para quebrar este vácuo. Isso resulta em um nível residual de oxigênio muito mais baixo. Mas a função dupla de fazer e quebrar o vácuo ocasiona que a produção de embalagens deste tipo de equipamentos seja mais baixa que em equipamentos por diluição gasosa.

3.4. Quais são as vantagens do MAP?

A extensão da vida útil do processo MAP dá ao produto mais tempo de vida útil então pode-se otimizar a produção, armazenagem e distribuição. A área de distribuição pode ser ampliada e o nível de retorno de produtos é drasticamente reduzido. Embalando com MAP também se amplia a variedade de produtos que podem ser oferecidos com vida útil compatível com os requerimentos de distribuição e sem risco de perda de qualidade.

Além disto há uma vantagem adicional para o consumidor que é o fato do produto se apresentar solto dentro da embalagem. Para muitos produtos isso pode não ser importante mas se você já tentou separar frios fatiados que foi embalado à vácuo, então voce irá apreciar a facilidade com que produtos MAP podem ser separados.

- Aumento de vida útil permitindo abastecimento menos frequente das prateleiras de varejo
- Redução do desperdício do varejo
- Melhor apresentação - visão clara do produto
- Embalagem higiênica e empilhável, selada e livre do gotejamento e odor do produto.
- Fácil separação dos produtos fatiados
- Pouca ou nenhuma necessidade de conservantes
- Distribuição aumentada e custos de transportes reduzidos devido à entregas menos frequentes
- Permite operação de embalagem centralizada e porções controladas
- Redução na produção e custo de armazenagem devido ao melhor aproveitamento de mão de obra, espaço e equipamento.

Os seguintes aspectos são desvantagens

- custo capital do sistema: máquina de embalar, filmes e gás
- aumento no volume de embalagem
- benefícios de MAP são perdidos a partir do momento que a embalagem é aberta ou perfurada.

4. Um brilhante futuro previsto para MAP

Se nós olharmos para o Reino Unido, o número de embalagens MAP para 1992 foi de 1,9 bilhões e os dados para 1996 são quase 3,4 bilhões. Dentro dos países escandinavos, MAP está bem estabilizado. A Dinamarca produziu quase 400 milhões de embalagens MAP em 1995, na Finlândia MAP ganhou percentual de mercado em embalagens industriais com mais da metade dos produtos sendo embalados por MAP, e na Noruega dados sugerem que mais de 50% de todos os produtos são embalados por MAP.

Se nós compararmos a gama de produtos presente embalados em MAP na Europa com o que foi mostrado em 1990 acima, podemos ver que a quantidade foi ampliada consideravelmente. Carnes cozidas e fatiadas tem se tornado o item principal, peixe fresco e preparado está crescendo rapidamente assim como também saladas preparadas e pratos prontos.

Numa previsão para o mercado de embalagem em cinco países europeus selecionados até o ano 2.000 nós podemos prever que MAP ganhará participação de mercado. Comparado com a fatia de mercado de 8,5% em 1990, esta previsão sugere um aumento para 16% até o ano 2.000.

Espera-se que o volume de produtos embalados em MAP cresça de 569 000 t em 1990 para 1 347 000 t até ano 2.000 (ou até 136%). Em contraste, espera-se que a embalagem à vácuo cresça até 12% e em certos países, especialmente o Reino Unido, a previsão de crescimento do volume total para produtos embalados à vácuo é negativa.

Algumas das razões relatadas para a popularidade do MAP são : investimento relativamente baixo, simples de instalar, uma extensão de vida útil grande e uma apresentação elegante do produto para o consumidor.

A análise também aponta que é necessário pesquisa e desenvolvimento aplicados no setor de alimentos para o desenvolvimento destas técnicas e uma estreita co-operação entre os 3 setores industriais envolvidos no processo: fornecedores de máquinas para embalagens, de gases e de material para embalagens faz-se necessário para a comercialização de MAP.

Isto é algo que a AGA como companhia reconheceu alguns anos atrás e que levou à criação do conceito MAPAX para embalagem de atmosfera modificada.

5. O conceito MAPAX

Como você viu até agora, a embalagem em atmosfera modificada não é somente o caso de injetar uma atmosfera apropriada dentro da embalagem, é muito mais complexo. Esta tecnologia requer conhecimento considerável de higiene básica do alimento a ser embalado, a deterioração de alimentos, dos processos, a influência de temperaturas de armazenagem, as propriedades dos gases e suas misturas para retardar a deterioração, as características dos vários tipos de máquinas para embalagem e as propriedades dos diferentes materiais para embalagens.

O conceito MAPAX consiste de nosso conhecimento profundo de todos estes fatores e suas interações para fornecer ao produtor uma pacote com

recomendações que irá maximizar a manutenção da alta qualidade de seus produtos por muito mais tempo.

Construímos um vasto banco de dados contendo o conhecimento e experiência obtidos através de nossos contatos com pesquisadores de institutos de alimentos, fornecedores de materiais de embalagens, máquinas de embalagens e de equipamento para análise de gás e naturalmente através do estreito contato com os consumidores de MAPAX existentes.

Bibliografia

- Bartholomeu, Darrel Commercial Application Case History: Fresh Retail Poultry Products, 1993
- Baker, RC e Hotchkiss JH. Shelf Life studies of cooked sliced, chicken and turkey breast meat in carbon dioxide and vacuum package
- Day, Brian. Guidelines for the good manufacturing and handling of modified atmosphere packed food products. Campden food & Drink Research Association, 1992
- Hotchkiss, Joseph. Modified Atmosphere Packaging of Poultry and related products
- Mapax - A solução Ideal em Atmosfera Modificada - AGA
- Silas, Clay. Commercial Application Case History: Retail Cooked poultry Products.



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa de Suínos e Aves
Ministério da Agricultura e do Abastecimento
Caixa Postal 21, 89.700-000, Concórdia, SC
Telefone (049) 4428555, Fax (049) 4428559
cnpsa@cnpsa.embrapa.br*

