

ISABELLA DE MATOS MENDES DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO ANÁTOMO-HISTOPATOLÓGICA DE FÍGADOS
DE FRANGOS CONTAMINADOS POR *Escherichia coli*
PROVENIENTES DE MATADOUROS AVÍCOLAS DA BAHIA**

RECIFE

2009

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA

ISABELLA DE MATOS MENDES DA SILVA

CARACTERIZAÇÃO ANÁTOMO-HISTOPATOLÓGICA DE FÍGADOS
DE FRANGOS CONTAMINADOS POR *Escherichia coli*
PROVENIENTES DE MATADOUROS AVÍCOLAS DA BAHIA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciência Veterinária do Departamento de Medicina
Veterinária da Universidade Federal Rural de
Pernambuco, como requisito parcial para obtenção
do grau de Doutor em Ciência Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Joaquim Evêncio Neto

Co-orientador: Prof. Dr. Marcílio Delan Baliza
Fernandes

RECIFE

2009

Ficha catalográfica

S586c Silva, Isabella de Matos Mendes da

Caracterização anátomo-histopatológica de fígados de frangos contaminados por *Escherichia coli* provenientes de matadouros avícolas / Isabella de Matos Mendes da Silva. – 2009.

90 f. : il.

Orientador: Joaquim Evêncio Neto

Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Federal Rural de Pernambuco. Departamento de Medicina Veterinária.

CDD 636.089 601

1. *Escherichia coli*
 2. PCR
 3. Fígado
 4. Frango
 5. Inspeção sanitária
- I. Evêncio Neto, Joaquim
 - II. Título

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA

CARACTERIZAÇÃO ANÁTOMO-HISTOPATOLÓGICA DE FÍGADOS

DE FRANGOS CONTAMINADOS POR *Escherichia coli*

PROVENIENTES DE MATADOUROS AVÍCOLAS DA BAHIA

Tese de Doutorado elaborada por

ISABELLA DE MATOS MENDES DA SILVA

Aprovada em 11/12/2009

Prof. Dr. JOAQUIM EVÊNCIO NETO

Orientador – Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal / UFRPE

Prof. Dr. MARCÍLIO DELAN BALIZA FERNANDES
Co-orientador – Centro de Ciências da Saúde/ UFRB

Prof. Dr. FABRÍCIO BEZERRA DE SÁ
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal / UFRPE

Prof. Dr. JOSÉ VITOR MOREIRA LIMA FILHO
Departamento de Biologia / UFRPE

Prof. Dr. LIRIANE BARATELLA EVÊNCIO
Departamento de Histologia e Embriologia / UFPE

*Aos meus pais, Iésio e Terezinha,
pelo exemplo de caráter, dignidade e fé.
À Ricardo e Júlia,
os amores da minha vida
Dedico.*

AGRADECIMENTOS

A todos que, direta ou indiretamente, colaboraram na realização deste trabalho e de forma especial:

- Ao professor Dr. Joaquim Evêncio Neto, pela orientação e, principalmente, pela atenção, apoio e incentivo;
- Ao professor Dr. Marcílio Delan Baliza Fernandes, pela co-orientação e, especialmente pela ajuda e dedicação;
- A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária (PPGCV) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), pelos ensinamentos na área;
- Ao professor Dr. Luiz Antônio Fávero Filho, diretor do Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), pela concessão do uso das instalações do laboratório de Microbiologia para realização das análises microbiológicas;
- À professora Alessandra Estrela da Silva, pela concessão do uso do Laboratório de Anatomia Patológica da Universidade Federal da Bahia e auxílio no diagnóstico histopatológico;
- À Dra Norma Lucena Cavalcante Licínio da Silva, pela utilização das instalações e material de consumo do Laboratório de Diagnóstico Molecular do Instituto Materno Infantil de Pernambuco (IMIP) para realização da Reação em Cadeia de Polimerase dos isolados de *Escherichia coli*;
- Ao Prof. Dr. Fúlvio Borges Miguel e ao Dr. Victor Luiz Correia pelos ensinamentos na área de histopatologia.
- À Marília Lima Costa, Fiscal Agropecuária da Agência de Defesa Agropecuária da Bahia, pelos conhecimentos de inspeção sanitária e auxílio na coleta das amostras nos matadouros avícolas;
- Ao professor Ricardo Mendes da Silva pelo apoio e incentivo em todas as etapas do trabalho;
- Aos estudantes de Graduação em Nutrição Édila Verônica da Silva Rocha, Larissa Tannus Rebouças, Marcos Pereira Santos e Vilmara Almeida dos Santos pela ajuda na realização das análises microbiológicas e anatomopatológicas.
- À Nancy Silva Santos pelo auxílio nas análises anátomo-histopatológicas.
- À Ana Cláudia Penna de Matos pela colaboração na revisão gramatical.
- À secretária do PPGCV da UFRPE, Edna Chérias, pela disponibilidade e ajuda constante.
- À doutoranda Fernanda da Silva Meirelles pelo companheirismo e auxílio.

Nem tudo que se enfrenta pode ser modificado, mas nada pode ser modificado até que seja enfrentado.

Albert Einstein

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi caracterizar as lesões anátomo-histopatológicas de fígados de frangos contaminados por *Escherichia coli* provenientes de matadouros avícolas da Bahia. Coletou-se 62 amostras de fígados de frangos provenientes de dois matadouros avícolas do Recôncavo da Bahia, sob fiscalização do Serviço de Inspeção Estadual (SIE), sendo 30 fígados com aspecto macroscópico inalterado e 32 fígados com alteração macroscópica que originou o descarte das carcaças pela inspeção da linha B. As alterações que originaram o descarte das carcaças foram Septicemia (36%), seguida por Síndrome ascítica (26%), Colibacilose (19%), Caquexia (13%) e Aerossaculite (6%). As amostras foram coletadas assepticamente, acondicionadas em recipientes estéreis, identificadas, refrigeradas e enviadas ao Laboratório de Microbiologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), sendo imediatamente executadas as análises microbiológicas e avaliação macroscópica. As análises histopatológicas foram realizadas no Laboratório de Anatomia Patológica da Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia (UFBA). Para a análise microbiológica foi realizada a etapa de enriquecimento em caldo de infusão de cérebro coração (*Brain Heart Infusion* - BHI), seguida por semeadura por estrias no Agar McConkey e identificação bioquímica. Os isolados foram estocados em caldo BHI com glicerol a 15% e mantidos a -20 °C para posterior extração do DNA bacteriano e realização da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), a qual foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular do Instituto Materno Infantil de Pernambuco. Trinta cepas de *Escherichia coli* foram isoladas e identificadas dos fígados dos frangos pelo método microbiológico clássico, sendo 21 cepas provenientes de fígados inalterados e nove (9) de fígados oriundos de carcaças que foram rejeitadas. Os 30 isolados de *E. coli* foram oriundos de 27 fígados de frangos, uma vez que ocorreu infecção mista por *E. coli* patogênica para aves (APEC) e *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) em 3 fígados. A cor é um dos parâmetros macroscópicos observados e a mais frequente nas amostras foi a castanho-escura (20/27), considerada satisfatória. A colangio-hepatite (16/27) foi a alteração inflamatória predominante, sendo considerada multifocal em 15/16 fígados. Houve a predominância de heterófilos e mononucleares (12/27) nas amostras analisadas. Foi utilizada a PCR para verificação de genes de virulência de *E. coli*, incluindo o gene de resistência sérica (*iss*) para identificação de APEC; gene para *Shiga cytotoxin 1 e 2* (*stx*) para identificação de EHEC; gene *bfpA* para identificação de *E. coli* enteropatogênica (EPEC) e genes para toxinas LT-I (*elt*) e ST-I (*stI*) para identificação de *E. coli* enterotoxigênica (ETEC). O gene *iss* foi identificado em 83,3% (25/30) das amostras. 76,2% (16/21) dos genes de *iss* identificados foram provenientes de *E. coli* isoladas de fígados oriundos de animais hígidos. O gene *stx* foi identificado em 13,3% (4/30) dos isolados de *E. coli*. Salienta-se que houve a associação entre *stx* e *iss* em três amostras. Não houve a identificação dos genes *bfpA*, *elt* e *stI* nas cepas analisadas. Os genes não foram identificados em um isolado de *E. coli* pelo método clássico. Os critérios de condenação das carcaças foram inadequados, haja vista o isolamento de *Escherichia coli* patogênica em 18/30 fígados oriundos de carcaças consideradas próprias para o consumo humano. Com base nos resultados conclui-se que é necessária a adoção de um protocolo no matadouro avícola, que inclui necropsia, análises microbiológicas e sorológicas de uma amostra de aves rejeitadas e outras aparentemente sadias, permitindo o diagnóstico mais preciso e a identificação de agentes patogênicos e prevenção na granja e matadouro, visando à sanidade avícola e a produção de alimento seguro.

Palavras-Chaves: *Escherichia coli*, PCR, fígado, frango, inspeção sanitária.

ABSTRACT

The aim of this study was to analyze anatomopathological lesions of chicken's liver contaminated with *Escherichia coli* at poultry slaughterhouses. 62 liver samples were collected, under the supervision of the State Inspection Service at two poultry slaughterhouses situated in Recôncavo of Bahia. 30 livers did not show any macroscopic alterations and those who presented (n=32) had their carcass retained for further analyses (inspection line B). Macroscopic alterations included septicemia (36%), ascites (26%), colibacillosis (19%), cachexia (13%) and sacculitis (6%). Collected samples were aseptically packed in sterile containers, and then, they were identified, refrigerated and sent to the Microbiology Laboratory of Healthy Science Center at Federal University of Recôncavo of Bahia where they were immediately carried out for microbiological and macroscopic analyses. Pathological examinations were performed at the Laboratory of Pathology of Veterinary School at Federal University of Bahia. For microbiological analysis step enrichment in Brain Heart Infusion (BHI) were performed, followed by seeding streaks in McConkey agar and biochemical identification. Isolates were stocked in BHI with 15% glycerol and kept at -20°C for later extraction of bacterial DNA to perform the Polymerase Chain Reaction (PCR) performed at the Laboratory of Molecular Biology of the Instituto Materno Infantil de Pernambuco. Thirty *Escherichia coli* were isolated and identified in livers of chickens by classical microbiological method, 21 samples were unchanged and 9 from carcasses were rejected. The 30 *E. coli* isolates were from 27 poultry livers, because of a mixed infection of Avian Pathogenic *E. coli* (APEC) and Enterohaemorrhagic *E. coli* (EHEC) in three samples. Among the observed macroscopic parameters, the most common color of the samples was a dark brown (20/27), which were considered satisfactory. Cholangiohepatitis (16/27) was the predominant in inflammatory change, and was considered multifocal in 15/16 livers. Heterophils and mononuclear cells were predominant (12/27). PCR was performed verifying *E. coli* virulence genes, including the following genes: serum resistance (*iss*), for identification of APEC; Shiga cytotoxin 1 and 2 (*stx*), for identification of EHEC; *bfpA*, for identification of Enteropathogenic *E. coli* (EPEC); LT-I (*elt*) and ST-I (*stI*) toxins, for identification of Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC). There wasn't identification of genes *bfpA*, *elt* and *stI*. *Iss* gene was identified in 83.3% (25/30), and 76.2% (16/21) from *E. coli* strains isolated from livers from healthy animals. *Stx* gene was identified in 13.3% (4/30) of *E. coli* isolates, and in three of these samples were identified *stx* and *iss*. The genes were not identified in one *E. coli* isolated from classic method. The criteria for condemnation of carcasses were inadequate, because pathogenic *Escherichia coli* presence in 18/27 liver samples analyzed were from apparently healthy animals. It is necessary to adopt a protocol in the poultry slaughterhouses, which included necropsy, microbiological and serological analysis of a sample from rejected and healthy poultry, allowing a more accurate diagnosis and identification of pathogens. Safety procedures in farms and slaughterhouses are remarkable necessary for poultry health and safe food production.

Keywords: *Escherichia coli*, PCR, liver, chicken, sanitary inspection.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Fotografia de fígado de frango sem alteração macroscópica proveniente de matadouro avícola da Bahia sob inspeção estadual.	23
Figura 2 -	Imagem representativa da localização anatômica do fígado de frango (GETTY, 1986).	23
Figura 3 -	Fotografia de carcaça de frango proveniente de matadouro avícola da Bahia sob inspeção estadual com condenação total da carcaça por colibacilose com alterações macroscópicas no fígado.	34
Figura 1 – Artigo 1	Fotografia de fígados de frango provenientes de matadouro avícola da Bahia sob inspeção estadual (Fígado 1: Sem alteração; Fígado 2: Condenação total da carcaça por colibacilose, Fígado 3: Condenação total de carcaça por septicemia).	67
Figura 2 – Artigo 1	Figura 2 – Fotomicrografia de fígado de frango com presença de <i>Escherichia coli</i> . Observar colangite com presença de heterófilos e mononucleares, aumento 110X, coloração H-E (a); infiltrado mononuclear e hiperplasia periductal, aumento 430X, coloração H-E (b); necrose liquefativa, aumento 430X, coloração H-E (c); microabscesso associado ao espaço porta e destruição da arquitetura ductal (seta), aumento 430X, coloração H-E (d).	68
Figura 1 – Artigo 2	Fotografia do gel de agarose a 2% da PCR para gene <i>iss</i> das amostras de <i>E. coli</i> isoladas de fígados de frangos. Tamanho do fragmento 760pb, PM Peso Molecular 100pb, amostras positivas 1-13.	85
Figura 2 – Artigo 2	Fotografia do gel de agarose a 2% da PCR para gene <i>stx</i> das amostras de <i>E. coli</i> isoladas de fígados de frangos. Tamanho do fragmento 227pb, CN controle negativo, PM Peso Molecular 100pb, CP controle positivo, amostras positivas 1,3 e 6.	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Artigo 2	Componentes da PCR	77
Tabela 2 – Artigo 2	Sequência dos <i>primers</i> , tamanho dos fragmentos amplificados e condições usadas na PCR para detecção de genes associados à virulência	78

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABEF	Associação Brasileira dos Produtores e Exportadores de Frangos
APEC	<i>Escherichia coli</i> patogênica para aves
APPCC	Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
BPF	Boas Práticas de Fabricação
DAEC	<i>Escherichia coli</i> que adere difusamente
EaggEC	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
EIEC	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica
HE	Hematoxilina e Eosina
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
NMEC	<i>Escherichia coli</i> de meningite neonatal
PCC	Pontos Críticos de Controle
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
PPHO	Procedimento Padrão de Higiene Operacional
REDEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica para coelhos
RT-PCR	Reação em cadeia de transcrição reversa
SEAGRI	Secretaria de Agricultura, Irrigação e Reforma Agrária
SIE	Serviço de Inspeção Estadual
SIF	Serviço de Inspeção Federal
SISBI/POA	Sistema Brasileiro de Inspeção de Produtos de Origem Animal
TSI	Tríplice Açúcar Ferro
UBA	União Brasileira de Avicultura
UPEC	<i>Escherichia coli</i> uropatogênica
TBE	Tris-Borato EDTA
TAE	Tris-Acetato EDTA

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVOS	13
3	REVISÃO DE LITERATURA	14
3.1	CONSIDERAÇÕES SOBRE A AVICULTURA NO MUNDO, NO BRASIL E NA BAHIA	14
3.2	A INSPEÇÃO SANITÁRIA NOS MATADOUROS AVÍCOLAS	16
3.3	ASPECTOS ANÁTOMO-HISTOFISIOLÓGICOS DOS FÍGADOS DE FRANGOS	22
3.3.1	Anatomia do fígado de frango	22
3.3.2	Histologia do fígado de frango	24
3.3.3	Fisiologia do fígado de frango	25
3.4	CONSIDERAÇÕES SOBRE A CONTAMINAÇÃO DE FÍGADOS DE FRANGOS POR <i>Escherichia coli</i>	29
3.4.1	Características da família <i>Enterobacteriaceae</i>	29
3.4.2	<i>Escherichia coli</i> em aves	30
3.4.3	Caracterização genética de <i>Escherichia coli</i>	37
4	REFERÊNCIAS	41
5	ANEXOS	49
6	ARTIGOS CIENTÍFICOS	52
6.1	CARACTERIZAÇÃO ANÁTOMO-HISTOPATOLÓGICA DE FÍGADOS DE FRANGOS CONTAMINADOS POR <i>Escherichia coli</i> PROVENIENTES DE MATADOUROS AVÍCOLAS	52
6.2	CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DOS ISOLADOS DE <i>Escherichia coli</i> PROVENIENTES DE FRANGOS DE CORTE DA BAHIA.	73
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	90

1 INTRODUÇÃO

Com uma população se aproximando aos sete bilhões de habitantes, o Planeta Terra demanda nutrientes e, dentre estes, as proteínas, assim, há uma busca constante por fontes protéicas econômica e ecologicamente sustentáveis. Dentre essas diversas alternativas, a produção de carne de aves, em especial a de frango, apresenta-se como sendo uma das mais interessantes. Segundo a Secretaria de Agricultura, Irrigação e Reforma Agrária, SEAGRI (2008) a avicultura é, certamente, a atividade mais dinâmica do setor agropecuário e pode também ser explorada em pequenas áreas de terra em modernos sistemas integrados, de elevada eficiência.

O consumo de carne de frango vem aumentando em todo o mundo e a elevação da oferta, que vem atendendo a essa crescente demanda, deve-se a alguns fatores como: melhoramento genético mais veloz, visto que a distância entre gerações é muito pequena se comparada com outras criações; estudos aprofundados sobre nutrição e convertibilidade, desenvolvendo dietas especiais para várias etapas da vida destes animais, o que os torna extremamente eficientes ao transformar alimento em massa corpórea; gestão e processamento de todas as etapas da produção, com auxílio tecnológico intenso e aperfeiçoamento no manejo operacional e sanitário dos rebanhos, desde a postura até o abate e comercialização (ABEF, 2009).

Entretanto, como em qualquer atividade que se expande e se intensifica, a avicultura, em especial a industrial, tem novos desafios, como atender vários povos, com peculiaridades culturais e geográficas diversas e sempre com elevados níveis de excelência em qualidade de produtos, em diversos aspectos, sendo o sanitário o mais básico e importante de todos.

Infecções causadas por *Escherichia coli* são responsáveis por prejuízos econômicos na indústria avícola, sendo a colibacilose frequentemente associada à mortalidade embrionária e do plantel, pior conversão alimentar, menor desenvolvimento corpóreo e custos com

medicamentos, além do aumento da condenação de carcaças devido às lesões por colisepticemia (ANDREATTI FILHO, 2006).

Dessa forma, os processos produtivos, cada vez mais intensos e velozes, demandam controle e fiscalização da sanidade mais eficientes e sempre baseados em conhecimento científico, posto que pequenas falhas podem gerar grandes perdas financeiras, e o pior, produzir agravos à saúde para uma maior quantidade de pessoas ao redor do mundo globalizado.

A fiscalização e controle da sanidade em carne de aves no Brasil estão baseados em normas federais, que utilizam parâmetros físicos macroscópicos para permitir ou descartar parcial ou totalmente a carcaça dos animais para o consumo humano (BRASIL, 1998). Assim, os fiscais agropecuários avaliam, prioritariamente, aspectos visuais das carcaças nas linhas de produção dos matadouros avícolas utilizando alguns órgãos como parâmetros para essas avaliações.

O fígado das aves, assim como o de outras espécies, é o órgão que pode modificar seu aspecto em decorrência de ação de fatores químicos e/ou microbiológicos diretamente em seu parênquima, ou em outros órgãos que demandem as suas atuações como regulador ou detoxificador (MACLACHLAN e CULLEN, 1998). Entretanto, nem todas as patologias, sejam de origem microbiológica ou química, geram alterações macroscópicas no órgão e é possível que nem todos os que estejam alterados visualmente possam servir de parâmetro para descartar tão precioso produto como a carne de uma ave.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar as lesões anátomo-histopatológicas de fígados de frango contaminados por *Escherichia coli* provenientes de matadouros avícolas da Bahia.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar as alterações anatomopatológicas e histopatológicas dos fígados de frango contaminados com *Escherichia coli*.

Verificar a ocorrência de *Escherichia coli* em amostras de fígados de frangos com alterações macroscópicas e inalterados através dos métodos clássicos.

Realizar a caracterização genotípica dos isolados de *Escherichia coli* por meio de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR).

Avaliar se os frangos contaminados com *Escherichia coli* são descartados pela inspeção do fígado.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 CONSIDERAÇÕES SOBRE A AVICULTURA NO MUNDO, NO BRASIL E NA BAHIA.

A importância da indústria avícola como fornecedora de proteína animal de baixo custo levou a criação de frangos de corte a ter forte impacto a nível internacional. Os avanços na área de nutrição, genética, manejo e sanidade tornaram a avicultura a atividade pecuária de maior crescimento das últimas décadas (JACOBSEN e FLÔRES, 2008).

Existem algumas razões que determinam o aumento do consumo da carne de aves. Segundo o consenso de alguns consumidores, médicos e nutricionistas, a carne de aves é mais saudável que a carne vermelha. Isso está associado ao fato de que a primeira contém menos gordura saturada, apontada como a grande responsável por problemas cardíacos em seres humanos. Além de saudável, é um alimento altamente nutritivo, uma vez que uma porção de 100 gramas de filé de peito sem pele contém apenas 110 kcal e 23 gramas de proteína e com essa quantidade o consumidor estará satisfazendo 46% de suas necessidades diárias de proteínas (MENDES, 2002; ABEF, 2009).

O consumo mundial de frango deverá provavelmente crescer nos próximos anos mais do que a demanda por carne suína e até a bovina. A principal razão é que as carnes de aves vão continuar sendo a mais barata, uma vez que os preços recordes das rações elevarão ainda mais

o preço da carne vermelha, acredita Robert Feldman, chefe de pesquisa econômica do Morgan Stanley, em Tóquio. (MONTROYA e FINAMORE, 2006).

Segundo a Associação Brasileira dos Produtores e Exportadores de Frangos (ABEF) em 2008 foram produzidos 71,2 milhões de toneladas de carne de frango. O Brasil, como maior exportador mundial desde o ano de 2004, contribui com aproximadamente 15,3% desse total (ABEF, 2009). Patrício (2007) relata que o desenvolvimento da avicultura brasileira está baseado em técnicas modernas de manejo, melhoramento genético, nutrição e controle sanitário. O frango brasileiro chega até 1,5kg em apenas 23,5 dias atingindo uma velocidade de ganho de peso de 2,5g/h revelando assim a melhor conversão alimentar e o ciclo produtivo mais curto além de menor taxa de mortalidade, da padronização dos lotes, do maior rendimento das carcaças e conseqüentemente maior lucratividade, o que estimula o produtor rural. À idade de abate, 44,5 dias, o frango no Brasil pesa 2,5kg, um ganho de 19,2% em relação aos números obtidos em 1990.

O Brasil iniciou sua produção intensiva de aves na década de 60 e atualmente é o terceiro maior produtor e o primeiro exportador mundial de carne de frango, sendo o Paraná o maior produtor e exportador do Brasil, com a produção aproximada de um milhão de toneladas de carnes e produtos industrializados em 2008 (UBA, 2009). O consumo *per capita* passou de 2,3kg, em 1971, para 38,9kg em 2008, tornando o Brasil o quarto maior consumidor de carne de frango no mundo. Em 2008 foram produzidos 10,97 milhões de toneladas com 33,27% desse total destinado ao mercado externo, sendo produzidas 5,18 bilhões de aves (ALCOCER et al., 2006; ABEF, 2009).

A avicultura brasileira não só adquiriu a capacidade de produzir o quilograma de carne de frango mais barato do mundo, como também a capacidade de produzir e vender produtos avícolas de uma excepcional qualidade física, inquestionável qualidade sanitária, que são capazes de atender simultaneamente, às muitas especificações de seus clientes em mais de 150 países aos quais exporta (NUNES, 2006). Salienta-se que o Brasil já iniciou o desenvolvimento do sistema de rastreabilidade na cadeia de carne de aves, para cumprir, principalmente, os regulamentos dos países importadores, o que garante um valor agregado à carne (NAAS, 2002), haja vista que a rastreabilidade é hoje um pré-requisito para os sistemas

de segurança alimentar, permitindo, por exemplo, conhecer a origem dos ingredientes de um produto, assim como o caminho e o destino desse produto final, facilitando a identificação e segregação de lotes de produtos ou populações de animais afetados (MAIA e DINIZ, 2009).

Andreatti Filho (2006) relata que as monitorações devem ser adequadas para estabelecer as linhas de base e objetivos da empresa com determinação da presença de infecções, identificando desafios de campo e imunocompetência das aves, níveis de imunidade materna, biossegurança e eficiência dos programas vacinais.

A avicultura de corte na Bahia, especificamente na microrregião de Feira de Santana, apresenta vantagens comparativas e competitivas em relação a outras regiões do Estado. Encontra-se numa situação privilegiada, por dispor de recursos humanos e materiais, quantitativa e qualitativamente em abundância e com perspectivas de se tornar, com o complexo agroindustrial avícola, o maior pólo produtor de frango de corte do Nordeste, em condições de suprir o mercado interno e promover a exportação para países da África, Ásia e Europa (SEAGRI, 2009a).

Na safra de 2008 a Bahia produziu 6,1 milhões de toneladas de grãos, sendo 1,9 milhões de toneladas de milho e 2,5 milhões de toneladas de soja (SEAGRI, 2009b). O aumento sucessivo na produção de grãos de milho e soja na Bahia, sobretudo na região oeste, tornou-se o fator de maior importância no desenvolvimento da avicultura no Estado (SEAGRI, 2008).

Com um plantel estimado em 99 milhões de cabeças de frango, com crescimento médio de 9,9 milhões de pintos ao mês, o estado da Bahia ainda representa 1,98% da produção nacional de frango (UBA, 2008).

3.2 A INSPEÇÃO SANITÁRIA NOS MATADOUROS AVÍCOLAS

De acordo com França (2007), produzir alimentos seguros é premissa fundamental, não constituindo diferencial de mercado, uma vez que atender aspectos relacionados à ausência de patógenos e resíduos associados à carne de frango é condição determinante da participação no

comércio internacional. Assim, a elevação dos níveis de controle e prevenção da contaminação em todos os pontos da cadeia produtiva é fundamental para o futuro do negócio da avicultura, pois o mercado nacional, e, sobretudo o internacional, exigem que toda a cadeia produtiva atinja padrões de seguridade sanitária elevadíssimos.

O serviço oficial permanente de inspeção sanitária dos matadouros avícolas, representado pelo Serviço de Inspeção Federal (SIF) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e suas representações estaduais e municipais, constituem órgãos responsáveis pela garantia de qualidade da carne e vísceras para o consumo. Os encarregados da inspeção, médicos veterinários, realizam a inspeção *ante mortem*, que compreende o exame visual dos lotes de aves destinadas ao abate, bem como o conjunto de medidas adotadas para a habilitação das mesmas ao processamento industrial (BRASIL, 1952; BRASIL, 1998). De modo geral, as aves que se apresentam em estado agudo de uma enfermidade apresentam temperatura corporal anormal, debilidade e muitas vezes sinais e sintomas específicos de doenças. No entanto, é rara a evidência dessas alterações naqueles animais que se recuperam, o que inviabiliza o julgamento de suas carcaças apenas com a realização do exame *ante mortem*. Assim, nesses casos, o julgamento é obtido pelo exame *post mortem* (SILVA, 2005). O exame *post mortem* é realizado nas linhas de inspeção, que são pontos na seção de matança, especificamente na calha de evisceração (BRASIL, 1998; GOMIDE, RAMOS e FONTES, 2006).

Existem três linhas de inspeção nos matadouros avícolas: A, B e C. A primeira linha de inspeção, Linha A, é onde se realiza o exame interno das aves, através da visualização da cavidade torácica e abdominal (celomática) e dos órgãos a elas pertencentes, como sacos aéreos, pulmões rins e órgãos sexuais. Na segunda linha de inspeção, Linha B, é realizado o exame das vísceras, como coração, fígado, moela, baço, intestinos, ovário e oviduto nas poedeiras. A terceira linha de inspeção, Linha C, é onde se realiza a observação das superfícies externas como pele e articulações. (BRASIL, 1998). Gomide, Ramos e Fontes (2006) ressaltam que cada linha deve respeitar o tempo mínimo de inspeção de dois segundos por ave. Caso sejam detectadas afecções, as quais indiquem a necessidade de exames mais acurados, a velocidade de abate ficará condicionada a perfeita execução dos trabalhos de

inspeção. As carcaças que não atendem ao padrão são desviadas para o Departamento de Inspeção.

Na inspeção *post mortem* é realizado o exame visual macroscópico de carcaças e vísceras e, conforme o caso, palpação e cortes (BRASIL, 1998). Prata e Fukuda (2001) citam que, agindo dessa forma, procura-se avaliar o estado sanitário das carcaças, pois enquanto a visualização cuidadosa promove uma estimativa da sanidade, a palpação oferece elementos indispensáveis à complementação dessa informação fornecendo indicações de problemas e anormalidades ósseas, musculares e mesmo de órgãos.

Durante o processo de evisceração é realizada a eventração, que consiste na exposição das vísceras, sem a sua remoção da carcaça, para a inspeção *post mortem*. Essa exposição deve ser feita cuidadosamente, para evitar o rompimento dos órgãos, o que provocaria a contaminação da carcaça (GOMIDE, RAMOS e FONTES, 2006).

O resultado desses exames, aliados às condições observadas durante o exame *ante mortem*, geralmente é suficiente para o estabelecimento de um diagnóstico e para adoção de um critério de julgamento final, ainda que muitas vezes baseado apenas em alterações macroscópicas (PRATA e FUKUDA, 2001).

O fígado é inspecionado durante os trabalhos de evisceração (Linha B) e os critérios de condenação de vísceras de frango, especialmente do fígado, consideram o aspecto visual (cor, forma e tamanho), consistência e odor do órgão (BRASIL, 1998). Dessa forma, Randall e Reece (1996) afirmam que o conhecimento das características do órgão é fundamental para correta avaliação sanitária das carnes de aves. Muitas lesões do fígado não são específicas, bem como as causas das mesmas, porém elas proporcionam uma importante informação sobre os diversos processos patológicos e, em muitas espécies de aves, é o primeiro e o maior órgão interno a ser visto na necropsia quando a cavidade corporal é aberta.

Segundo Gomide, Ramos e Fontes (2006) as lesões porventura constatadas nos órgãos determinam um novo detalhamento do exame da carcaça, seguindo-se o emprego de provas complementares, como o exame bacteriológico. Andreatti Filho (2006) cita que o laboratório

é uma ferramenta auxiliar para os técnicos na prevenção, no diagnóstico e no tratamento de doenças. O autor ressalta que os dados são importantes para proporcionar informações epidemiológicas para definição de fontes comuns de infecção.

Utilizando os critérios de julgamento é possível chegar às decisões sanitárias das carnes destinadas ao consumo humano, que de acordo com a legislação brasileira são: aprovação total, aprovação com restrições ou sob condições, condenação parcial e a condenação total (BRASIL, 1952; BRASIL, 1998).

Dentre as causas que determinam a apreensão das aves, e posterior condenação da carcaça, destacam-se aerossaculite, caquexia, colibacilose, septicemia e síndrome ascítica (BRASIL, 1998).

Nos Estados Unidos da América (EUA), as doenças respiratórias são as principais responsáveis pela mortalidade e pelas condenações na indústria avícola. Os produtores e os especialistas em sanidade avícola consideram as doenças respiratórias, como as de maior significado econômico. Quase a totalidade das condenações nos matadouros nos EUA é devida a aerossaculite e septicemia que, na sua maioria, são alterações decorrentes de doenças respiratórias ocasionadas por infecção pela bactéria *Escherichia coli* (NCRA, 2009).

Ansari-Lari e Rezagholi (2007) pesquisaram as causas de condenação de carcaças no sul do Irã durante o período de 2002 a 2006 e a caquexia e septicemia foram as causas mais comuns de rejeição das carcaças, sendo responsáveis por 62% das condenações do total de 959.416 aves (0,73%).

No Brasil, Silva (2005) estudou as principais causas de condenação total de carcaças de aves a partir das notificações de inspeção *post mortem* ocorridas em um matadouro avícola da Bahia sob Inspeção Federal durante o período de outubro de 2004 a setembro de 2005 e a quantidade de carcaças que sofreram condenação total foi de 240.755, o que representa uma parcela de 0,68% do total de aves abatidas nesse período. Dentre as alterações que determinaram o maior número de reprovação total da carcaça, destaca-se o aspecto repugnante (34,43%), a caquexia (21,34%) e a aerossaculite (16,93%).

Minharro et al. (1999) registraram um aumento considerável do número de aves abatidas no estado de Goiás em abatedouros com SIF durante três anos e as principais causas de condenação registradas no período foram a colibacilose e a aerosaculite.

Jacobsen e Flôres (2008) constataram que 8,19% do total de carcaças oriundas de estabelecimentos registrados pelo SIF no Estado do Rio Grande do Sul entre 2002 e 2006 foram condenadas devido a síndrome ascítica, o que representa um prejuízo estimado em 3,6 milhões de reais.

Giotto et al. (2008) avaliaram o impacto econômico de condenações *post mortem* parciais e totais de frangos em um matadouro frigorífico de Inspeção Federal localizado na região sul do Brasil, no período de um ano, obedecendo aos critérios de condenações estipulados pelo SIF. Os resultados obtidos demonstraram que as condenações totais por causas patológicas de maior ocorrência foram por aspecto repugnante, ascite e colibacilose e as condenações parciais por causas patológicas mais frequentes foram por dermatose, artrite e celulite. O custo de produção total dos frangos no período de estudo foi de aproximadamente 159,4 milhões de reais, e as perdas econômicas em decorrência das condenações foram de aproximadamente 3,7 milhões de reais.

Vieira-Pinto et al (2003) acompanharam a inspeção *post mortem* de 49.121 aves abatidas em matadouro, registraram as causas de rejeição total e realizaram necropsia e análise histopatológica de uma amostra das aves rejeitadas, objetivando o conhecimento da relação entre as causas que conduzem a uma rejeição total das carcaças de aves e o quadro lesional identificado no decurso da necropsia das aves rejeitadas. Foram rejeitadas 344 aves durante as 12 visitas realizadas em um mês, e foi realizada necropsia de 26 aves, seguida de análise histopatológica de órgãos, como fígado e coração. As causas que contribuíram para uma maior rejeição *post mortem* na linha do abate foram traumatismo, caquexia e síndrome ascítica, nos frangos de corte, má-sangria, nos frangos do campo e salpingite, nas galinhas poedeiras. Foi constatado que os frangos rejeitados com ascite apresentavam lesões no fígado e/ou coração, salientando-se que as lesões hepáticas dificultam o retorno venoso. Os autores enfatizam a importância da necropsia de uma amostra de aves rejeitadas por causas inespecíficas, como caquexia, má-sangria e ascite, permitindo a tomada de decisão mais

conveniente para um maior entendimento do problema para resolução do mesmo, como a necropsia de um maior número de aves e análises microbiológicas e sorológicas.

Santana et al. (2008) citam que para a qualidade do produto final deve ser implantado o controle sanitário e operacional na indústria, assim como deve existir um controle da densidade populacional na granja, recomendando que o número máximo de aves seja 15 por m².

De acordo com as novas exigências de segurança alimentar, o sistema de inspeção é realizado em conjunto com as práticas de garantia de qualidade, baseado nos princípios de Boas Práticas de Fabricação (BPF), no Procedimento Padrão de Higiene Operacional (PPHO) e na Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC), que conferem um controle minucioso sobre todo o processo. Esses procedimentos têm por objetivo a redução dos riscos de ocorrência de perigos químicos, físicos e biológicos, visando à inocuidade dos alimentos produzidos mediante o controle do sistema de produção (BRASIL 1997; BRASIL, 2002).

Carvalho, Costa e Carvalho (2002) elaboraram um plano APPCC em uma linha de produção de frango inteiro congelado, de uma indústria avícola situada no Estado do Rio de Janeiro e concluíram com a determinação de 5 (cinco) pontos críticos de controle (PCC) biológicos, nas etapas de pré-resfriamento da moela, do fígado, coração e nas etapas de pré-resfriamento das carcaças no primeiro e segundo estágio. Salienta-se que na análise dos perigos biológicos a *E. coli* patogênica foi citada em todas as etapas do processo. O sistema APPCC passou a ter base legal no Brasil com a Portaria 46 de 10/02/1998, do MAPA (FRANÇA, 2007).

Dey et al. (2003) estabeleceram um sistema de inspeção baseado em espectroscopia e detectaram septicemia em 96% dos fígados de frangos, como parte do APPCC baseado em um modelo de inspeção para diferenciar frangos normais dos frangos com septicemia/toxemia.

Para aumentar a qualidade dos produtos das indústrias cadastradas no Serviço de Inspeção Estadual (SIE), de modo a garantir segurança alimentar para a população e acesso dos produtores a mercados competitivos, a Bahia aderiu ao Sistema Brasileiro de Inspeção de

Produtos de Origem Animal (SISBI/POA) do MAPA. Parte do processo para adequação dos estabelecimentos do sistema estadual ao SISBI, a Portaria nº 290/2008, reitera a importância da aplicação das BPFs. Os estabelecimentos que optarem pela adesão ao SISBI/POA deverão obrigatoriamente possuir sistema de BPF previamente implantado. A não implantação das BPFs no prazo estabelecido implicará no cancelamento do registro de estabelecimentos junto ao SIE (BAHIA, 2008).

Por conseguinte, a condenação de carnes e vísceras impróprias para o consumo visa zelar pela saúde pública, uma vez que a carne de frango e seus subprodutos são uma das mais importantes fontes de enfermidades transmitidas por alimentos (JAY, 2005).

3.3 ASPECTOS ANÁTOMO-HISTOFISIOLOGICOS DOS FÍGADOS DE FRANGOS

3.3.1 Anatomia do fígado de frango

Benez (2004) e Dice, Sack e Wensing (2004) relatam que nas aves adultas o fígado é de cor castanho-escura (cor de vinho) (Figura 1), exceto nas duas primeiras semanas depois da eclosão, quando adquire uma coloração amarela, oriunda dos pigmentos da gema, que continuam a ser absorvidos do intestino antes que o saco vitelino finalmente regrida.

O tamanho do fígado em relação à massa corpórea varia conforme o animal e no caso da galinha é de 1:37 (GURTLER, 1987). Apresenta dois lobos (direito e esquerdo) ligados cranialmente por uma ponte dorsal ao coração, localizados logo abaixo do osso esterno (Figura 2). Em notável contraste com os mamíferos, as aves não têm diafragma; portanto os lobos do fígado, em vez dos pulmões, rodeiam a porção caudal do coração (GETTY, 1986; DICE, SACK e WENSING, 2004).



Figura 1 – Fotografia de fígado de frango sem alteração macroscópica proveniente de matadouro avícola da Bahia sob inspeção estadual.

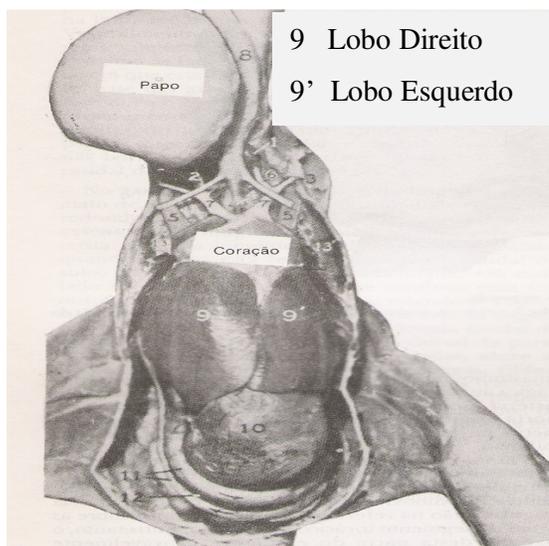


Figura 2 - Imagem representativa da localização anatômica do fígado de frango (GETTY, 1986).

O lobo direito é maior, apresentando a vesícula biliar em sua superfície visceral, sendo atravessado pela veia cava caudal. O lobo esquerdo é subdividido em parte lateral e medial através de uma profunda incisão, *incisura lobaris*. A superfície parietal é convexa e fica contra as costelas esternais e o esterno; portanto fica exposta quando os músculos peitorais e o

esterno são removidos, no exame *post-mortem*. A superfície visceral é côncava e fica em contato com o baço, o proventrículo, a moela, o duodeno, o jejuno e o ovário (ou o testículo direito). Dois ductos biliares, um de cada lobo, penetram na extremidade distal do duodeno, perto dos ductos pancreáticos; somente o ducto oriundo do lobo direito é ligado à vesícula biliar. Exceto próximo ao hilo, os lóbulos hepáticos são indistintos, devido à ausência de tecido conjuntivo perilobular (DICE, SACK e WENSING, 2004; BELS, 2006).

Os vasos sanguíneos aferentes do fígado penetram no órgão através de uma fissura transversal na face visceral e são: as artérias hepáticas direita e esquerda trazendo sangue direto do coração e as veias porta hepáticas direita e esquerda trazendo nutrientes e substâncias absorvidas principalmente pelos intestinos. A artéria esquerda é uma parte do ramo esquerdo da artéria celíaca, enquanto a artéria direita origina-se diretamente do ramo direito da artéria celíaca, sendo a artéria hepática direita supridora de ambos os lobos do fígado e da vesícula biliar; as veias porta hepáticas direita e esquerda também drenam sangue para o órgão, sendo que a direita traz sangue do duodeno, do pâncreas, do íleo e dos cecos através da veia mesentérica cranial, e do reto através da veia mesentérica caudal. A veia porta esquerda drena o sangue de partes do estômago. O fígado é drenado em sua maior parte por duas veias hepáticas que se unem à veia cava caudal ao fígado. (GETTY, 1986; BENEZ, 2004)

Os nervos do fígado são originados dos plexos das artérias hepáticas direita e esquerda, sendo o direito mais desenvolvido, além de ramos do nervo vago que passam para o lobo direito das aves. (GETTY, 1986). O órgão possui dupla inervação: as fibras simpáticas provenientes do nervo esplênico, que se relacionam através do gânglio celíaco e as fibras parassimpáticas provenientes do nervo vago (GÜRTLER, 1987).

3.3.2 Histologia do fígado de frango

O componente estrutural básico do fígado é a célula hepática ou hepatócito (Gr. *hepar*, fígado + *Kytos*, célula). Os hepatócitos são células poligonais que estão bem próximas umas das outras. A superfície de cada hepatócito está em contato com a parede do capilar sinusóide por meio do espaço perissinusoidal (espaço de Disse), e com a superfície de outros hepatócitos. Junções comunicantes do tipo *gap* são freqüentes formando placas anastomosantes de células

e exercendo funções importantes na comunicação intercelular. As distâncias que essas células estão em relação ao espaço porta determinam diferenças em suas características estruturais, histoquímicas e bioquímicas. Por sintetizar ativamente proteínas, os hepatócitos possuem em abundância ribossomos livres, retículo endoplasmático granular e aparelho de Golgi. A grande quantidade de energia demandada para esses processos faz com que os hepatócitos possam conter até 2.000 mitocôndrias, o que lhes confere coloração eosinofílica quando corados com hematoxilina e eosina (HE), além de um rico complemento de endossomos, lisossomos, e peroxissomos (GARTNER e HIATT, 2007; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

Santos (1986) e Junqueira e Carneiro (2004) relatam que os hepatócitos estão radialmente dispostos no conceito do lóbulo hepático clássico baseado no fluxo sanguíneo, da periferia para a veia central situada no centro do lóbulo. As células hepáticas se dispõem em traves ou trabéculas que se arrumam de forma radiada em torno daquela veia centrolobular. Essas células se anastomosam livremente formando um labirinto semelhante a uma esponja. Os espaços entre essas placas contêm capilares chamados sinusóides hepáticos, que são vasos irregulares compostos por uma camada descontínua de células epiteliais fenestradas. Dessa maneira, partículas com menos de 0,5µm de diâmetro podem deixar a luz do sinusóide com relativa facilidade. Macrófagos fixos, denominados de células de Kupffer, estão associados às células de revestimento endotelial dos sinusóides e suas principais funções são: metabolizar eritrócitos velhos, digerir hemoglobina, secretar proteínas relacionadas com processos imunológicos e destruir bactérias que eventualmente penetrem no sangue portal através do intestino grosso (Anexo A).

3.3.3 Fisiologia do fígado de frango

A capacidade funcional do fígado é extremamente importante nos animais domésticos sujeitos a elevada exigência de produtividade (GÜRTLER, 1987). No embrião e feto, ele produz células sanguíneas (BOLELI, MAIORKA e MACARI, 2002) e no adulto, o fígado é um órgão que tem funções metabólicas importantes, como filtração e armazenagem de sangue; metabolismo dos carboidratos, das proteínas, das gorduras, dos hormônios, produtos químicos estranhos e carotenóides (cantaxantina); formação de bile; armazenamento de vitaminas e

ferro e formação de fatores de coagulação (BENEZ, 2004 e GUYTON e HALL, 2006). Sua importância pode ser depreendida pelo fato de que após a sua retirada, as aves morrem cerca de 24-36 h depois e a letalidade decorre da queda brusca da glicemia e do aparecimento no sangue de substâncias tóxicas que são normalmente metabolizadas no fígado (GÜRTLER, 1987).

Uma vez que o fígado é um órgão expansível, grandes quantidades de sangue podem ser armazenadas em seus vasos sanguíneos. Dessa forma, atua como valioso reservatório de sangue nos momentos de excesso de volume sanguíneo e está apto a oferecer sangue extra em tempos de volume sanguíneo diminuído (GUYTON e HALL, 2006).

De acordo com Guyton e Hall (2006) e Benez (2004), no metabolismo dos carboidratos, o fígado desempenha funções de armazenagem de glicogênio, conversão da galactose e frutose em glicose, gliconeogênese, e formação de compostos químicos a partir de produtos intermediários do metabolismo dos carboidratos. A reabsorção intestinal dos monossacarídeos também é auxiliada pelo fígado, pois este órgão produz enzimas necessárias para a utilização da glicose, frutose e galactose.

O fígado é especialmente importante para a manutenção de uma concentração normal da glicose sanguínea. O armazenamento de glicogênio permite ao fígado remover o excesso de glicose do sangue, armazená-la e, então devolvê-la ao sangue quando a concentração começar a cair demais (GUYTON e HALL, 2006). O glicogênio nas aves corresponde a 3,0% do peso do fígado (BACILA, 2003). A gliconeogênese hepática é igualmente importante na manutenção da concentração normal da glicose sanguínea (GUYTON e HALL, 2006).

O fígado é o órgão central do metabolismo nitrogenado. Além de promover a biossíntese de suas próprias proteínas o fígado, sintetiza diversas outras proteínas tais como a albumina do soro, a protrombina, o fibrinogênio e as α e β -lipoproteínas. (BACILA, 2003). O corpo não pode prescindir das contribuições hepáticas ao metabolismo protéico que são: a desaminação dos aminoácidos, formação de uréia para a remoção da amônia dos líquidos corporais, formação de proteínas plasmáticas e interconversões de aminoácidos (GUYTON e HALL, 2006). A síntese das enzimas é regulada e é dependente da composição dos alimentos. Os

aminoácidos não-essenciais ingeridos em excesso são destruídos no fígado e quando a ingestão é insuficiente provoca aumento de sua formação. Assim nas células hepáticas são formadas por mais de 1000 diferentes enzimas (GÜRTLER, 1987).

A desaminação dos aminoácidos é fundamental para que eles possam ser usados como energia ou convertidos em carboidratos ou lipídeos. A formação hepática de uréia remove a amônia dos líquidos corporais. Essencialmente, todas as proteínas plasmáticas, com exceção de parte das gamaglobulinas, são formadas pelas células hepáticas, isso significa aproximadamente 90% de todas as proteínas plasmáticas (GUYTON e HALL, 2006). Segundo Gürtler (1987) as células hepáticas produzem também inúmeras glicoproteínas e nas células de Kupffer ocorre a síntese de fatores de coagulação.

Embora a maioria das células corporais metabolize gordura, certos aspectos do metabolismo lipídico ocorrem principalmente no fígado e estes são: oxidação dos ácidos graxos, síntese de grande quantidade de colesterol e síntese de gorduras a partir das proteínas e carboidratos (GUYTON E HALL, 2006). O metabolismo dos lipídios é compartimentalizado no hepatócito. No citosol ocorre síntese de triglicerídeos (TG) e síntese de ácidos graxos (BACILA, 2003).

A beta-oxidação das gorduras pode ocorrer em todas as células do corpo, com especial rapidez nas células hepáticas, mas o fígado não pode consumir todo o acetil-CoA. Assim, este é convertido em ácido acetoacético, extremamente solúvel, que passa para o líquido extracelular, sendo, então transportado através do corpo para ser absorvido por outros tecidos. Cerca de 80% do colesterol sintetizado no fígado é convertido em sais biliares, que são secretados pela bile. Depois de sintetizada a partir de proteínas e carboidratos, a gordura é transportada nas lipoproteínas para o tecido adiposo, sendo armazenada (GUYTON e HALL, 2006).

Diversos hormônios secretados pelas glândulas endócrinas são quimicamente alterados ou excretados pelo fígado, incluindo a tiroxina e essencialmente todos os hormônios esteróides. Devido à capacidade de inativar a maioria dos hormônios, cabe ao fígado a importante função

de regular a influência das glândulas endócrinas sobre as células do organismo. (GUYTON e HALL, 2006; GÜRTLER, 1987).

O fígado desempenha importante função no metabolismo das vitaminas e oligoelementos e tem capacidade de armazenar a maior parte desses compostos. No caso das vitaminas lipossolúveis como A e E, o fígado pode formar depósitos que suprem as necessidades durante meses. Se houver ingestão excessiva de vitaminas, após o preenchimento completo do depósito, o fígado elimina o restante (GÜRTLER, 1987). As células hepáticas contêm grandes quantidades de uma proteína denominada apoferritina, que é capaz de se combinar reversivelmente com o ferro formando a ferritina. Assim, quando o ferro encontra-se em níveis baixos, a ferritina libera seu ferro (GUYTON e HALL, 2006). Além do ferro, segundo Gürtler (1987), o fígado é responsável pelo depósito de cobre, manganês e zinco.

A formação de bile pelas células hepáticas ocorre de maneira contínua, aumentando durante o ato da digestão e a quantidade secretada varia de acordo com as espécies, nas aves é de 0,58 ml por g de fígado e 14,2 ml por kg de peso. A função da bile é auxiliar na digestão das gorduras e nas aves tem cor esverdeada, devido a grande quantidade de biliverdina, o pH desta secreção nas galinhas é de 5,88 e ainda nessa espécie ocorre a concentração da bile na vesícula biliar, sendo que, nesse ambiente, a massa seca é de até 10 vezes maior que na bile hepática (GÜRTLER, 1987; BACILA, 2003).

O sistema macrofágico hepático cumpre uma função de depuração do sangue, uma vez que o sangue que flui através dos capilares intestinais recolhe muitas bactérias dos intestinos. Uma amostra de sangue colhida das veias portais antes de sua entrada no fígado quase sempre exibirá uma elevada população microbiana. As células de Kupffer depuram o sangue à medida que ele passa através dos sinusóides. Quando uma bactéria entra em contato com a célula de Kupffer, em menos de 0,01 segundo ela passa para o seu interior, permanecendo ali até ser destruída. Estima-se que menos de 1% das bactérias que entram no sangue portal a partir dos intestinos consegue passar através do fígado para a circulação sistêmica. Por conseguinte, as células de Kupffer podem fagocitar agentes infecciosos potencialmente lesivos, antes que possam ter acesso à circulação sistêmica, e os hepatócitos podem

metabolizar e inativar muitas toxinas absorvidas pela circulação portal (MACLACHLAN E CULLEN, 1998 e GUYTON e HALL, 2006)

Segundo Maclachlan e Cullen (1998), usualmente o fígado está envolvido nas infecções hematógenas, por receber tanto sangue arterial quanto sangue venoso do trato gastrointestinal. A infecção do fígado e a subsequente inflamação no órgão podem ser primárias, ou fazem parte de um processo sistêmico.

O fígado de frango *in natura* ou processado, como alimento para o homem, é passível de sofrer contaminações por microrganismos, devido a sua constituição química, condições de obtenção e manipulação (BARCELOS, 2005). O fígado de frango pode ser acometido por inúmeras alterações que incluem distúrbios circulatórios, toxicoses, doenças infecciosas (virais, bacterianas, parasitárias) e neoplásicas. Muitas lesões hepáticas não são específicas quanto à etiologia, mas fornecem informações importantes sobre a ocorrência de doenças sistêmicas (HOERR, 1996). A enterobactéria *Escherichia coli* está intimamente associada a infecções sistêmicas e comprometimento hepático (BARCELOS et al., 2006).

3.4 CONSIDERAÇÕES SOBRE A CONTAMINAÇÃO DE FÍGADOS DE FRANGOS POR *Escherichia coli*

3.4.1 Características da Família *Enterobacteriaceae*

Os membros da família *Enterobacteriaceae* estão amplamente distribuídos na natureza, sendo encontrados no solo, água, plantas e, como indica o nome da família, no trato intestinal de seres humanos e animais de produção ou companhia (KONEMAN et al., 2008; HIRSH e ZEE, 2003). Alguns gêneros dentro da família são primariamente patógenos de humanos e animais de sangue quente (ex. *Shigella*, *Salmonella*, *Yersinia*), enquanto outros são membros da microbiota comensal normal do trato gastrointestinal (ex. *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*) e causam infecções oportunistas (Anexo B). De modo geral, as enterobactérias são os microrganismos mais isolados de processos infecciosos, representando em torno de 70 a

80% das bactérias Gram-negativas isoladas em rotina de laboratório. (EINSENSTEIN e ZALEZNIK, 2009; TRABULSI e ALTERTHUM, 2005).

As bactérias que pertencem à família *Enterobacteriaceae* são bacilos gram-negativos não esporogênicos que fermentam a glicose e ampla variedade de outros açúcares. São oxidase negativa, catalase positiva, anaeróbios facultativos que crescem bem em ágar MacConkey porque não são inibidos pelos sais biliares do meio. Esses microrganismos entéricos reduzem nitrato a nitrito, e algumas espécies, notadamente a *Escherichia coli*, fermentam a lactose. A maioria das enterobactérias é móvel por flagelos peritríquios. A família contém mais de 28 gêneros e de 80 espécies, incluindo *Escherichia coli*, sorotipos de *Salmonella*, *Yersinia*, *Proteus*, *Enterobacter* e *Klebsiella*. Esses organismos podem infectar uma enorme variedade de hospedeiros (incluindo humanos), resultando em algumas situações, em portadores e, em outras instâncias, causando doenças, pois os microrganismos podem ser patógenos entéricos e sistêmicos ou oportunistas (QUINN et al., 2005).

Durante a maior parte do século XX, a indústria de alimentos considerou a contaminação por *E. coli* como um problema relacionado a práticas insatisfatórias de higiene – contaminação de origem fecal. Todavia, nas últimas décadas, comprovou-se que muitos sorotipos da bactéria eram altamente patogênicos para o homem e podiam provocar infecções graves, levando os pacientes a óbito (GERMANO e GERMANO, 2008).

3.4.2 *Escherichia coli* em aves

Escherichia coli foi descrita pela primeira vez no final do século XIX por Theodor von Escherich e denominada *Bacterium coli commune*, devido ao fato de ser uma bactéria encontrada no cólon e extremamente comum no homem e animais. O gênero *Escherichia* contém apenas uma espécie e, aproximadamente, mil tipos antigênicos. É a espécie bacteriana mais comumente isolada nos laboratórios clínicos. É um dos microrganismos comumente envolvidos em septicemias por gram-negativos e em choque induzido por endotoxinas. É um mesófilo típico capaz de se desenvolver entre 7 e 42°C sendo 37°C a temperatura ótima,

embora existam cepas que possam se multiplicar a 4°C. Não apresenta termorresistência, sendo destruído a 60°C em poucos segundos, mas é capaz de resistir por longo tempo em temperatura de refrigeração. O pH próximo do neutro propicia condições ótimas para o seu desenvolvimento (KONEMAN et al., 2008; GERMANO e GERMANO, 2008).

Segundo Quinn et al. (2005) a *E. coli* é frequentemente fimbriada e produz colônias cor de rosa em ágar MacConkey, tendo reações bioquímicas características nos testes do IMViC, ou seja, teste de produção de indol e vermelho de metila positivos, teste de Voges-Proskauer e de utilização de citrato negativos. Algumas linhagens são hemolíticas, não produz H₂S em Ágar Tríplice Açúcar Ferro (TSI), teste de Lisina descarboxilase positivo e atividade de urease negativa. Antígenos somáticos (O), flagelar (H) e, por vezes capsular (K) são usados para sorotipagem de *E. coli*. Os antígenos somáticos são de natureza lipopolissacarídica, localizando-se na superfície da parede celular. Os antígenos flagelares são de natureza protéica e os antígenos capsulares são compostos de polissacarídeos. Antígenos proteináceos fimbriais (F) agem como adesinas, facilitando a aderência às superfícies mucosas.

Os fatores de virulência de linhagens patogênicas de *E. coli* incluem enterotoxinas, sideróforos, toxina shiga-símile (verotoxina), fator citotóxico necrosante e hemolisina. (HIRSH e ZEE, 2003). Dentre os principais fatores de virulência associados à *E. coli* de origem aviária, destacam-se a expressão de adesinas, a produção de sideróforos e a capacidade de resistir à ação microbicida do soro. Os fatores que apresentam maior correlação com a virulência são a resistência dos componentes do sistema complemento e a capacidade de sequestrar o íon ferro na corrente sanguínea e nos tecidos do hospedeiro. Estes dois fatores contribuem para a sobrevivência e a evolução da doença após a invasão da bactéria (FERREIRA e KNOBL, 2000).

A *Escherichia coli* tem comprovado papel como patógeno entérico e também extraintestinal, sendo o agente etiológico de um amplo espectro de infecções invasivas no homem e animais, além de ser um dos integrantes da microbiota intestinal de mamíferos e aves (RON, 2006).

Com base nas características de patogenicidade, no efeito em certas culturas de células e nos grupos sorológicos são reconhecidos nove grupos de *E. coli* virulentos (patotipos): *E. coli*

enteroagregativa (EaggEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) e *E. coli* que adere difusamente (DAEC) *E. coli* uropatogênica (UPEC), *E. coli* de meningite neonatal (NMEC), *E. coli* patogênica para aves (APEC) (KAPER, 2005). Ferreira e Knobl (2000) ainda cita o patotipo *E. coli* enteropatogênica para coelhos (REDEC), conforme anexo C.

A evolução de muitas bactérias por transferência horizontal de genes facilita a adaptação em novos ambientes e contribui para a capacidade de aquisição de fatores de virulência envolvidos diretamente em infecções, podendo modificar a composição do material genético bacteriano drasticamente, pela incorporação de elementos genéticos de outros organismos diretamente no genoma (DAM e DAS, 2006). Dessa forma, Elena et al. (2005) relataram que os patotipos surgiram devido à evolução molecular da *Escherichia coli*, havendo uma relação filogenética estreita entre diversas cepas, como a cepa B e K12, não patogênicas, seguida pela O157:H7, enterohemorrágica, e CFT073, uropatogênica.

De acordo com Andreatti Filho (2006), o diagnóstico de *E. coli* deve ser baseado no isolamento e identificação da bactéria, estando também na dependência da diferenciação entre amostras patogênicas e apatogênicas de *E. coli*.

A carne de aves, em especial a de galinha, tem sido apontada como causa de surtos de toxinfecção alimentar, principalmente por EPEC (GERMANO e GERMANO, 2008). A carne apresenta uma composição química que a torna excelente meio de cultura. Apresenta alta atividade de água, é um alimento rico em substâncias nitrogenadas e minerais e fatores de crescimento, além do pH ser favorável à maioria dos microrganismos, como a *Escherichia coli*, sendo o conteúdo intestinal a principal fonte desse microrganismo (FRANCO e LANDGRAF, 2008).

Fernandes (2008) isolou a *E. coli* em 50% das 30 amostras de frangos oriundas do comércio de Salvador-Bahia, incluindo amostras de frangos congelados industrializados, frangos resfriados industrializados e frangos não industrializados. Silva et al (2002) detectaram *E. coli* em 95% das 60 amostras de frangos refrigerados oriundas da cidade de João Pessoa-PB.

O patotipo APEC causa infecções extraintestinais em aves, como infecção respiratória, pericardite e septicemia. Em humanos estão associados a infecções intra-abdominais (KAPER, 2005). Frangos também são susceptíveis à colonização por *E. coli* O157:H7, pertencente ao patotipo EHEC, responsável pela síndrome da colite urêmico-hemolítica hemorrágica em humanos (BARNES, VAILLANCOURT e GROSS, 2008). Cepas de APEC tem sido relacionadas com maior prevalência aos sorogrupos O1, O2 e O78 (MCPEAKE, SMITH e BALL, 2005).

De acordo com Andreatti Filho (2006), a colibacilose é o termo comumente empregado para designar as infecções causadas por *Escherichia coli* nos animais. A colibacilose aviária esteve posicionada em papel secundário, necessitando impreterivelmente de um fator estressante primário para o desencadeamento da doença. Aparecia associada à *Mycoplasma gallisepticum*, *M. synoviae*, *Pasteurella multocida*, *Haemophilus paragallinarum*, Pneumovírus, vírus da bronquite infecciosa (incluindo vírus vacinal), doença de Marek e de New Castle, doença infecciosa bursal (Gumburo) e presença de micotoxinas (Aflatoxina) na ração. A erradicação de certas doenças aviárias intimamente associadas a infecções secundárias por *E. coli* e a diminuição da ocorrência de outras, pela adoção de melhores práticas de manejo e programas sanitários, vieram ressaltar a importância da *E. coli* na patologia aviária. Além desses agentes infecciosos, a infecção por *E. coli* se torna clinicamente aparente quando e, principalmente, fatores ambientais adversos estão presentes, como a presença de gases irritantes, principalmente a amônia, umidade da cama, poeira, variações climáticas e alta densidade.

A colibacilose é uma das principais doenças da avicultura industrial moderna, devido aos grandes prejuízos econômicos causados no mundo inteiro por quadros como: pneumonia, peritonite, coliseptemia, celulite, pleuropneumonia, peri-hepatite, pericardite, salpingite, panofalmlia, osteomielite/sinovite, onfalite, coligranuloma, síndrome de cabeça inchada e doença crônica respiratória (BARNES, VAILLANCOURT e GROSS, 2008).

Miharro et al (2001) realizaram um estudo para avaliar o envolvimento de *E. coli*, *Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma synoviae* em carcaças de frangos condenadas por

aerossaculite pelo Serviço de Inspeção Federal e a *E. coli* foi a mais frequente, sendo isolada em 25 (80,64%) dos 31 galpões estudados, em infecções mistas e simples.

O coligranuloma das galinhas e perus é caracterizado por granulomas no fígado, ceco, duodeno e mesentério, mas não no baço. Ocorre coagulação confluyente e necrose envolvendo aproximadamente metade do fígado. Nas septicemias agudas causadas por *E. coli* pode ocorrer isolamento do microrganismo em frangos adultos e em crescimento. As aves afetadas estão em boa condição de carcaça e estão em plena produção. As lesões mais características são o fígado verde e músculos peitorais congestionados. Em alguns casos podem ocorrer pequenas lesões focais brancas no fígado (Figura 3) (CALNEK, 1997).

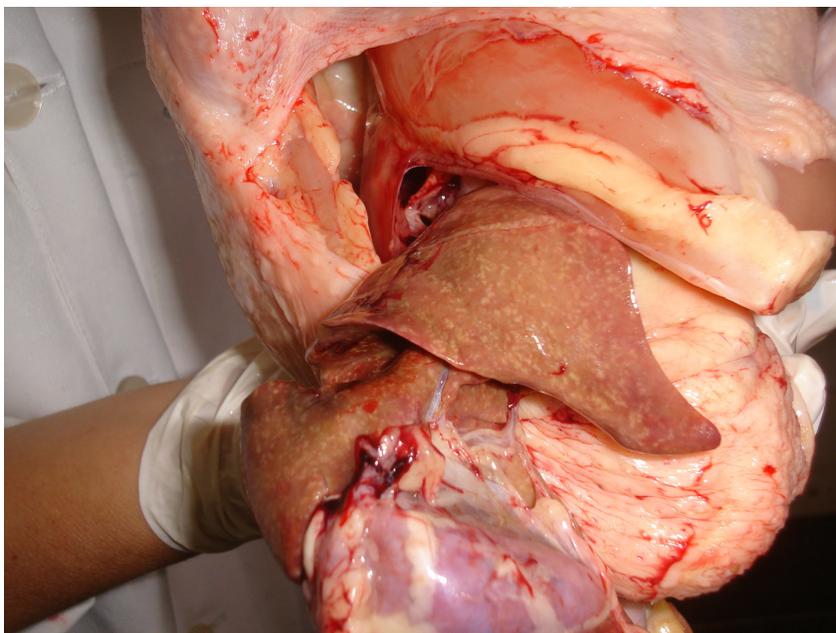


Figura 3 – Fotografia de carcaça de frango proveniente de matadouro avícola sob inspeção estadual da Bahia com condenação total da carcaça por colibacilose com alterações macroscópicas no fígado.

Dentre as principais alterações histopatológicas, destaca-se o alargamento dos sinusóides hepáticos pela congestão, infiltrado heterofílico, tumefação das células de Kupffer, alargamento do espaço perisinusoidal, trombos de fibrina. Cepas avirulentas de *E. coli* incitam respostas heterofílicas mais rápido do que cepas virulentas de *E. coli*. A bactéria pode ser vista livre nos sinusóides e nos macrófagos sinusoidais. Necrose não é um aspecto significativo na forma aguda da infecção por *E. coli* (HOERR, 1996).

Gomis et al. (1997) constataram peri-hepatite em 80% dos frangos inoculados com *E. coli* subcutânea. Peighambari et al. (1995) observaram 9% de incidência de peri-hepatite em frangos de corte experimentalmente infectados com cepas de *E. coli* associadas ao vírus da bronquite infecciosa das galinhas. Pourbakhsh et al. (1997) realizaram inoculação experimental de *E. coli* nos sacos aéreos caudais de pintos. Eles relataram graus variáveis de hiperemia no baço, rins e fígado, além de infiltrado inflamatório, com exsudato fibrinoso e debris celulares, indicando colisepticemia.

Em 2006 Barcelos et al. avaliaram através da macroscopia, histopatologia e bacteriologia, fígados de frangos condenados no abate. Dos 100 fígados analisados, isolou-se *Escherichia coli* em 21 amostras. Dos 10 fígados sem alterações coletados, houve o isolamento de *E. coli* em 2 amostras. Eles observaram com maior incidência a colangio-hepatite heterofílica multifocal (9/26), seguida de hepatite necrosante aleatória (6/26) como diagnóstico morfológico associado ao isolamento de *E. coli*.

Segundo Kahn (2008), a resposta clínica à infecção por *E. coli* depende da localização e do grau de infecção. A aerossaculite associada ou não à pericardite, peri-hepatite e peritonite são os sinais mais comuns, nas infecções agudas e sistêmicas, como enterite, inflamação e aumento de volume dos órgãos parenquimatosos podem ser uma expressão típica. Dessa forma Boratto et al. (2004) em suas pesquisas com inoculação experimental de *E. coli* em frangos, que tiveram suas carcaças analisadas em três fases diferentes do desenvolvimento (11, 21 e 42 dias), o fígado foi o único órgão afetado nas três fases estudadas, o que pode estar relacionado à neutralização de substâncias tóxicas produzidas a partir da atividade metabólica das bactérias intestinais, que requer um gasto constante da energia para desintoxicação feita pelo fígado, induzindo uma hipertrofia dos hepatócitos.

O uso adequado de antimicrobianos consiste em uma estratégia eficaz no controle de *Escherichia coli*. Dentre os antimicrobianos utilizados no tratamento e prevenção de doenças associadas a *E. coli* destacam-se a danfloxacina, gentamicina, enrofloxacina, apramicina, espectinomicina e ácido oxolínico, uma vez que apresentam espectro de sensibilidade superior a 70% para amostras de *E. coli* isoladas de aves com colibacilose (ANDREATTI FILHO, 2006).

Por outro lado, a situação do uso indiscriminado de antimicrobianos no tratamento e prevenção de doenças é um problema de saúde animal e pública (MOTA et al., 2005; JOHNSON et al., 2005). 76% das cepas de *Escherichia coli* de origem aviária foram consideradas resistentes por Zanatta et al. (2004), assim como 77,5% foram consideradas multirresistentes e nenhuma droga foi eficiente para todas as amostras bacterianas avaliadas. Um percentual maior de cepas resistentes de *E. coli* de origem fecal foi verificado por Bogaard et al. (2001) em frangos e perus, bem como maior número de cepas multirresistentes, comparados com galinhas caipiras. Johnson et al. (2007) estudaram a resistência antimicrobiana da *E. coli* originária de fezes humanas e de frangos por meio de Reação em Cadeia de Polimerase para grupo filogenético e genes de virulência associados a *E. coli* resistente a sulfametoxazol-trimetropim, quinolona e cefalosporina de amplo espectro. Eles concluíram que muitas cepas de *E. coli* resistentes aos antimicrobianos isoladas de humanos podem ter sido oriundas do frango, por ingestão do alimento contaminado, entretanto as cepas resistentes aos antimicrobianos isoladas de frangos provavelmente são oriundas de precursores de animais susceptíveis.

O controle da infecção por *Escherichia coli* é considerado um dos maiores desafios para a avicultura industrial. Dentre as alternativas para consegui-lo, poderão ser usados probióticos, que mantêm o equilíbrio da microbiota do trato gastrintestinal de aves, previnem infecções, reduzem condenações de carcaças e a mortalidade, melhoram a conversão alimentar, o ganho de peso e a qualidade das carcaças, conservando os índices de produtividade alcançados com a utilização de antimicrobianos e vacinas (SANTOS e GIL-TURNES, 2005).

Por fim, para prevenir a entrada de *Escherichia coli* na cadeia produtiva, deve ser efetuado monitoramento bacteriológico e a rejeição das aves infectadas na granja e indústria. Na granja

devem ser implantadas as Boas Práticas de Manejo seguida da APPCC (GRANDO, SONCINI e KUANA, 2004). Na indústria avícola devem ser introduzidas as BPFs, o PPHO e a APPCC, além da introdução de um processo de avaliação de riscos (MAIA e DINIZ, 2009; ROQUE-SPECHT, CASTRO e FIOD NETO, 2007).

3.4.3 Caracterização genética de *Escherichia coli*

O genoma da *E. coli* possui aproximadamente 4,6 milhões de pares de bases e codificam próximo de 4.000 proteínas diferentes, sendo que cerca de 90% do DNA serve como sequência codificadora de proteína. Sendo um procarioto, seu DNA é uma molécula circular única no nucleóide, não separada por membrana no citosol, o qual possui cerca de 30.000 ribossomos, sítio da síntese protéica (ROCHA et al., 2008; TORTORA, FUNKE e CASE, 2006).

Um dos mais importantes avanços na área de métodos rápidos em microbiologia foi a tecnologia baseada na reação em cadeia de polimerase, também chamada PCR (*Polimerase Chain Reaction*). A técnica da PCR é um grande avanço no diagnóstico molecular e caracterização genética de microrganismos patogênicos, como a *Escherichia coli* (GARCIA et al., 2008; ROCHA et al., 2008).

Consiste em uma reação de amplificação *in vitro* do DNA, pelo qual se pode conseguir, em poucas horas, grandes quantidades de um gene, ou parte dele, a partir de uma quantidade mínima de DNA, inclusive de uma única célula. A multiplicação é exponencial e se dá por meio da ação de uma enzima (DNA polimerase) que, tendo um segmento de DNA de fita simples como molde, é capaz de construir a fita complementar a esse segmento, através da polimerização de nucleotídeos adicionados ao sistema. O início da cópia se dá a partir de dois oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) complementares às extremidades 3' e 5' do fragmento do DNA a ser copiado (FRANCO e LANDGRAF, 2008; DE ROBERTIS e HIB, 2006).

Desenvolvida por Saiki et al. em 1985, a técnica de PCR foi aperfeiçoada por Mullis et al. em 1987. As melhorias introduzidas por Mullis foi o conceito de *primer* de PCR e o uso de uma enzima termoestável (*Taq* DNA polimerase) isolada de uma bactéria que vive em fontes

termais, conhecida como *Thermus aquaticus*. Esta enzima possui a propriedade de se manter estável em temperaturas altas, facilitando a realização da técnica. Em 1989 foi criado o primeiro termociclador automático e em meados dos anos 90 foi aperfeiçoado com o emprego de um bloco de aquecimento composto por uma liga metálica que aquece ou esfria de acordo com a programação do aparelho conhecido como padrão Peltier (VIEIRA, 2009).

O processo da PCR requer quatro componentes: dois *primers*, cada um consistindo em 15 a 20 bases de DNA, denominadas oligonucleotídeos, correspondendo a sequências de DNA imediatamente adjacentes à sequência de interesse; DNA polimerase, que realiza o processo vital de replicação do DNA, sendo denominada extensão do *primer*; um grande número de nucleotídeos de DNA livres; DNA genômico de um indivíduo. Dessa forma, o DNA genômico é primeiramente aquecido e desnaturado para formar filamentos únicos. Na fase de helicoidização, o DNA é esfriado, permitindo a hibridização com seqüências de *primers* que flanqueiam a região de interesse. Então, a reação é aquecida a uma temperatura intermediária para a extensão do *primer*, na qual a DNA polimerase adiciona bases livres na direção 3' ao longo de cada filamento único, começando no *primer*. Fragmentos de DNA com terminações “abruptas” são formados, e estes servem de molde para o próximo ciclo de aquecimento e resfriamento. Ciclos repetidos produzem um grande número de fragmentos de DNA ligados em cada ponta pela seqüência do *primer*. Em virtude de cada ciclo de aquecimento-esfriamento requerer apenas alguns minutos, uma única molécula de DNA pode ser amplificada para fazer milhões de cópias em poucas horas. A referida técnica possui inúmeras vantagens, dentre elas a utilização de quantidade extremamente pequena de DNA, da ordem de nanogramas, e de não requerer clonagem gênica. Dentre as desvantagens, destacam-se a necessidade do conhecimento prévio das seqüências de DNA flanqueadoras da seqüência de interesse, extrema sensibilidade à contaminação laboratorial e dificuldade de aplicar a PCR em seqüências maiores do que alguns kilobases (JORDE et al., 2004).

Existem diversas reações que utilizam a PCR, como a RT-PCR (*Reverse Transcriptase Chain Reaction*), *Multiplex PCR*, *Nested PCR* e PCR Competitiva. A reação de RT-PCR é composta de duas partes: a transcrição reversa e a amplificação. Seu principal diferencial é que esta reação não parte de um molde de DNA diretamente extraído da amostra; a amostra fornece o RNA, que é convertido em cDNA (DNA complementar). Consiste em uma ferramenta útil em

estudos de expressão gênica, pois avaliando o mRNA, podemos detectar quais proteínas estão sendo efetivamente expressas (VIEIRA, 2009). Na *Multiplex PCR* dois ou mais *locus* são amplificados simultaneamente na mesma reação, mostrando-se um ensaio rápido e eficiente (PERRY et al., 2007). De acordo com Vieira (2009), na *Nested PCR*, o segmento genômico é amplificado, primeiro de forma abrangente, para melhorar a especificidade e a eficiência da reação, copiando até mesmo sequências localizadas fora dela, e depois, utilizando este primeiro produto, a amplificação da real sequência-alvo. Essas duas etapas (*rounds*) podem ser realizadas concomitantemente, ou em duas reações separadamente, caracterizando o *Semi-Nested PCR*. Na *PCR competitiva*, além do DNA molde, é adicionado à reação um outro trecho de DNA, de sequência, tamanho e concentração conhecidos (controle), cujas extremidades são complementares também aos *primers* que irão amplificar a sequência-alvo. O resultado é a amplificação de dois trechos de DNA: a de interesse e a controle. Essa última, levando-se em conta a quantidade inicial e dados sobre a eficácia da reação serve de padrão para a quantificação do DNA-alvo, sendo possível determinar o quanto foi amplificado.

Os produtos da *PCR* são analisados por meio de eletroforese, a qual possui dois modelos básicos, baseados em géis de agarose ou em géis de poliacrilamida. As duas substâncias formam tramas de poros de tamanhos variáveis, possibilitando a separação dos fragmentos, que terá sua eficiência dependente da concentração do polímero e da intensidade da voltagem e amperagem aplicada. Em qualquer um dos casos, essas substâncias são dissolvidas numa solução-tampão eletrolítica, obrigatoriamente a mesma que recobrirá o gel na cuba de eletroforese e possibilitará a passagem de corrente elétrica (Tampão de Corrida). Para eletroforese de DNA, normalmente utiliza-se o TBE (Tris-Borato EDTA) e o TAE (Tris-Acetato EDTA). Quanto à aplicação das amostras no gel, é importante ressaltar que, antes disso, elas são misturadas a uma solução tampão, que tem como finalidade aumentar a viscosidade da amostra e assim impedir que esta comece a flutuar no tampão de corrida antes que a voltagem seja aplicada no sistema (VIEIRA, 2009).

Rocha et al. (2008) citaram que os mecanismos de virulência das amostras de *E. coli* potencialmente patogênicas têm sido continuamente estudados e acredita-se ser multifatorial. No caso de APEC os autores detectaram diversos genes, como o resistência sérica - *iss* (73,8%), hemaglutinina sensível a temperatura - *tsh* (55,7%) e presença de aerobactina - *iutA*

(45,9%). Nakazato et al. (2009) relataram que a caracterização molecular e biológica é necessária para o entendimento da patogênese da APEC, visando o desenvolvimento de ferramentas que podem prevenir as perdas econômicas causadas por estas linhagens.

A EHEC acarreta destruição das células epiteliais intestinais e diarreia sanguinolenta ou não, síndrome urêmico-hemolítica devido à produção de uma potente citotoxina, denominada shiga toxina (Stx) (KAPER, 2005). Existem dois grupos de Stx, denominados Stx1 e Stx2. Stx1 é muito semelhante a principal citoxina produzida pela *Shigella dysenteriae* sorotipo 1 e os membros do Stx2 possuem algumas diferenças. Eles analisaram 82 amostras de EHEC oriundas de humanos e 100% continham os genes do grupo stx2 e 84% do stx1 (JELACIC et al., 2003).

A ETEC está associada a enterotoxina termoestável (ST) e enterotoxina termolábil (LT). A EPEC está associada a diversos fatores, como EspF, EspH, Map e Tir, todos também associados a EHEC (KAPER, NATARO e MOBLEY, 2004). Rodrigues et al. (2004), estudando os fatores de virulência da EPEC, citaram que os genes mais associados à expressão da adesão as células epiteliais do intestino e a indução do rearranjo do citoesqueleto, com conseqüente alteração histopatológica, são os genes *bfpA* (*bundle-forming pilus*) e *eae* (*attaching e effacing*). Krause, Zimmermann e Beutin (2005) examinaram a presença da intimina, por meio do gene *bfpA*, em diversos animais e o gene estava presente em 2,3% das amostras de frangos.

É imprescindível o conhecimento dos fatores que determinam o aparecimento de doenças no homem e animais, visando intervenções efetivas. Dessa forma, a definição dos genes de virulência (e possíveis combinações) é vital para a eficácia do diagnóstico e melhoria da saúde pública (CAPRIOLI et al., 2005).

4 REFERÊNCIAS

ABEF. Associação Brasileira de Produtores e Exportadores de Frangos. Apresenta informações sobre a avicultura do Brasil e sobre a entidade. Disponível em: <http://www.abef.com.br/site1/anuario/2009/revista_digital/Pro-pro%20Version/Main.php>. Acesso em: 30 set. 2009.

ALCOCER, F.; OLIVEIRA, K.M.P.; VIDOTTO, M.C.; OLIVEIRA, T.C.R.M. Discriminação dos sorovares de *Salmonella* spp. isolados de carcaças REP e ERIC-PCR e fagotipagem do sorovar Enteritidis. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, 2006.

ANDREATTI FILHO, R.L. **Saúde aviária e doenças**. São Paulo: Roca, 2006, 314p.

ANSARI-LARI, M.; REZAGHOLI, M. (2007) Poultry abattoir survey of carcass condemnations in Fars province, southern Iran. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 79, p. 287-293, 2007.

BACILA, M. **Bioquímica Veterinária**. 2.ed. São Paulo: Robe Editorial, 2003. 583p.

BAHIA. Agência Estadual de Defesa Agropecuária da Bahia. Portaria n. 290, de 5 de agosto de 2008. Reitera a importância da aplicação do Regulamento Técnico sobre as Condições Higiênico-Sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação (BPF), aprovado pela Portaria MAPA n.º 368/97 aos elaboradores e industrializadores de alimentos de origem animal do Estado da Bahia, registrados no âmbito do Serviço de Inspeção Estadual – S.I.E. **Diário Oficial do Estado**. Salvador, BA, 5 ago. 2008. Disponível em: <http://www.adab.ba.gov.br/modules/mastop_publish/files/files_499968759c190.pdf>. Acesso em: 19 out. 2009.

BARCELOS, A.S. Avaliação macroscópica, histopatológica e bacteriológica de fígados de frangos (*Gallus gallus*) condenados pelo abate pela inspeção sanitária. 2005. 69p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

BARCELOS, A.S.; FLÔRES, M.L.; KOMMERS, G.D.; NASCIMENTO, V.P.; SEGABINAZI, S.D.; ANTONIAZZI, T.; BASSAN, J.D.L. Macroscopia, histopatologia e bacteriologia de fígados de frangos (*Gallus gallus*) condenados no abate. **Ciência Rural**, v. 36, n. 2, p. 561-567, 2006.

BARNES, H.J.; VAILLANCOURT, J.P.; GROSS, W.B. Colibacillosis. In: SAIF, Y.M. (Ed.) **Diseases of poultry**. 12 ed. Ames, Iowa: Iowa State University Press, 2008, p. 631-656.

BELS, V. Feeding in domestic vertebrates: from structure to behavior. Paris: CABI Publishing, 2006. 352p.

BENEZ, S.M. Aves: criação, clínica, teoria e prática: silvestres, ornamentais, avinhados. 4. ed. Ribeirão Preto, SP: Tecmed, 2004. 600p.

BOGAARD, A.E.V.D.; LONDON, N.; DRIESSEN, C.; STOBBERINGH, E.E. Antibiotic resistance of faecal *Escherichia coli* in poultry, poultry farmers e poultry slaughters. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, n. 47, p. 763-771, 2001.

BOLELI, I.C.; MAIORKA, A.; MACARI, M. Estrutura funcional do trato digestório. In: MACARI, M.; FURLAN, R.L.; GONZALES, E. (Edit). **Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte**. Jaboticabal: FUNEP/UNESP, 2002, p. 75-95.

BORATTO, A.J.; LOPES, D.C.; OLIVEIRA, R.F.M.; ALBINO, L.F.T.; SÁ, L.M.; OLIVEIRA, G.A. Uso de Antibiótico, de Probiótico e de Homeopatia, em Frangos de Corte Criados em Ambiente de Conforto, Inoculados ou não com *Escherichia coli*, **R. Bras. Zootec.**, v.33, n.6, p.1477-1485, 2004.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n. 275, de 21 de outubro de 2002. Dispõe sobre o Regulamento Técnico de Procedimentos Operacionais Padronizados aplicados aos Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos e a Lista de Verificação das Boas Práticas de Fabricação em Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 23 out. 2003. Disponível em: <[HTTP://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=8134](http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=8134)>. Acesso em: 23 out. 2007.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria n. 326, de 30 de Julho de 1997. Aprova o Regulamento Técnico sobre “Condições Higiênico-Sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 1 ago. 1997. Disponível em: <[HTTP://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=100](http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=100)>. Acesso em: 23 out. 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto n. 30.691, de 29 de março de 1952. Aprova o novo Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de origem Animal. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 7 jul. 1952. Disponível em: <[HTTP://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consultarLegislacao.do](http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consultarLegislacao.do)>. Acesso em: 7 fev. 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria n. 210, de 10 de novembro de 1998. Aprova o Regulamento Técnico da Inspeção Tecnológica e Higiênico-Sanitária de Carne de Aves. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 26 nov. 1998. Disponível em: <[HTTP://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consultarLegislacao.do](http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consultarLegislacao.do)>. Acesso em: 20 nov. 2006.

CALNEK, B.W. (Coord.). **Diseases of poultry**. 10. ed. Ames Iowa: Iowa State University Press, 1997. 929p.

CAPROLI, A.; MORABITO, S.; BRUGERE, H.; OSWALD, E. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. **Vet. Res**, v. 36, p. 289-311, 2005.

CARVALHO, L.T.; COSTA, P.S.; CARVALHO, A.L.T. Análise de perigos e pontos críticos de controle na linha de produção de frango inteiro congelado. **Higiene Alimentar**, v. 16, n. 95, 2002.

DAM, T.; DAS, P. Plasmids - potential tool for the investigation of gene transfer in *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, n. 4, p. 479-480, 2006.

DEY, B. P.; CHEN, Y. R.; HSIEH, C.; CHAN, D.E. Detection of septicemia in chicken livers by spectroscopy. **Poultry Science**, v. 82, p. 199-206, 2003.

DE ROBERTS, E.M.F.; HIB, J. **Bases da biologia celular e molecular**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. 389p.

DICE, K.M.; SACK, W.O.; WENSING, C.J.G. **Tratado de anatomia veterinária**. 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.

EISENSTEIN, B.I., ZALEZNIK, D.F. **Enterobacteriaceae**. In: MANDELL, G.L.; BENNETT, J.E., DOLIN, R. Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases. 7. ed., Philadelphia: Churchill Livingstone, 2009. p. 2294-2310.

ELENA, S.F.; WHITTAM, T.S.; WINKWORTH, C.L.; RILEY, M.A.; LENSKI, R.E. Genomic divergence of *Escherichia coli* strains: evidence for horizontal transfer and variation in mutation rates. **International microbiology**, v. 8, p. 271-278, 2005.

FERNANDES, M.V.M. Determinação do índice colimétrico e pesquisa de *Escherichia coli* em frangos comercializados na cidade de Salvador. 2008. 55f. Monografia (Graduação) - Universidade Federal da Bahia, Salvador.

FERREIRA, A.J.P.; KNOBL, T. Colibacilose aviária. In: BERCHIERI JUNIOR, A.; MACARI, M. **Doença das Aves**. Campinas: FACTA, 2000, p. 197-207.

FRANÇA, J.M. A competitividade da avicultura de corte e a certificação de qualidade para o mercado externo. **Revista Avicultura Industrial**, n.1, p. 20-25, 2007.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2008. 182p.

GARCIA, P.M.; ARCURI, E.F.; BRITO, M.A.V.P.; LANGE, C.C.; BRITO, J.R.F.; CERQUEIRA, M.M.O.P. Detecção de *Escherichia coli* O157:H7 inoculada experimentalmente em amostras de leite cru por método convencional e PCR *multiplex*. **Arq. Bra. Méd. Vet. Zootec.**, v. 60, n. 5, p. 1241-1249, 2008.

GARTNER, L. P. HIATT, J.L. **Tratado de histologia em cores**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. 576p.

GERMANO, P.M.L.; GERMANO, M.I.S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos**. 3. ed. Barueri: Manole, 2008. 986p.

GETTY, R. **Sisson/Grossman anatomia dos animais domésticos**. 5. ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara, 1986. 2000p.

GIOTTO, D.B.; ZIMERMANN, C.F.; CESCO, M.A.O.; BORGES FORTES, F.B.; PINHEIRO, D.; HILLER, C.C.; HERPICH, J.; MEDINA, M.; RODRIGUES, E.; SALLE, C.T.P. Impacto econômico de condenações *post mortem* de frangos de corte em um matadouro-frigorífico na região sul do Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 35., 2008, Gramado. Anais eletrônicos... Gramado: CONBRAVET, 2008. Disponível em: <<http://www.sovergs.com.br/conbravet2008/anais/cd/resumos/R0701-2.pdf>>. Acesso em: 19 out. 2009.

GOMIDE, L.A.M.; RAMOS, E.M., FONTES, P.R. **Tecnologia de abate e tipificação de carcaças**. Viçosa: Ed. Viçosa, 2006, 370p.

GOMIS, S. M.; WATTS, T.; RIDDELL, C.; POTTER, A.A.; ALLAN, B.J. Experimental reproduction of *Escherichia coli* cellulitis and septicemia in broiler chickens. **Avian Diseases**, v. 41, n. 1, p. 234-240, 1997.

GRANDO, N.; SONCINI, R.; KUANA, S. Método HACCP (Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle) e GMP (Boas Práticas de Manejo) na avicultura. In: MENDES, A.A.; NAAS, I. A.; MACARI, M (Edit). **Produção de Frangos de Corte**. Campinas: FACTA, 2004, p. 285-297.

GÜRTLER, H. **Fisiologia veterinária**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1987. 612p.

GUYTON, A.C., HALL, J.E. **Tratado de fisiologia médica**. Trad. MARTINS, B.A., 11. Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. 1115p.

HIRSH, C.H., ZEE, Y.C. **Microbiologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. 446 p.

HOERR, F.J. Liver. In: RIDELL, C. **Avian histopathology**. Pensilvânia: Library of Congress, 1996. p. 143-166.

JACOBSEN, G.; FLÔRES, M.L. Condenações por síndrome ascítica em frangos abatidos sob inspeção federal entre 2002 e 2006 no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência rural**, v. 38, n. 7, p. 1966-1971, 2008

JAY, J.M. **Microbiologia de alimentos**. 6 ed. São Paulo: Artmed, 2005. 711p.

JELACIC, J.K.; DAMROW, T.; CHEN, G.S.; JELACIC, S.; BIELASZEWSKA, M.; CIOL, M.; CARVALHO, H.M.; MELTON-CELSA, A.R.; O'BRIEN, A.D.; TARR, P.I. Shiga

Toxin-Producing *Escherichia coli* in Montana: Bacterial genotypes and clinical profiles. **The journal of infectious diseases**, v. 188, p. 719-729, 2003.

JOHNSON, J.R.; KUSKOWSKI, M.A.; SMITH, K.; O'BRYAN, T.T.O.; TATINI, S. Antimicrobial-Resistant and Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* in retail foods. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 191, p.1040-1049, 2005.

JOHNSON, J.R.; SANNES, M.R.; CROY, C.; JOHNSTON, B.; CLABOTS, C.; KUSKOWSKI, M.A.; BENDER, J.; SMITH, K.E.; WINOKUR, P.L.; BELONGIA, E.A. Antimicrobial drug-resistant *Escherichia coli* from humans and poultry products, Minnesota and Wisconsin, 2002-2004. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, n. 6, p. 838-846, 2007.

JORDE, L.B.; CAREY, J.C.; BAMSHAD, M.J.; WHITE, R.L. **Genética médica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004. 415p.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica – Texto/Atlas**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 488p.

KAHN, C.M. (Org.) **Manual Merck de Veterinária – 50 anos**. 9. ed. São Paulo: Roca, 2008. p. 646.

KAPER, J.B. Pathogenic *Escherichia coli*. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 295, p. 355-356, 2005.

KAPER, J.B.; NATARO, J.P.; MOBLEY, H. L.T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews**, v. 2, p. 123-140, 2004.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN, W.C. **Diagnóstico microbiológico-texto e atlas colorido**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 1760p.

KRAUSE, G.; ZIMMERMANN, S.; BEUTIN, L. Investigation of domestic animals and pets as a reservoir for intimin- (eae) gene positive *Escherichia coli* types. **Veterinary microbiology**, v. 106, p. 87-95, 2005.

MACLACHLAN, N.J.; CULLEN, J.M. Fígado, sistema biliar e pâncreas exócrino. In: THOMSON, R.G. **Patologia Veterinária Especial**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 1998. p. 265-298.

MAIA, A.P.A.; DINIZ, L.L. Segurança alimentar e sistemas de gestão de qualidade na cadeia produtiva de frangos de corte. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 6, n. 4, p. 991-1000, 2009.

MCPEAKE, S.J.W.; SMITH, J.A.; BALL, H.J. Characterisation of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) associated with colisepticaemia compared to faecal isolates from healthy birds. **Veterinary Microbiology**, v. 110, p. 245-253, 2005.

MENDES, A.A. Saudável e nutritivo. **Revista Avicultura Industrial**, n.5, p. 57-58, 2002.

MINHARRO, S.; ANDRADE, M.A.; SOBESTIANSKY, J.; JAYME, V.S. As alterações anatomopatológicas macroscópicas detectadas abatedouros de aves sob Inspeção Federal no Estado de Goiás no período de 1995-1997. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, 1999.

MINHARRO, S.; LINHARES, G.F.C.; ANDRADE, M.A.; ROCHA, P.T.; SANTANA, A.P. Envolvimento de *Escherichia coli*, de *Mycoplasma gallisepticum* e de *Mycoplasma synoviae* em lesões de sacos aéreos em frangos abatidos no estado de Goiás. **Ciência Animal Brasileira**, v. 2, n. 2, p. 111-117, 2001.

MONTOYA, M.A.; FINAMORE, E.B.M.C. Performance e Dimensão Econômica do Complexo Avícola Gaúcho: uma Análise Insumo Produto. **Teoria e Evidência Econômica**, v. 14, p. 37-60, 2006.

MOTA, R.A.; SILVA, K.P.C.; FREITAS, M.F.L.; PORTO, W.J.N.; SILVA, L.B.G. Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a multirresistência bacteriana. **Braz. J. Vet Res. Anim. Sci.**, v. 42, n. 6, p. 465-470, 2005.

NAKAZATO, G.; CAMPOS, T.A.; STEHLING, E.G.; BROCCHI, M.; SILVEIRA, W.D. Virulence factors of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 7, p. 479-486, 2009.

NAAS, I.A. Rastreabilidade: uma exigência do mercado globalizado. In: II CONFERÊNCIA ELETRÔNICA: OS DESAFIOS DA AMÉRICA LATINA PARA PRODUÇÃO DE SUÍNOS NO MERCADO GLOBALIZADO. **Anais...** Embrapa/CNPSA, 2002.

NCRA. North Central Regional Association of Agricultural Experiment Station Directors. NC228: Avian Respiratory Diseases: Pathogenesis, surveillance, diagnosis and control. Disponível em: <http://lgu.umd.edu/lgu_v2/homepages/home.cfm?trackID=1514>. Acesso em: 17 out. 2009.

NUNES, F.G. Avicultura Brasileira: Trabalho e Êxito. **Indústria Avícola**, Maio 2006, p.15-19.

PATRÍCIO, I.S. Desempenho do frango nos últimos 17 anos (de 1990 a 2006). **Revista Avicultura Industrial**, n.5, p. 35-37, 2007.

PEIGHAMBARI, S.M.; VAILLANCOURT, J.P.; WILSON, R.A.; GYLES, C.L. Characteristics of *Escherichia coli* isolates from avian cellulitis. *Avian Diseases*, v. 39, p. 116-124, 1995.

PERRY, L.; HEARD, P.; KANE, M.; KIM, H.; SAVIKHIN, S.; DOMINGUEZ, W. Application of multiplex polymerase chain reaction to detection of pathogens in food. **Journal of rapid methods and automation in microbiology**, v. 15, n. 2, p. 172-198, 2007.

POURBAKHS, S.A.; BOULIANNE, M.; MARTNEAU-DOIZÉ, B.; DOZOIS, C.M.; DESAUTELS, C.; FAIRBROTHER, J.M. Dynamics of *Escherichia coli* infections in experimentally inoculated chickens. **Avian Diseases**, v. 41, p. 221-233, 1997.

PRATA, L.F.; FUKUDA, R.T. **Fundamentos de higiene e inspeção de carnes**. Jaboticabal: FUNDEP, 2001. 348 p.

QUINN, P.J.; MARKEY, B.K.; CARTER, M.E.; DONNELLY, W.J.C.; LEONARD, F.C.; MAGUIRE, D. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**, Porto Alegre: Artmed, 2005, 512 p.

RANDALL, C.J.; REECE, R.J. **Color atlas of avian histopathology**. Turin: Mosby-Wolfe, 1996, 232p.

ROCHA, A.C.G.P.; ROCHA, S.L.S.; LIMA-ROSA, C.A.V.; SOUZA, G.F.; MORAES, H.L.S.; SALLE, F.O.; MORAES, L.B.; SALLE, C.T.P. Genes associated with pathogenicity of avian *Escherichia coli* (APEC) isolated from respiratory cases of poultry. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, n. 3, p. 183-186, 2008.

RODRIGUES, J.; THOMAZINI, C.M.; LOPES, C.A.M.; DANTAS, L.O. Concurrent infection in a dog and colonization in a child with a human Enteropathogenic *Escherichia coli* clone. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 3, p. 1388-1389, 2004.

RON, E.Z. Host appecificity of septicemic *Escherichia coli*: human and avian pathogens. **Current Opinion in Microbiology**, v. 9, n. 1, p. 28-32, 2006.

ROQUE-SPECHT, V.F.; CASTRO, J.E.E.; FIOD NETO, M. Avaliação de risco quantitativa como uma ferramenta para a caracterização da segurança microbiológica do alimento. **Gestão da produção, operações e sistemas**, v. 4, p. 37-48, 2007.

SANTANA, A.P.; MURATA, L.S.; FREITAS, C.G.; DELPHINO, M.K.; PIMENTEL, C.M. Causes of condemnation of carcasses from poultry in slaughterhouses located in state of Goiás, Brasil. **Ciência Rural**, v. 38, n. 9, p. 2587-2592, 2008.

SANTOS, J.A. **Patologia especial dos animais domésticos**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1986. 576p.

SANTOS, R.G.; GIL-TURNES, C. Probióticos em avicultura. **Ciência Rural**, v.35, n.3, p.741-747, 2005.

SEAGRI. Secretaria de Agricultura, Irrigação e Reforma Agrária. Apresenta informações sobre a agropecuária baiana e sobre a entidade. Disponível em:<http://www.seagri.ba.gov.br/investir_oportunidadep.asp#AVICULTURA>. Acesso em: 13 out. 2008.

SEAGRI. Secretaria de Agricultura, Irrigação e Reforma Agrária. Apresenta informações sobre a agropecuária baiana e sobre a entidade. Disponível em: <http://www.seagri.ba.gov.br/investir_oportunidadep.asp>. Acesso em: 17 out. 2009a.

SEAGRI. Secretaria de Agricultura, Irrigação e Reforma Agrária. Apresenta informações sobre a agropecuária baiana e sobre a entidade. Disponível em: <http://www.seagri.ba.gov.br/bahia_estimativa_safra.pdf>. Acesso em: 01 out. 2009b.

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

SILVA, V.D.A. Estudo sobre as principais causas de condenação total de carcaças de frango em um matadouro avícola do estado da Bahia sob inspeção federal. 2005. 70f. Monografia (Graduação)-Universidade Federal da Bahia, Salvador.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 8.ed. São Paulo: Artmed, 2006.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. (Org.). **Microbiologia**. 4 ed., São Paulo: Atheneu, 2005. 718p.

UBA. União Brasileira de Avicultura. Apresenta informações sobre a avicultura do Brasil e sobre a entidade. Disponível em: <http://www.uba.org.br/site3/ultimo_abril_2009.php>. Acesso em: 30 set. 2009.

UBA. União Brasileira de Avicultura. Apresenta informações sobre a avicultura do Brasil e sobre a entidade. Disponível em: <http://www.uba.org.br/agosto/1_alojamento_de_matrizes_de_corte.xls>. Acesso em: 11 out. 2008.

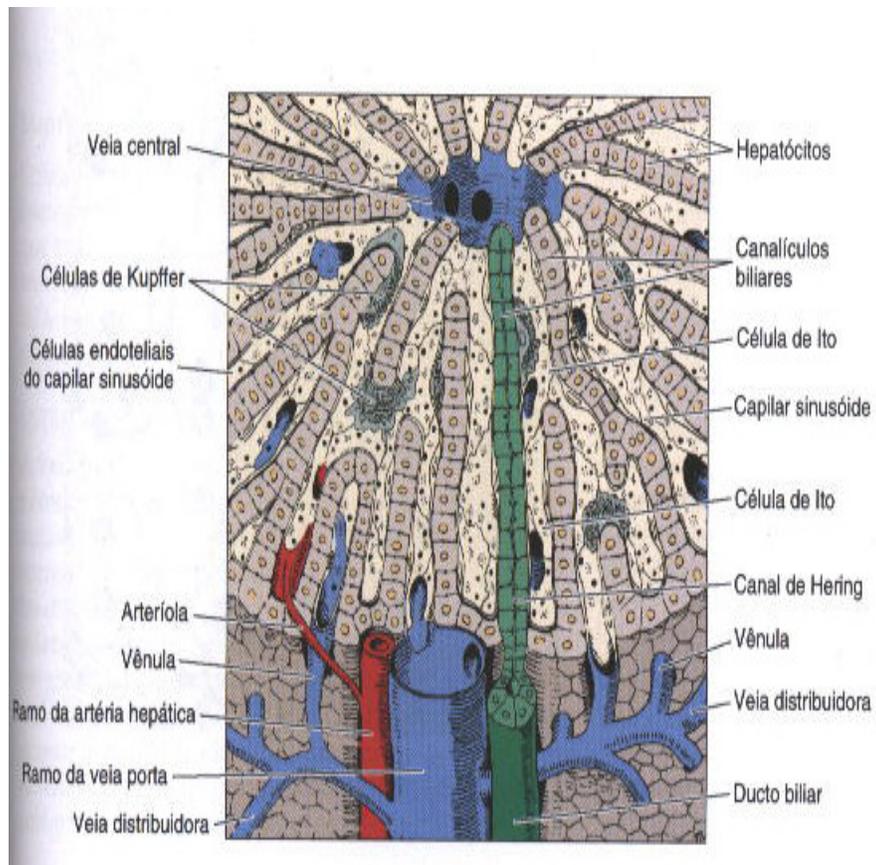
VIEIRA, D.P. Técnicas de PCR: aplicações e padronização de reações. Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. Disponível em: <<http://www.imtsp.fm.usp.br/Proto/protocol.html>>. Acesso em: 17 out. 2009.

VIEIRA-PINTO, M.; MATEUS, T.; SEIXAS, F.; FONTES, M.C.; MARTINS, C. O papel da inspeção sanitária post-mortem em matadouros na detecção de lesões e processos patológicos em aves. Quatro casos de lesões compatíveis com a doença de Marek em carcaças de aves rejeitadas. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 98, n. 547, p. 145-148, 2003.

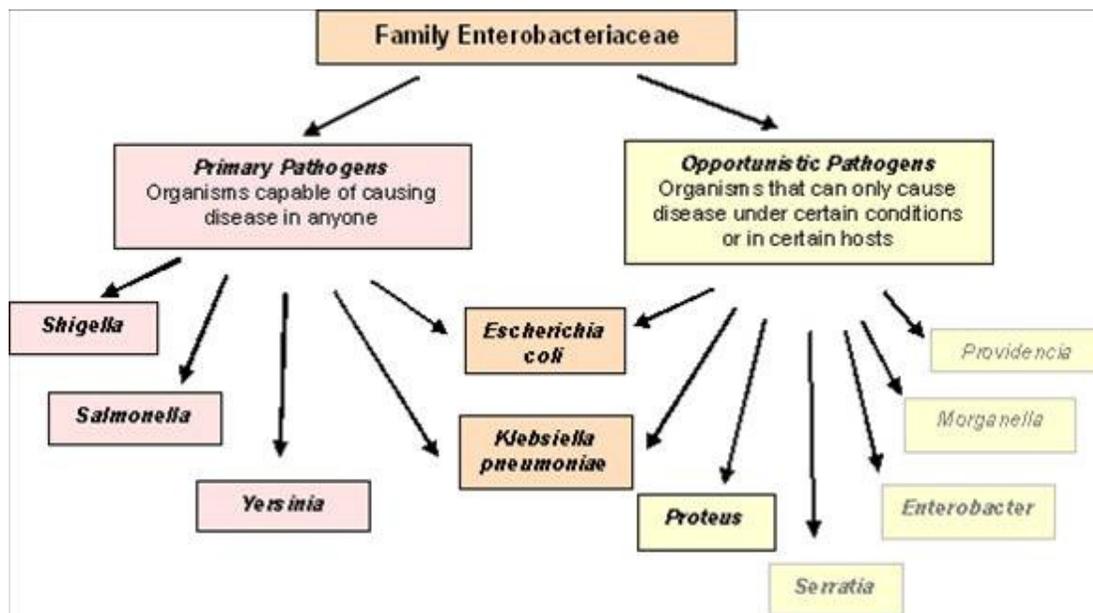
ZANATTA, G.F.; KANASHIRO, A.M.I.; CASTRO, A.G.M.; CARDOSO, A.L.S.P.; TESSARI, E.N.C.; PULICI, S.C.P. Suscetibilidade de amostras de *Escherichia coli* de origem aviária a antimicrobianos. **Arq. Inst. Biol.**, v. 71, n. 3, p. 283-286, 2004.

5 ANEXOS

ANEXO A – Modelo esquemático do fígado inalterado (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).



ANEXO B - Diagrama representativo da Família *Enterobacteriaceae* e sua relação com os hospedeiros



Fonte: <http://faculty.ircc.edu/faculty/tfischer/images/enterobacteriaceae.jpg>

ANEXO C – Quadro das características de virulência dos principais patotipos de *Escherichia coli*.

Patotipo	Patologia	Principais sorogrupos
<i>E. coli</i> enteropatogênicas (EPEC)	Diarréia em humanos e animais.	O55; O86; O111; O114; O119; O125; O126; O127; O128; O142.
<i>E. coli</i> enterotoxigênicas (ETEC)	Diarréia em humanos e animais.	O6; O8; O15; O25; O27; O78; O128.
<i>E. coli</i> enteroinvasivas (EIEC)	Diarréia em humanos e animais.	O28ac; O112; O124; O136; O143; O144; O173.
<i>E. coli</i> enterohemorrágicas (EHEC),	Diarréia em humanos e animais Doença do edema em suínos. Síndrome da colite hemolítico-urêmica hemorrágica em humanos	O157:H7; O111; O5; O26; O55.
<i>E. coli</i> enteroagregativas (EaggEC)	Diarréia em humanos e animais.	Sorotipos específicos (Doença do edema dos suínos): O138:K81; O139:K82; O141:K85.
<i>E. coli</i> uropatogênica (UPEC)	Infecções urinária em humanos e animais (cistite e pielonefrite).	O1; O2; O4; O6; O7; O8; O25; O62; O75.
<i>E. coli</i> de meningite neonatal (NMEC)	Meningite em crianças recém-nascidas.	O1; O6; O7; O16 O18; O83.
<i>E. coli</i> enteropatogênica para coelhos (REDEC)	Diarréia em coelhos.	O15; O26; O103; O109
<i>E. coli</i> patogênica para aves (APEC)	Doenças extra-intestinais nas aves.	O1; O2; O21; O36; O45; O78; K1; K80
<i>E. coli</i> que adere difusamente (DAEC)	Diarréia em humanos.	O8.

Fonte: Adaptado de Ferreira e Knobl (2000).

6 ARTIGOS CIENTÍFICOS

6.1 CARACTERIZAÇÃO ANÁTOMO-HISTOPATOLÓGICA DE FÍGADOS DE FRANGOS CONTAMINADOS POR *Escherichia coli* PROVENIENTES DE MATADOUROS AVÍCOLAS – MANUSCRITO A SER SUBMETIDO À REVISTA PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA - VERSÃO IMPRESSA ISSN 0100-736X.

Caracterização anátomo-histopatológica de fígados de frangos contaminados por *Escherichia coli* provenientes de matadouros avícolas

Anatomic and histopathological characterization of poultry livers contaminated with *Escherichia coli* from slaughterhouses

Isabella de Matos Mendes da Silva^{I,II}, Marcílio Delan Baliza Fernandes^{II}, Marcos Pereira Santos^{II}, Larissa Tannus Rebouças^{II}, Édila Verônica da Silva Rocha^{II}, Vilmara Almeida Santos^{II}, Ricardo Mendes da Silva^{II}, Marília Lima Costa^{III}, Joaquim Evêncio-Neto^I

^IPrograma de Pós-Graduação em Ciência Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manuel de Medeiros, S/N, Dois Irmãos, Recife-PE, CEP 50.171-900.

Autor para correspondência. E-mail: isbellamatos@yahoo.com.br

^{II}Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Rua do Cajueiro, S/N, Cajueiro, Santo Antônio de Jesus-BA, CEP 44.570-000

^{III}Agência Estadual de Defesa Agropecuária da Bahia, Avenida Adhemar de Barros, 967, Ondina, Salvador-BA, CEP 40.170-110

RESUMO

A contínua intensificação da produção no setor avícola propicia condições que favorecem a ocorrência e a disseminação de alguns patógenos, como a *Escherichia coli*, podendo provocar infecções graves nos animais e no homem. O objetivo deste trabalho foi caracterizar a anátomo-histopatologia de fígados de frangos contaminados por *Escherichia coli*. Para tanto foram colhidas 62 amostras de fígados de frango, sendo 30 fígados com aspecto macroscópico inalterado e 32 fígados com alteração macroscópica que originou o descarte da carcaça pela inspeção da linha B. *Escherichia coli* foi isolada em 45,5% (27/62) dos fígados coletados. A bactéria foi isolada em 18 amostras de fígados com aspecto macroscópico inalterado e nove (9) amostras de fígados provenientes de carcaças que foram rejeitadas. A colangio-hepatite (16/27) foi a alteração inflamatória predominante, sendo considerada multifocal em 15/16 fígados. Houve a predominância de heterófilos e mononucleares (12/27). Os critérios de condenação das carcaças foram inadequados, haja vista o isolamento de *Escherichia coli* em 18/27 amostras de fígados oriundos de carcaças consideradas próprias para o consumo humano.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: *Escherichia coli*, fígado, frango de corte, matadouros avícolas, inspeção.

ABSTRACT

Huge poultry production may increase pathogens such as *Escherichia coli*, which can cause serious infections in animals and humans. The objective of this study was to characterize the anatomical and histopathology of livers of chickens contaminated with *Escherichia coli*. 62 liver chicken samples were collected from two slaughterhouses situated in the State of Bahia. 30 livers were macroscopic unchanged and 32 showed macroscopic alterations that lead to carcass disposal for inspection of line B. *Escherichia coli* was isolated in 45.5% (27/62) of livers collected. The bacterium was isolated from 18 unchanged livers samples and 9 from carcasses that were rejected. The cholangiohepatitis (16/27) was predominant considering inflammatory alterations, and were considered multifocal in 15/16 livers. Heterophils and mononuclear cells were predominant (12/27). The criteria for condemnation of carcasses were inadequate, taking into consideration that pathogenic *Escherichia coli* were presented in 18/27 from apparently healthy animals.

INDEX TERMS: *Escherichia coli*, liver, poultry, slaughterhouses, inspection.

INTRODUÇÃO

A contínua intensificação da produção no setor avícola propicia condições que favorecem a ocorrência e a disseminação de alguns patógenos, como a *Escherichia coli*, podendo provocar infecções graves nos animais e no homem.

A *E. coli* tem comprovado papel como patógeno entérico e também extraintestinal, sendo o agente etiológico de um amplo espectro de infecções invasivas na espécie humana e animal, além de ser um dos integrantes da microbiota intestinal de mamíferos e aves (Ron 2006).

Embora os relatos afirmem que o ambiente dos matadouros avícolas é propício à instalação e à proliferação de *Escherichia coli*, poucos trabalhos têm sido desenvolvidos para esclarecer quais alterações anátomo-histopatológicas estão associadas à contaminação por esses microrganismos. Não se tem certeza se frangos contaminados por Enterobactérias são descartados, levando-se em consideração as alterações macroscópicas do fígado no momento da inspeção.

O serviço oficial de inspeção sanitária dos matadouros avícolas, representado pelo Serviço de Inspeção Federal (SIF) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e suas representações estaduais e municipais, são responsáveis pela garantia da qualidade da carne e vísceras para o consumo. O fígado é inspecionado na Linha B na etapa de evisceração e os critérios de condenação de vísceras de frango, especialmente do fígado, consideram o aspecto visual (cor, forma e tamanho), consistência e odor do órgão (Brasil 1998).

Para a prevenção da contaminação por *Escherichia coli* é importante a implementação e a contínua manutenção de medidas de higiene e biossegurança no sistema de produção avícola, em função da larga distribuição ambiental do microrganismo e da consequente e inevitável presença dessa bactéria em alimentos (Minharro et al. 2001). O objetivo deste estudo foi analisar as lesões anátomo-histopatológicas de fígados de frangos contaminados por *Escherichia coli* provenientes de matadouros avícolas da Bahia.

MATERIAL E MÉTODOS

Procedência das amostras

Nos meses de julho a agosto de 2008 foram colhidas aleatoriamente 62 amostras de fígados de frangos (*Gallus gallus*) provenientes de dois matadouros avícolas do Recôncavo da Bahia, sob fiscalização da Agência de Defesa Agropecuária da Bahia (ADAB), sendo 30 fígados com aspecto macroscópico inalterado e 32 fígados com alteração macroscópica que originou o descarte da carcaça pela inspeção da linha B, um deles abatendo 12.000 animais/dia e o outro 4.000 animais/dia. As alterações que originaram o descarte da carcaça foram septicemia (36%), seguida por síndrome ascítica (26%), colibacilose (19%), caquexia (13%) e aerossaculite (6%).

Coleta das amostras

Cada amostra foi constituída de um único fígado de frango, coletado na linha de inspeção com o auxílio do Fiscal Agropecuário Estadual. As amostras foram coletadas assepticamente com uma lâmina de bisturi, acondicionada em recipientes estéreis, identificadas, refrigeradas e depois enviadas ao Laboratório de Microbiologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), sendo imediatamente executadas as análises microbiológicas e avaliação macroscópica. No laboratório, porções de cada amostra foram colocadas em frascos com formol tamponado a 10% e enviadas ao Laboratório de Anatomia Patológica da Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia (UFBA) para realização das análises histopatológicas.

Avaliação macroscópica das amostras

Os parâmetros utilizados para descrição da macroscopia foram a coloração, superfície, tamanho, consistência e presença ou não de lesões no parênquima ao corte. Após essa etapa, as amostras foram fotografadas.

Análise histopatológica das amostras

Foram retirados das amostras fragmentos hepáticos aparentemente saudáveis e áreas com lesões para a realização de cortes para análise histopatológica, totalizando 4 fragmentos por fígado. Os fragmentos foram fixados em formol tamponado a 10% e preparados para inclusão em parafina. Em seguida foram cortados em micrótomo ajustado para 5 µm, Os cortes obtidos corados pela hematoxilina-eosina. Duas seções histológicas foram examinadas sob microscopia de luz.

Isolamento e identificação de *Escherichia coli*

Cada amostra de fígado pesando 1 g, devidamente identificada, foi macerada e semeada em 9 ml do caldo de infusão de cérebro coração (*Brain Heart Infusion* - BHI), para posterior semeadura em Agar McConkey com auxílio de uma alça de platina e incubadas em posição invertida em estufa bacteriológica a 37°C durante 18 h.

Transcorrido o tempo de incubação do plaqueamento seletivo, colônias suspeitas de *Escherichia coli* pelas características coloniais típicas (colônias rosas-avermelhadas, lactose positivas) e morfotintoriais (bacilos Gram-negativos) foram transferidas com auxílio de agulha de platina para os meio bioquímicos.

Fazendo-se semeadura em meios líquidos e semeadura mista nos meios sólidos, as colônias suspeitas de *Escherichia coli* foram semeadas para verificar a produção de sulfeto de hidrogênio e fermentação da glicose utilizando o Ágar tríplice açúcar-ferro (TSI), fermentação e oxidação da glicose, reação do citocromo oxidase, produção de fenilalanina desaminase, produção de indol, motilidade e produção de sulfeto de hidrogênio utilizando o meio Sulfeto Indol Motilidade (SIM), produção de urease, prova do vermelho de metila (VM), Prova do Voges-Proskauer (VP) e utilização de Citrato.

Os meios foram incubados em estufa bacteriológica a 37°C durante 24-48h. A leitura e interpretação das provas bioquímicas foram feitas de acordo com Koneman et al. (2008). Foram considerados como *E. coli* os cultivos que apresentaram as seguintes características: TSI (Pico ácido/Fundo ácido), sulfeto de hidrogênio negativa, Glicose positiva com presença de gás no tubo de Durham, reação do citocromo oxidase negativa, fenilalanina desaminase negativa, Indol positiva, motilidade positiva, urease negativa, VM positiva, VP negativa e Citrato negativa.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Escherichia coli foi isolada em 45,5% (27/62) dos fígados coletados. A bactéria foi isolada em 18 amostras de fígados com aspecto macroscópico inalterado e nove (9) amostras de fígados provenientes de carcaças que foram rejeitadas por septicemia (3/9), colibacilose (3/9), caquexia (2/9) e síndrome ascítica (1/9).

Um percentual menor foi observado por Barcelos et al. (2006), que avaliaram através da macroscopia, histopatologia e bacteriologia, fígados de frangos condenados no abate. Dos 100 fígados analisados por esses autores, isolou-se *Escherichia coli* em 21 amostras. Dos 10 fígados sem alterações coletados, houve o isolamento de *E. coli* em 2 amostras. Em contraste, Miharro et al. (2001) isolaram *E. coli* em 80,64% (25/31) das amostras de carcaças de frangos condenadas por aerossaculite pelo Serviço de Inspeção Federal. Eles avaliaram o envolvimento de *E. coli*, *Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma synoviae* e o percentual encontrado de *E. coli* se refere aos casos de infecção mista e simples. Apesar de não ter sido isolada *E. coli* em fígados oriundos de carcaças condenadas por aerossaculite, a bactéria pode estar associada a essa patologia.

Haiden et al. (2004) isolaram *E. coli* em 96,66% (29/30) amostras provenientes de *swab* intestinal de aves doentes ou mortas.

Resultados semelhantes ao estudo em questão foram encontrados por Fernandes (2008) que determinou o índice colimétrico e pesquisou *E. coli* em 30 amostras de frangos comercializados em Salvador-Bahia, incluindo amostras de frangos congelados industrializados, frangos resfriados industrializados e frangos não industrializados e a *E. coli* foi isolada em 50% das amostras analisadas. Um número significativamente maior de isolados foi citado por Silva et al. (2002) que detectaram *E. coli* em 95% das 60 amostras de frangos refrigerados oriundas da cidade de João Pessoa-PB.

Vale salientar que no caso dos estudos de Fernandes (2008) e Silva et al. (2002) as amostras foram carcaças de frangos e a contaminação pode advir de outras fontes, como manipulação

inadequada e equipamentos e utensílios contaminados, e, no estudo em questão, o microrganismo possivelmente contaminou a ave na granja, haja vista as lesões histopatológicas observadas. Segundo Maclachlan e Cullen (1998), usualmente o fígado está envolvido nas infecções hematógenas, por receber tanto sangue arterial quanto sangue venoso do trato gastrointestinal. A infecção do fígado e a subsequente inflamação no órgão podem ser primárias, ou fazem parte de um processo sistêmico.

Dentre os parâmetros macroscópicos observados, destaca-se a cor do fígado, que se constitui um parâmetro importante para detecção de patologias. A cor mais frequente das amostras nas quais houve o isolamento de *Escherichia coli* foi a castanho-escura (20/27), seguida da marrom-pálida (4/27) e esverdeada (3/27). Salienta-se que das 20 amostras com coloração castanho-escura, 18 eram provenientes de frangos considerados aptos para o consumo, sendo a cor esperada para um fígado proveniente de um animal hígido, conforme Dice et al. (2004) e dois (2) eram de fígados oriundos de carcaças rejeitadas devido a caquexia.

Associadas às alterações geralmente difusas na coloração, foram observadas alterações macroscópicas que provavelmente contribuíram para que a carcaça fosse condenada, tais como aumento ou diminuição de volume (5/27), áreas esverdeadas (4/27), focos necróticos (3/27), consistência friável (3/27) e espessamento das bordas (1/27) (Figura 1). O peso dos fígados variou de 36,26 a 53,84 para os órgãos oriundos de carcaças consideradas aptas para o consumo e 19,14 a 77,22 para os órgãos originários de carcaças rejeitadas.

Dey et al. (2003) analisaram 150 amostras de fígados provenientes de animais com septicemia/toxemia associados a coliformes, sendo a *Escherichia coli* a principal espécie, e

observaram alterações macroscópicas, como aumento de volume (81), consistência friável (50), evidências de hemorragia (30) e focos necróticos (12).

Supartika et al. (2007) analisaram amostras de fígado com lesões para histopatologia e bacteriologia e 89,59% dos fígados estavam aumentados de tamanho, tinham uma consistência firme e mostravam múltiplos focos necróticos e a maior proporção dos fígados apresentavam *Escherichia coli*, *Bacteroides* spp., *Lactobacillus* spp., *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp.

Vieira-Pinto et al. (2003) acompanharam a inspeção *post mortem* de 49.121 aves abatidas em matadouro, registraram as causas de rejeição total e realizaram necropsia e análise histopatológica de amostra das aves rejeitadas, objetivando o conhecimento da relação entre as causas que conduzem a uma rejeição total das carcaças de aves e o quadro lesional identificado no decurso da necropsia das aves rejeitadas. Foram rejeitadas 344 aves durante as 12 visitas realizadas em um mês, e foi realizada necropsia de 26 aves, seguida de análise histopatológica de órgãos, como fígado e coração. As causas que contribuíram para uma maior rejeição *post mortem* na linha do abate foram traumatismo, caquexia e síndrome ascítica, nos frangos de corte, má-sangria, nos frangos do campo e salpingite, nas galinhas poedeiras. Foi constatado que os frangos rejeitados com ascite apresentavam lesões no fígado e/ou coração, salientando-se que as lesões hepáticas dificultam o retorno venoso. Os autores enfatizaram a importância da necropsia de uma amostra de aves rejeitadas por causas inespecíficas, como caquexia, má-sangria e ascite, permitindo a tomada de decisão mais conveniente para um maior entendimento do problema para resolução do mesmo, como a necropsia de um maior número de aves e análises microbiológicas e sorológicas.

Dentre os tipos de inflamação observados na microscopia, destacam-se a colangio-hepatite (16/27), seguida de pericolangite (7/27), colangite (2/27) e hepatite (2/27). A lesão foi considerada multifocal em 22/27 fígados (15/16 amostras de colangio-hepatite) e focal em 5/27. O grau da lesão foi considerado moderado (16/27), discreto (6/27) e acentuado (5/27). O processo inflamatório era constituído pela associação de dois tipos celulares, principalmente heterófilos e mononucleares (12/27), seguido por apenas heterófilos (8/27) e apenas mononucleares (7/27). Salienta-se que nas amostras de fígados oriundos de carcaças que foram rejeitadas, a colangio-hepatite foi observada em 7/9 amostras e a lesão foi considerada multifocal em todos os casos (Figura 2). Dessas amostras 4/9 apresentavam necrose, as quais foram caracterizadas como necrose de liquefação.

Esses dados corroboram com os achados de Barcelos et al. (2006) que observaram com maior incidência a colangio-hepatite heterofílica multifocal (9/26), seguida de hepatite necrosante aleatória (6/26) como achado microscópico associado ao isolamento de *E. coli*. Resultados semelhantes também foram encontrados por Haider et al. (2004) que relataram infiltrados mistos, com predominância de heterófilos e linfócitos principalmente na região do espaço porta, como achados microscópicos relacionados à presença de *E. coli*. Dey et al. (2003) observaram pericolangite, colangio-hepatite, edema, fibrose hepática e necrose como achados microscópicos predominantes nos fígados provenientes de animais com septicemia relacionada com a *E.coli*, sendo que mais da metade das amostras apresentavam mais de uma alteração microscópico.

Apesar de não serem específicas, a colangio-hepatite e pericolangite com predominância de heterófilos podem estar associadas ao *Clostridium perfringens*, especialmente os sorotipos A e E, produtores de toxina α e α e β , respectivamente (Silva et al. 2009). Lovland e Kaldhusdal (2001) encontraram dados semelhantes em 33/45 amostras de fígados de frangos rejeitados no matadouro.

A congestão foi considerada discreta em 12/27 fígados, seguida de moderada (9/27) e acentuada (6/27). A hemorragia foi observada em 3/27 amostras e necrose em 7/27. A fibrose periportal ocorreu em 6/27 amostras e a hiperplasia dos ductos biliares em 9/27. Foram observados microabscessos em 9/27 amostras. 2/27 amostras apresentavam esteatose. Como são consideradas alterações microscópicas inespecíficas, alguns desses achados foram semelhantes aos encontrados por Morais (2004) que realizou análise histológica e pesquisa de Aflatoxinas em 180 aves com 28 dias de idade e concluiu que nas aflatoxicoses pode haver esteatose, necrose, aumento do núcleo dos hepatócitos com marginalização da cromatina e nucléolo proeminente, além de hiperplasia dos ductos biliares.

Stooforth et al. (2007) avaliaram as mudanças na contagem total de bactérias, coliformes totais, *Escherichia coli* e incidência de *Salmonella* em carcaças e cortes de frangos e água de processamento e houve redução de 2,4, 2,8, 2,9 log Unidades Formadoras de Colônias/ml e 79%, respectivamente, após a intervenção no processamento, incluindo intensificação dos processos de lavagem e utilização de compostos clorados.

Por conseguinte, os critérios de condenação das carcaças foram inadequados, haja vista o isolamento de *Escherichia coli* em 18/27 amostras de fígados de frangos que foram liberados

para consumo. É necessária a adoção de um protocolo no matadouro avícola, que inclua necropsia, análises microbiológicas e sorológicas de uma amostra de aves rejeitadas e outras aparentemente sadias, permitindo o diagnóstico mais preciso e a identificação de agentes patogênicos e prevenção na granja e matadouro, visando à sanidade avícola e a produção de alimento seguro.

Agradecimentos - À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior e a Universidade Federal do Recôncavo da Bahia pelo fomento de bolsa. À Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e à Universidade Federal da Bahia pela disponibilidade das instalações. À Agência de Defesa Agropecuária da Bahia e matadouros avícolas pelo uso das instalações e doação dos fígados.

REFERÊNCIAS

Barcelos, A.S.; Flôres, M.L.; Kommers, G.D.; Nascimento, V.P.; Segabinazi, S.D.; Antoniazzi, T.; Bassan, J.D.L. Macroscopia, histopatologia e bacteriologia de fígados de frangos (*Gallus gallus*) condenados no abate. **Ciência Rural**, v. 36, n. 2, p. 561-567, 2006.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria n. 210, de 10 de novembro de 1998. Aprova o Regulamento Técnico da Inspeção Tecnológica e Higiênico-Sanitária de Carne de Aves. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 26 nov. 1998. Disponível em: <[HTTP://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consultarLegislacao.do](http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consultarLegislacao.do)>. Acesso em: 20 nov. 2006.

Dey, B. P.; Chen, Y. R.; Hsieh, C.; Chan, D.E. Detection of septicemia in chicken livers by spectroscopy. **Poultry Science**, v. 82, p. 199-206, 2003.

Dice, K.M.; Sack, W.O.; Wensing, C.J.G. **Tratado de anatomia veterinária**. 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.

Fernandes, M.V.M. Determinação do índice colimétrico e pesquisa de *Escherichia coli* em frangos comercializados na cidade de Salvador. 2008. 55f. Monografia (Graduação) - Universidade Federal da Bahia, Salvador.

Haider, M.G.; Hossain, M.G.; Hossain, M. S.; Chowdhury, E.H.; Das, P.M.; Hossain, M. M. Isolation and characterization of Enterobacteria associated with health and disease in sonali chickens. **Bangladesh Journal of Veterinary Medicine**, v. 2, n. 1, p. 15-21, 2004.

Koneman, E.W.; Allen, S.D.; Janda, W.M.; Schreckenberger, P.C.; Winn, W.C. **Diagnóstico microbiológico-texto e atlas colorido**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 1760p.

Lovland, A.; Kaldhusdal, M. Severely impaired production performance in broiler flocks with high incidence of *Clostridium perfringens* associated hepatitis. **Avian Pathology**, v. 30, p. 73-81, 2001.

Maclachlan, N.J.; Cullen, J..M. Fígado, Sistema Biliar E Pâncreas Exócrino. In: Thomson, R.G. **Patologia Veterinária Especial**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 1998. p. 265-298.

Minharro, S.; Linhares, G.F.C.; Andrade, M.A.; Rocha, P.T.; Santana, A.P. Envolvimento de *Escherichia coli*, de *Mycoplasma gallisepticum* e de *Mycoplasma synoviae* em lesões de sacos aéreos em frangos abatidos no estado de Goiás. **Ciência Animal Brasileira**, v. 2, n. 2, p. 111-117, 2001.

Moraes, L.B. Estabelecimento de escores histopatológicos de lesão hepática e determinação dos valores normais das Enzimas aspartato aminotransferase e creatinina quinase em frangos de corte. 2004. 46f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Programa de Pós-

Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

Ron, E.Z. Host apecificity of septicemic *Escherichia coli*: human and avian pathogens. **Current Opinion in Microbiology**, v. 9, n. 1, p. 28-32, 2006.

Silva, J.A.; Averêdo, G.A.; Barros, C.M.R.; Costa, E.L.; Falcão, M.M.S. Incidência de bactérias patogênicas em carne de frango refrigerada. **Higiene Alimentar**, v. 16, n. 100, p.97-101,2002.

Silva, R.O.S.; Salvarani, F.M.; Assis, R.A.; Martins, N.R.S.; Pires, P.S.; Lobato, F.C.F. Antimicrobial susceptibility of *Clostridium perfringens* strains isolated from broiler chickens. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, n. 262-264, 2009.

Supartika, I.K.E.; Stroom-Kruyswijk, J.H; Toussaint, M.J.M.; Gruys, E. Necrotizing granulomatous hepatitis in slaughtered broilers. **Avian diseases**, v. 51, n. 2, p. 632-638, 2007.

Stooforth, J.D.; O'Connor, R.; Lopes, M.; Kottapalli, B.; Hill, W.E.; Samadpour, M. Validation of individual and multiple-sequencial interventions for reduction of microbial populations during processing of poultry carcasses and parts. **International Association for Food Protection**, v. 70, n. 6, p. 1393-1401, 2007.

Vieira-Pinto, M.; Mateus, T.; Seixas, F.; Fontes, M.C.; Martins, C. O papel da inspeção sanitária *post-mortem* em matadouros na detecção de lesões e processos patológicos em aves. Quatro casos de lesões compatíveis com a doença de Marek em carcaças de aves rejeitadas. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 98, n. 547, p. 145-148, 2003.

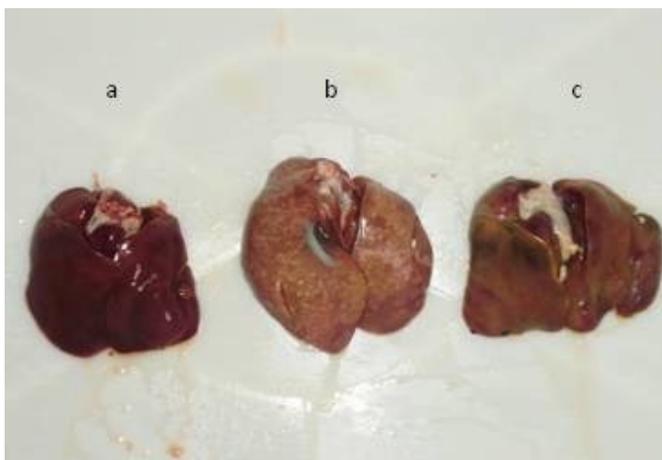


Figura 1 – Fotografia de fígados de frango provenientes de matadouro avícola da Bahia sob inspeção estadual. Observar fígado macroscopicamente inalterado (a); presença de focos necróticos, associada à condenação total da carcaça por Colibacilose (b); presença de áreas esverdeadas, associada à condenação total por Septicemia (c).

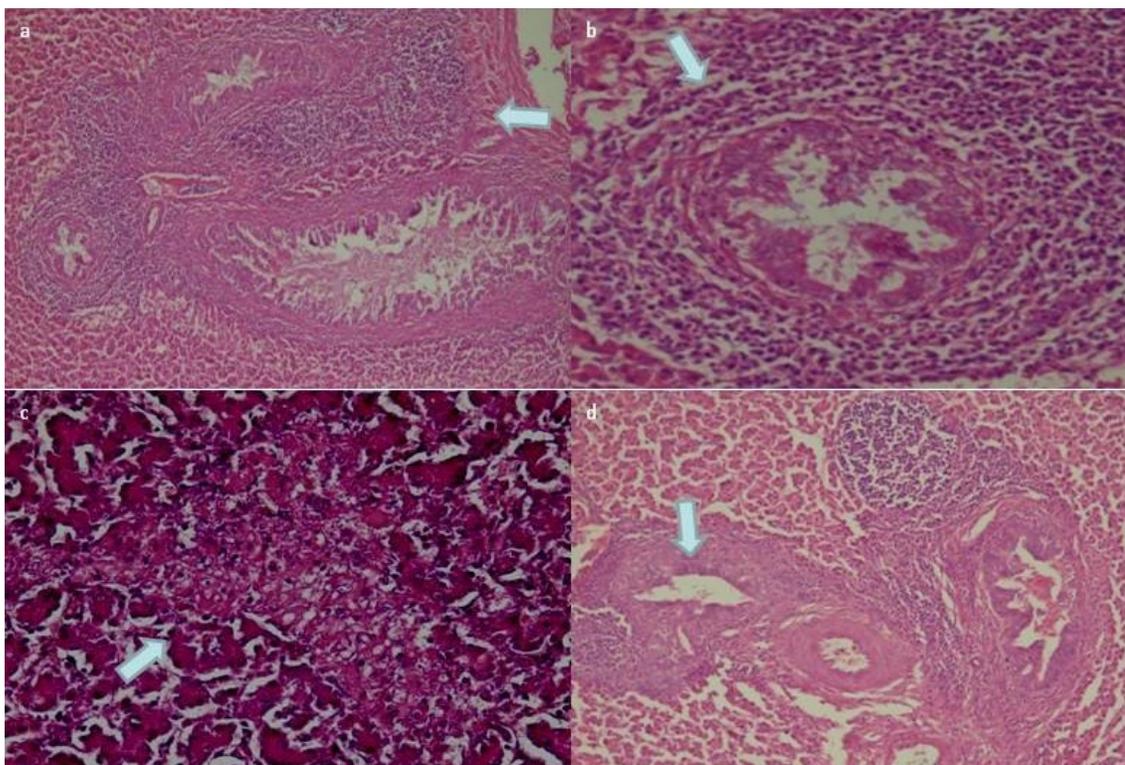


Figura 2 – Fotomicrografia de fígado de frango com presença de *Escherichia coli*. Observar colangite com presença de heterófilos e mononucleares, aumento 110X, coloração H-E (a); infiltrado mononuclear e hiperplasia periductal, aumento 430X, coloração H-E (b); necrose liquefativa, aumento 430X, coloração H-E (c); microabscesso associado ao espaço porta e destruição da arquitetura ductal, aumento 430X, coloração H-E (d).

NORMAS DA REVISTA PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA

O objetivo da revista **Pesquisa Veterinária Brasileira** é contribuir, através da publicação dos resultados de pesquisa e sua disseminação, para a manutenção da saúde animal que depende, em grande parte, de conhecimentos sobre as medidas de profilaxia e controle veterinários.

Com periodicidade mensal, a revista publica trabalhos originais e artigos de revisão de pesquisa no campo da patologia veterinária no seu sentido amplo, principalmente sobre doenças de importância econômica e de interesse para a saúde pública.

Apesar de não serem aceitas comunicações ("Short communications") sob forma de "Notas Científicas", não há limite mínimo do número de páginas do trabalho enviado, contudo devem conter pormenores suficientes sobre os experimentos ou a metodologia empregada no estudo.

Os trabalhos, em 3 vias, escritos em português ou inglês, devem ser enviados, junto com disquete de arquivos (de preferência em Word 7.0), ao editor da revista **Pesquisa Veterinária Brasileira**, no endereço abaixo. Devem constituir-se de resultados ainda não publicados e não considerados para publicação em outra revista.

Embora sejam de responsabilidade dos autores as opiniões e conceitos emitidos nos trabalhos, os editores, com a assistência da Assessoria Científica, reservam-se o direito de sugerir ou solicitar modificações aconselháveis ou necessárias.

1. Os trabalhos devem ser organizados, sempre que possível, em **Título, Abstract, Resumo, Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão, Conclusões** (ou combinações destes três últimos), **Agradecimentos e Referências**:

- a) o **Título** do artigo deve ser conciso e indicar o conteúdo do trabalho;
- b) um **Abstract**, um resumo em inglês, deverá ser apresentado com os elementos constituintes observados nos artigos em português, publicados no último número da revista, ficando em branco apenas a paginação, e, no final, terá indicação dos *index terms*;
- c) o **Resumo** deve apresentar, de forma direta e no passado, o que foi feito e estudado, dando os mais importantes resultados e conclusões; será seguida da indicação dos termos de indexação; nos trabalhos em inglês, **Resumo** e **Abstract** trocam de posição e de constituição (veja-se como exemplo sempre o último fascículo da revista);
- d) a **Introdução** deve ser breve, com citação bibliográfica específica sem que a mesma assuma importância principal, e finalizar com a indicação do objetivo do trabalho;
- e) em **Material e Métodos** devem ser reunidos os dados que permitam a repetição do trabalho por outros pesquisadores;
- f) em **Resultados** deve ser feita a apresentação concisa dos dados obtidos; quadros devem ser preparados sem dados supérfluos, apresentando, sempre que indicado, médias de várias repetições; é conveniente, às vezes, expressar dados complexos por gráficos, ao invés de apresentá-los em quadros extensos;

g) na **Discussão** os resultados devem ser discutidos diante da literatura; não convém mencionar trabalhos em desenvolvimento ou planos futuros, de modo a evitar uma obrigação do autor e da revista de publicá-los;

h) as **Conclusões** devem basear-se somente nos resultados apresentados no trabalho;

i) os **Agradecimentos** devem ser sucintos e não devem aparecer no texto ou em notas de rodapé;

j) a lista de **Referências**, que só incluirá a bibliografia citada no trabalho e a que tenha servido como fonte para consulta indireta, deverá ser ordenada alfabeticamente pelo sobrenome do primeiro autor, registrando os nomes de todos os autores, o título de cada publicação e, por extenso ou abreviado, o nome da revista ou obra, usando as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas - ABNT, *Style Manual for Biological Journals* (American Institute for Biological Sciences) e/ou *Bibliographic Guide for Editors and Authors* (American Chemical Society, Washington, D.C.).

2. Na elaboração do texto deverão ser atendidas as normas abaixo:

a) os trabalhos devem ser apresentados em uma só face do papel, em espaço duplo e com margens de, no mínimo, 2,5 cm; o texto será escrito corridamente; quadros serão feitos em folhas separadas, usando-se papel duplo ofício, se necessário, e anexados ao final do trabalho; as folhas, ordenadas em texto, legendas, quadros e figuras, serão numeradas seguidamente;

b) a redação dos trabalhos deve ser a mais concisa possível, com a linguagem, tanto quanto possível, no passado e impessoal; no texto, os sinais de chamada para notas de rodapé serão números arábicos colocados um pouco acima da linha de escrita, após a palavra ou frase que motivou a nota; essa numeração será contínua; as notas serão lançadas ao pé da página em que estiver o respectivo sinal de chamada; todos os quadros e todas as figuras serão mencionados no texto; essas remissões serão feitas pelos respectivos números e, sempre que possível, na ordem crescente desses; *Resumo* e *Abstract* serão escritos corridamente em um só parágrafo e não deverão conter citações bibliográficas;

c) no rodapé da primeira página deverá constar endereço profissional do(s) autor(es);

d) siglas e abreviações dos nomes de instituições, ao aparecerem pela primeira vez no trabalho, serão colocadas entre parênteses e precedidas do nome por extenso;

e) citações bibliográficas serão feitas pelo sistema "autor e ano"; trabalhos de dois autores serão citados pelos nomes de ambos, e de três ou mais, pelo nome do primeiro, seguido de "et al.", mais o ano; se dois trabalhos não se distinguirem por esses elementos, a diferenciação

será feita pelo acréscimo de letras minúsculas ao ano, em ambos; todos os trabalhos citados terão suas referências completas incluídas na lista própria (Referências), inclusive os que tenham sido consultados indiretamente; no texto não se fará menção do trabalho que tenha servido somente como fonte; esse esclarecimento será acrescentado apenas ao final das respectivas referências, na forma: "(Citado por Fulano 19...)"; a referência do trabalho que tenha servido de fonte será incluída na lista uma só vez; a menção de comunicação pessoal e de dados não publicados é feita, de preferência, no próprio texto, colocada em parênteses, com citação de nome(s) ou autor(es); nas citações de trabalhos colocados entre parênteses, não se usará vírgula entre o nome do autor e o ano, nem ponto-e-vírgula após cada ano; a separação entre trabalhos, nesse caso, se fará apenas por vírgulas, exemplo: (Flores & Houssay 1917, Roberts 1963a,b, Perreau et al. 1968, Hanson 1971);

f) a lista das referências deverá ser apresentada com o mínimo de pontuação e isenta do uso de caixa alta, sublinhando-se apenas os nomes científicos, e sempre em conformidade com o padrão adotado no último fascículo da revista, inclusive quanto à ordenação de seus vários elementos.

3. As **figuras** (gráficos, desenhos, mapas ou fotografias) deverão ser apresentadas em tamanho maior (cerca de 150%) do que aquele em que devam ser impressas, com todas as letras ou sinais bem proporcionados para assegurar a nitidez após a redução para o tamanho desejado; parte alguma da figura será datilografada; a chave das convenções adotadas será incluída preferentemente, na área da figura; evitar-se-á o uso de título ao alto da figura; desenhos deverão ser feitos com tinta preta em papel branco liso ou papel vegetal, vedado o uso de papel milimetrado; cada figura será identificada na margem ou no verso, a traço leve de lápis, pelo respectivo número e o nome do autor; havendo possibilidade de dúvida, deve ser indicada a parte superior da figura; fotografias deverão ser apresentadas em branco e preto, em papel brilhante, e sem montagem, ou em diapositivos (*slides*) coloridos; somente quando a cor for elemento primordial a impressão das figuras será em cores; para evitar danos por grampos, desenhos e fotografias deverão ser colocados em envelope.

4. As legendas explicativas das figuras conterão informações suficientes para que estas sejam compreensíveis e serão apresentadas em folha separada que se iniciará com o título do trabalho.

5. Os **quadros** deverão ser explicativos por si mesmos; cada um terá seu título completo e será caracterizado por dois traços longos, um acima e outro abaixo do cabeçalho das colunas;

entre esses dois traços poderá haver outros mais curtos, para grupamento de colunas; não há traços verticais; os sinais de chamada serão alfabéticos, começando de *a* em cada quadro, e as notas serão lançadas logo abaixo do quadro respectivo, do qual serão separadas por um traço curto, à esquerda.

Caracterização genotípica dos isolados de *Escherichia coli* provenientes de frangos de corte da Bahia

Genotypically characterization of *Escherichia coli* isolates from poultry of Bahia, Brazil

I.M.M. Silva^{I,II}, J. Evêncio-Neto^I, R.M. Silva^{II}, N. Lucena-Silva^{III}, J. Magalhães^{III}, M. Baliza^{II}

^IPrograma de Pós-Graduação em Ciência Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manuel de Medeiros, S/N, Dois Irmãos, Recife-PE, CEP 50.171-900. Autor para correspondência. E-mail: isabellamatos@yahoo.com.br

^{II}Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Rua do Cajueiro, S/N, Cajueiro, Santo Antônio de Jesus-BA, CEP 44.570-000.

^{III}Laboratório de Biologia Molecular do Serviço de Oncologia Pediátrica do Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira, Rua dos Coelhos, 300, Boa Vista, Recife-PE, CEP 50070-550.

RESUMO

Caracterizaram-se genotipicamente os isolados de *Escherichia coli* oriundos de fígados de frangos provenientes de dois matadouros avícolas da Bahia. Coletou-se 62 amostras de fígados de frangos, sendo 30 macroscopicamente inalterados e 32 com alteração macroscópica originando o descarte da carcaça. Isolou-se 30 cepas de *Escherichia coli* dos fígados dos frangos pelo método clássico, sendo 21 isoladas de fígados inalterados e 9 provenientes de carcaças rejeitadas. Utilizou-se a Reação em Cadeia de Polimerase para verificação de genes de virulência de *E. coli*, incluindo o gene de resistência sérica (*iss*) para identificação de *E. coli* patogênica para aves, gene para *Shiga cytotoxin 1 e 2 (stx)* para identificação de *E. coli* enterohemorrágica, gene *bfpA* para identificação de *E. coli* enteropatogênica e genes para toxinas LT-I (*elt*) e ST-I (*stI*) para identificação de *E. coli* enterotoxigênica. Identificou-se *iss* em 83,3% (25/30) dos isolados, sendo 76,2% (16/21) provenientes de fígados de animais hígidos. Detectou-se *stx* em 13,3% (4/30). Os genes *stx* e

iss foram identificados em três fígados, caracterizando infecção mista. Os genes não foram observados em um isolado de *E. coli* pelo método clássico. Faz-se necessária a utilização de tecnologias para identificação e prevenção de *Escherichia coli* nos aviários e matadouros avícolas.

Palavras-chave: *Escherichia coli*; Caracterização Genética; frangos

ABSTRACT

The isolates of *Escherichia coli* from chicken livers from two slaughterhouses of Bahia were genotypically characterized. 62 poultry livers samples were collected. Thirty samples were macroscopically unchanged and 32 demonstrated alterations that led to disposal of carcass for sanitary inspection. 30 *Escherichia coli* strains from, 21 unchanged and 9 from carcasses that were rejected were isolated by classical method. Polymerase Chain Reaction was performed to verify *E. coli* virulence following genes: serum resistance (*iss*), for identification of Avian Pathogenic *E. coli*; Shiga cytotoxin 1 and 2 (*stx*), for identification of Enterohaemorrhagic *E. coli*; *bfpA*, for identification of Enteropathogenic *E. coli*; LT-I (*elt*) and ST-I (*stI*) toxins for identification of Enterotoxigenic *E. coli*. *Iss* gene was identified in 83.3% (25/30), and 76.2% (16/21) from *E. coli* isolated strains from healthy animals. *stx* gene was identified in 13.3% (4/30) of *E. coli* isolates, and in three of these samples were identified as *stx* and *iss*, featuring a mixed infection. The genes were not identified in one *E. coli* isolated from classic method. Thus, it's necessary use advanced technologies to identify and prevent *Escherichia coli* contamination in poultry farms and slaughterhouses.

Keywords: *Escherichia coli*; Genetic Characterization; poultry

INTRODUÇÃO

A *Escherichia coli* tem comprovado papel como patógeno entérico e também extraintestinal, sendo o agente etiológico de um amplo espectro de infecções invasivas no homem e animais, além de ser um dos integrantes da microbiota intestinal de mamíferos e aves (Ron, 2006). Com base nas características de patogenicidade, no efeito em certas culturas de células e nos grupos sorológicos Kaper (2005) cita nove grupos de *E. coli* virulentos (patotipos): *E. coli*

enteroagregativa (EaggEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* que adere difusamente (DAEC), *E. coli* uropatógena (UPEC), *E. coli* de meningite neonatal (NMEC) e *E. coli* patogênica para aves (APEC). Dos patótipos presentes nas aves destacam-se a APEC e a EHEC (Rodríguez-Siek et al., 2005a; Lee et al., 2009).

A evolução de muitas bactérias ocorre por transferência horizontal de genes de outros organismos para o genoma bacteriano facilitando a sua adaptação em novos ambientes e aumentando a sua capacidade de aquisição de fatores de virulência envolvidos em infecções (Dam e Das, 2006). Essa evolução molecular possibilita o surgimento de cepas patogênicas como ocorre nos patótipos de *Escherichia coli*, havendo uma relação filogenética estreita entre diversas cepas, como a cepa B e K12, não patogênicas, e pela O157:H7, enterohemorrágica e CFT073, uropatógena (Elena et al., 2005).

Um dos mais importantes avanços na área de métodos rápidos em microbiologia foi a tecnologia baseada na reação em cadeia da polimerase, também chamada PCR (*Polimerase Chain Reaction*). A técnica da PCR é um grande avanço no diagnóstico molecular de microrganismos patogênicos, como a *Escherichia coli* (Garcia et al., 2008).

Dentre os genes de virulência encontrados em APEC, o gene "increased serum survival" (*iss*), confere à bactéria resistência aos efeitos bactericidas do soro do hospedeiro, causando bloqueio do complexo terminal do sistema do complemento que atua na membrana celular provocando a lise da célula (Dho-Moulin e Fairbrother, 1999). Esse gene foi descrito pela primeira vez associado com o plasmídeo ColV-I-K94 em um isolado de *E. coli* proveniente de humano (Binns et al., 1979). Esse gene codifica uma lipoproteína da membrana externa da bactéria, denominada colicina. Esta proteína pode ser utilizada para estimular a produção de anticorpos monoclonais específicos para detecção de cepas virulentas de *E. coli* (Foley et al., 2003). Johnson et al. (2008) estudaram a evolução do gene *iss* e detectaram a existência de três alelos nas cepas de *E. coli* (tipos I a III), sendo que o *iss* ocorre em múltiplas regiões do genoma. Houve a relação do referido gene com cepas de *Escherichia coli* oriundas de infecções extraintestinais em humanos, apesar de Kaper et al. (2005) citarem que em humanos a APEC está associada a infecções intra-abdominais.

A *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) tem a capacidade de destruir células epiteliais e produz uma citotoxina potente, toxina Shiga (*Stx*), causando diarreia com ou sem a presença de sangue, síndrome urêmico-hemolítica, sendo fatal para crianças (Kaper, 2005). Existem dois grupos de *Stx*, denominados *Stx1* e *Stx2*. *Stx1* é muito semelhante a principal citoxina produzida pela *Shigella dysenteriae* sorotipo 1, sendo que os membros do *Stx2* possuem algumas diferenças (Jelacic et al., 2003).

A situação do uso indiscriminado de antimicrobianos no tratamento e prevenção de doenças é um problema de saúde animal e pública (Mota et al., 2005). 76% das cepas de *Escherichia coli* de origem aviária foram consideradas resistentes por Zanatta et al. (2004), assim como 77,5% foram consideradas multirresistentes e nenhuma droga foi eficiente para todas as amostras bacterianas avaliadas. Um percentual maior de cepas resistentes de *E. coli* de origem fecal foi verificado por Bogaard et al. (2001) em frangos e perus, bem como maior número de cepas multirresistentes, comparados com galinhas caipiras.

Este trabalho teve como objetivo caracterizar genotipicamente os isolados de *Escherichia coli* oriundos de fígados de frangos provenientes de dois matadouros avícolas da Bahia.

MATERIAL E MÉTODOS

Isolamento e identificação bacteriana pelo método microbiológico clássico

Foram colhidas 62 amostras de fígados de frango provenientes de dois matadouros avícolas do Recôncavo da Bahia, sob fiscalização do Serviço de Inspeção Estadual (SIE), sendo 30 fígados com aspecto macroscópico inalterado e 32 fígados com alteração macroscópica que originou o descarte da carcaça pela inspeção sanitária. As alterações que originaram o descarte da carcaça foram septicemia (36%), seguida por síndrome ascítica (26%), colibacilose (19%), caquexia (13%) e aerossaculite (6%). As amostras foram coletadas assepticamente, acondicionadas em recipientes estéreis, identificadas, refrigeradas e depois enviadas ao Laboratório de Microbiologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), sendo imediatamente executadas as análises segundo Koneman et al. (2008). Resumidamente, inicialmente foi realizada a etapa de enriquecimento em caldo de infusão de cérebro coração (*Brain Heart Infusion* - BHI), seguida

por semeadura por estrias no Agar McConkey e identificação bioquímica. Foram considerados como *E. coli* os cultivos que apresentaram as seguintes características: TSI (Pico ácido/Fundo ácido), sulfeto de hidrogênio negativa, Glicose positiva com presença de gás no tubo de Durham, reação do citocromo oxidase negativa, fenilalanina desaminase negativa, Indol positiva, motilidade positiva, urease negativa, VM positiva, VP negativa e Citrato negativa.

Trinta cepas de *Escherichia coli* foram isoladas e identificadas dos fígados dos frangos pelo método microbiológico clássico, sendo 21 cepas provenientes de fígados inalterados e 9 de fígados oriundos de carcaças que foram rejeitadas com suspeita de septicemia (4/9), colibacilose (3/9), síndrome ascítica (1/9) e caquexia (1/9).

Os isolados foram estocados em caldo BHI com glicerol a 15% e mantidos a -20°C para posterior extração do DNA bacteriano e realização da PCR.

PCR

Extração de DNA

Um mililitro da suspensão da cultura bacteriana em caldo BHI a 24h 37°C foi coletada e centrifugada por 5 minutos a 13.200rpm. O sobrenadante foi descartado e 800µl de água miliQ foi adicionado. Após homogeneização, as amostras foram submetidas a uma nova centrifugação nas mesmas condições mencionadas anteriormente. O sobrenadante foi descartado e 80µl de água miliQ foi adicionada. Após essa etapa, as amostras foram submetidas a temperatura de 96°C por dez minutos. O sobrenadante foi removido e mantido congelado em tubos de polipropileno a -20°C até o momento da análise.

Mix

Os componentes da PCR estão descritos na Tab. 1.

Tabela 1. Componentes da PCR

Componente	Volume	Concentração final
10X PCR buffer	2,5µl	1X
10mM dNTP mix	0,5µl	0,2mM

50mM MgCl ₂	0,75µl	15mM
Taq DNA polimerase (5U/µl)	0,2µl	2U
Água Mili-Q estéril	16,05µl	-
Iniciadores(10µl) (os dois primers)	1µl	0,5µl
DNA-molde	3µl	-
Total	25µl	

Amplificação

As condições da PCR, a sequência dos *primers* e o tamanho do fragmento amplificado de cada gene estudado estão descritos na Tab. 2. As reações de amplificação foram realizadas em termociclador do tipo *Mastercycler* (Eppendorf®). Os componentes da reação foram misturados em câmara asséptica e distribuídos 22µl, em tubos de polipropileno de 0,2ml. Posteriormente, 3µl do lisado de cada amostra foram adicionados. Os produtos de amplificação foram separados mediante eletroforese em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídio (1µg/ml) utilizando o equipamento Eletroforesis power supply EV 243™-Consort. Um volume de 10µl do produto amplificado foi misturado a 2µl de tampão da amostra e colocado no gel. O tempo de corrida foi de 1 hora, a 100 Volts e 40mA. Em seguida os produtos foram observados ao transluminador ultravioleta (BDH®). O padrão de tamanho molecular foi de 100pb DNA *ladder*. Foi realizado o controle negativo de todos os genes pesquisados.

Tabela 2. Sequência dos *primers*, tamanho dos fragmentos amplificados e condições usadas na PCR para detecção de genes associados à virulência

Gene/ sorotipo	Sequencia do primer 5'-3'	Tamanho do fragmento (pb)	Condições da PCR
<i>iss</i> /APEC	GTG GCG AAA ACT AGT AAA ACA GC CGC CTC GGG GTG GAG AA	760	5 min 94°C/30 ciclos de 1 min 94°C, 1 min 61°C e 2 min 72°C/10 min 72°C
<i>stx</i> /EHEC	TTT ACG ATA GAC TTC TCG AC	227	5 min 94°C/35 ciclos

	CAC ATA TAA ATT ATT TCG CTC		de 1 min 94°C, 3 min 48°C e 4 min 72°C/10 min 72°C
<i>bfpA</i> /EPEC	AAT GGT GCT TGC GCT TGC TGC GCC GCT TTA TCC AAC CTG GTA	330	5 min 94°C/29 ciclos de 30 seg 94°C, 1 min 56°C e 2 min 72°C/10 min 72°C
<i>elt</i> /ETEC	GGC GAC AGA TTA TAC CGT GC CCG AAT TCT GTT ATA TAT GTC	696	5 min 94°C/30 ciclos de 1 min 94°C(desnaturação), 1 min 56°C (anelamento) e 1 min 72°C (extensão) /10 min 72°C
<i>stI</i> /ETEC	TTA ATA GCA CCC GGT ACA AGC AGG CTT GAC TCT TCA AAA GAG AAA ATT AC	147	5 min 94°C/30 ciclos de 1 min 94°C, 1 min 55°C e 1 min 72°C/10 min 72°C

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O gene *iss* foi identificado em 83,3% (25/30) das amostras (Fig. 1). Os resultados são semelhantes aos encontrados por Rocha et al. (2008), que detectaram *iss* em 73,8% (45/61) dos isolados, assim como 81,5% encontrado por Rodriguez-Siek et al. (2005a), 82,7% diagnosticado por Ewers et al. (2004) e 77% reportado por Pfaff-McDonough et al. (2000). Barnes et al. (2008) ressaltaram que a APEC representa um sério problema para a avicultura, devido aos grandes prejuízos econômicos causados no mundo inteiro por quadros como: pneumonia, peritonite, coliseptemia, celulite, pleuropneumonia, peri-hepatite, pericardite, salpingite, panolfalmia, osteomielite/sinovite, onfalite, coligranuloma, síndrome de cabeça inchada e doença crônica respiratória.

76,2% (16/21) dos genes de *iss* identificados foram provenientes de amostras de *E. coli* isoladas de fígados oriundos de animais hígidos. Kawano et al. (2006) encontraram dados similares, detectando *iss* em 63,3% das amostras de *E. coli* originárias de aves aparentemente saudáveis no Japão. Um percentual menor foi observado por McPeake et al. (2005), 17,8%, apesar de terem identificado *iss* em 72,8% das amostras de *E. coli* isoladas de aves com septicemia. Gonçalves (2005) analisou 120 frangos aparentemente sadios por meio de amostras de suabes oriundas de traquéia e sacos aéreos e houve a presença de *E. coli* em 118 frangos, porém a detecção do gene *iss* ocorreu em 10,2% das amostras (12/118). Concordando com Rodriguez-Siek et al. (2005b) que detectaram o gene *iss* em 18,3% nas aves aparentemente saudáveis e 82,7% nas aves com colibacilose. Neste estudo os autores relataram que o gene *iss* esteve mais associado a infecções sistêmicas, incluindo o isolamento em amostras de fígado, coração, baço ou sangue (86,5%). Os autores encontraram maior prevalência desse gene em frangos (84,9%), seguido de perus (76,2%), estando relacionado com o sorogrupo O78 (95,5%), O2 (86%) e O1 (66,7%). A identificação do gene *iss*, o qual está relacionado à APEC, em animais aparentemente sadios, indica que os animais aparentemente sadios e infectados com a *Escherichia coli* patogênica para aves não são isolados/descartados nos aviários e, ao atingir a idade de abate, são encaminhados ao matadouro avícola para o consumo humano. Salienta-se que, segundo Kaper (2005), a APEC é uma zoonose, estando associada a infecções intra-abdominais em humanos.

O gene *stx* foi identificado em 13,3% (4/30) dos isolados de *E. coli* (Fig. 2). Salienta-se que houve a associação entre *stx* e *iss* em três amostras, caracterizando uma infecção mista. Resultados semelhantes foram encontrados por Lee et al. (2009) que analisaram 39 isolados de *E. coli* provenientes de carne bovina, suína e de frango por meio de PCR multiplex e 7,3% das amostras de carne de frango foram identificadas como EHEC. Jelacic et al. (2003) analisaram 82 amostras de EHEC oriundas de humanos e 100% continham os genes do grupo *stx2* e 84% do *stx1*, demonstrando que o sorotipo EHEC é mais prevalente em humanos do que em frangos.

Não houve a identificação dos genes *bfpA*, *elt* e *stI* nas cepas analisadas, não havendo a caracterização genética de EPEC e ETEC. Corroborando com a prevalência baixa do gene *bfpA*, Krause, et al. (2005) examinaram a presença da intimina em diversos animais, por meio

do gene *bfpA*, e o mesmo estava presente em 2,3% das amostras de frangos. Um percentual maior foi encontrado em humanos por Blanco et al. (2006), que estudaram amostras de EPEC isoladas de crianças com diarreia e 40,5% possuíam os genes *eae* e *bfpA*. Wang (2008) constataram genes para enterotoxina termolábil (lt) de ETEC em 2,5% dos isolados de *E. coli* provenientes de frangos. Ahmadi et al. (2009) não detectaram ETEC por meio de genes para identificação de enterotoxina termoestável (st) nas 25 amostras de frangos analisadas. Nagy e Fekete (2005) ressaltaram que a ETEC é o tipo mais comum de colibacilose em animais jovens, porém ocorre principalmente em suínos e bovinos, sendo responsável pela diarreia dos viajantes e crianças em países em desenvolvimento.

Os genes utilizados nesse estudo não foram identificados em apenas uma amostra de *E. coli* isolada pelo método microbiológico clássico. Salienta-se que o isolado pode pertencer a outro sorotipo, ser um dos sorotipos e não possuir os genes pesquisados ou ter sofrido mutação.

Por conseguinte, faz-se necessário a utilização de novas tecnologias para identificação e prevenção da *Escherichia coli* patogênica nos aviários e matadouros avícolas, especialmente APEC, considerando a eficácia questionável dos antimicrobianos, administrados em doses subterapêuticas ou terapêuticas, e os prejuízos do seu uso indiscriminado, como também as limitações do diagnóstico preciso por meio das características macroscópicas observadas nas linhas de inspeção do frango na indústria.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior e a Universidade Federal do Recôncavo da Bahia pelo fomento de bolsa. Ao Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e ao Laboratório de Biologia Molecular do Serviço de Oncologia Pediátrica do Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira pela disponibilidade das instalações. À Agência de Defesa Agropecuária da Bahia e matadouros avícolas pelo uso das instalações e doação dos fígados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMADI, M.; MARDANI, K.; AIREMLOU, N.; DILMAGANI, M. Detection of LT and ST genes in *Escherichia coli* isolated from dogs, sheep and poultry. *Comp Clin Pathol*, v. 18, p. 407-412, 2009.
- BARNES, H.J.; VAILLANCOURT, J.P.; GROSS, W.B. Colibacillosis. In: SAIF, Y.M. (Ed.) Diseases of poultry. 12 ed. Ames, Iowa: Iowa State University Press, 2008, p. 631-656.
- BINNS, M.M.; DAVIES, D.L.; HARDY, K.G. Cloned fragments of the plasmid CoIV-I-K94 specifying virulence and serum resistance. *Nature*, v. 279, p. 778-781, 1979.
- BLANCO, M.; BLANCO, J.; DAHBI, G.; MORA, A.; ALONSO, M.P.; VARELA, G.; GADEA, M.P.; SCHELOTTO, F.; GONZALEZ, H.; BLANCO, J. Typing of intimin (*eae*) genes from enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) isolated from children with diarrhoea in Montevideo, Uruguay: identification of two novel intimin variants (μ B and ξ R/ β 2B). *Journal of medical microbiology*, v. 55, p. 1165-1174, 2006.
- BOGAARD, A.E.V.D.; LONDON, N.; DRIESSEN, C.; STOBBERINGH, E.E. Antibiotic resistance of faecal *Escherichia coli* in poultry, poultry farmers e poultry slaughters. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, n. 47, p. 763-771, 2001.
- DAM, T.; DAS, P. Plasmids - potential tool for the investigation of gene transfer in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Medical Microbiology*, v. 55, n. 4, p. 479-480, 2006.
- DHO-MOULIN, M.; FAIRBROTHER, J.M. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Veterinary Research*, v.30, p. 299-316, 1999.
- ELENA, S.F.; WHITTAM, T.S.; WINKWORTH, C.L.; RILEY, M.A.; LENSKI, R.E. Genomic divergence of *Escherichia coli* strains: evidence for horizontal transfer and variation in mutation rates. *International microbiology*, v. 8, p. 271-278, 2005.
- EWERS, C.; JANBEN, T.; KIEBLING, S.; PHILIPP, H.; WIELER, L.H. Molecular epidemiology of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from colisepticemia in poultry. *Veterinary microbiology*, v. 104, p. 91-101, 2004.
- FOLEY, S.L.; HORNE, S.M.; GIDDINGS, C.W.; GUSTAD, T.R.; HANDEGARD, E.D.; ROBINSON, M.; NOLAN, L.K. Monoclonal antibodies to avian *Escherichia coli* Iss. *Avian Diseases*, v. 47, p. 79-86, 2003.
- GARCIA, P.M.; ARCURI, E.F.; BRITO, M.A.V.P.; LANGE, C.C.; BRITO, J.R.F.; CERQUEIRA, M.M.O.P. Detecção de *Escherichia coli* O157:H7 inoculada experimentalmente em amostras de leite cru por método convencional e PCR *multiplex*. *Arq. Bra. Méd. Vet. Zootec.*, v. 60, n. 5, p. 1241-1249, 2008.

GONÇALVES, P.M.R. *Escherichia coli* com detecção do gene *iss* por PCR, *Micoplasmas* e *Salmonelas* na qualidade sanitária de frangos de corte ao abate. 2005. 84f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária, área de concentração Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal) – Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro.

JELACIC, J.K.; DAMROW, T.; CHEN, G.S.; JELACIC, S.; BIELASZEWSKA, M.; CIOL, M.; CARVALHO, H.M.; MELTON-CELSA, A.R.; O'BRIEN, A.D.; TARR, P.I. Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in Montana: Bacterial genotypes and clinical profiles. *The journal of infectious diseases*, v. 188, p. 719-729, 2003.

JOHNSON, T.J.; SKYBERG, J.; NOLAN, L.K. Multiple antimicrobial resistance region of a putative virulence plasmid from *Escherichia coli* isolate incriminated in avian colibacillosis. *Avian Diseases*, v. 48, p. 351-360, 2004.

JOHNSON, T.J.; WANNEMUEHLER, Y.M.; NOLAN, L.K. Evolution of the *iss* gene in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 74, n. 8, p. 2360-2369, 2008.

KAPER, J.B. Pathogenic *Escherichia coli*. *International Journal of Medical Microbiology*, v. 295, p. 355-356, 2005.

KAWANO, M.; YAGUCHI, K.; OSAWA, R. Genotypic analyses of *Escherichia coli* isolated from chickens with colibacillosis and apparently healthy chickens in Japan. *Microbiol. Immunol.*, v. 50, n. 12, p. 961-966, 2006.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN, W.C. *Diagnóstico microbiológico-texto e atlas colorido*. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 1760p.

KRAUSE, G.; ZIMMERMANN, S.; BEUTIN, L. Investigation of domestic animals and pets as a reservoir for intimin- (*eae*) gene positive *Escherichia coli* types. **Veterinary microbiology**, v. 106, p. 87-95, 2005.

LEE, G.Y.; JANG, H.I.; HWANG, I.G.; RHEE, M.S. Prevalence and classification of pathogenic *Escherichia coli* isolated from fresh beef, poultry, and pork in Korea. *International Journal of Food Microbiology*, v. 134, p. 196-200, 2009.

- MCPEAKE, S.J.W.; SMITH, J.A.; BALL, H.J. Characterisation of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) associated with colisepticaemia compared to faecal isolates from healthy birds. *Veterinary Microbiology*, v. 110, p. 245-253, 2005.
- MOTA, R.A.; SILVA, K.P.C.; FREITAS, M.F.L.; PORTO, W.J.N.; SILVA, L.B.G. Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a multirresistência bacteriana. *Braz. J. Vet Res. Anim. Sci.*, v. 42, n. 6, p. 465-470, 2005.
- NAGY, B.; FEKETE, P.Z. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in veterinary medicine. *International Journal of Medical Medicine*, v. 295, p. 443-454, 2005.
- PFAFF-MCDONOUGH, S.J.; HOME, S.M.; GIDDINGS, C.W.; EBERT, J.O.; DOETKOTT, C.; SMITH, M.H.; NOLAN, L.K. Complement resistance-related traits among *Escherichia coli* isolates from apparently health birds and birds with colibacillosis. *Avian Diseases*, v. 44, p. 23-33, 2000.
- ROCHA, A.C.G.P.; ROCHA, S.L.S.; LIMA-ROSA, C.A.V.; SOUZA, G.F.; MORAES, H.L.S.; SALLE, F.O.; MORAES, L.B.; SALLE, C.T.P. Genes associated with patogenicity of avian *Escherichia coli* (APEC) isolated from respiratory cases of poultry. *Pesq. Vet. Bras*, v. 28, n. 3, p. 183-186, 2008.
- RODRIGUEZ-SIEK, K.E.; GIDDINGS, C.W.; DOETKOTT, C.; JOHNSON, T.J.; FAKHR, M.K.; NOLAN, L.K. Comparison of *Escherichia coli* isolates implicated in human urinary tract infection and avian colibacillosis. *Microbiology*, v. 151, p. 2097-2110, 2005a.
- RODRIGUEZ-SIEK, K.E.; GIDDINGS, C.W.; DOETKOTT, C.; JOHNSON, T.J.; NOLAN, L.K. Characterizing the APEC pathotype. *Vet. Res*, v. 36, p. 241-256, 2005b.
- RON, E.Z. Host appecificity of septicemic *Escherichia coli*: human and avian pathogens. *Current Opinion in Microbiology*, v. 9, n. 1, p. 28-32, 2006.
- WANG, S.J. Rapid and specific detection of Enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Salmonella* strains by Multiplex PCR Systems. *Journal of food and drug analysis*, v. 16, n. 2, p. 81-87, 2008.
- ZANATTA, G.F.; KANASHIRO, A.M.I.; CASTRO, A.G.M.; CARDOSO, A.L.S.P.; TESSARI, E.N.C.; PULICI, S.C.P. Suscetibilidade de amostras de *Escherichia coli* de origem aviária a antimicrobianos. *Arq. Inst. Biol.*, v. 71, n. 3, p. 283-286, 2004.



Figura 1. Fotografia do gel de agarose a 2% da PCR para gene *iss* das amostras de *E. coli* isoladas de fígados de frangos. Tamanho do fragmento 760pb, PM Peso Molecular 100pb, amostras positivas 1-13.



Figura 2. Fotografia do gel de agarose a 2% da PCR para gene *stx* das amostras de *E. coli* isoladas de fígados de frangos. Tamanho do fragmento 227pb, CN controle negativo, PM Peso Molecular 100pb, CP controle positivo, amostras positivas 1, 3 e 6.

NORMAS DA REVISTA ARQUIVO DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Tipos de artigos aceitos para publicação

Artigo Científico. É o relato completo de um trabalho experimental. Baseia-se na premissa de que os resultados são posteriores ao planejamento da pesquisa. Seções do texto: Introdução, Material e Métodos, Resultados e Discussão e Conclusões. O número total de páginas não deve exceder a 15.

Relato de Caso. Contempla principalmente as áreas médicas, em que o resultado é anterior ao interesse de sua divulgação ou a ocorrência dos resultados não é planejada. Seções do texto: Introdução, Casuística, Discussão e Conclusões (quando pertinentes). O número total de páginas não deve exceder a 10.

Comunicação. É o relato sucinto de resultados parciais de um trabalho experimental, dignos de publicação, embora insuficientes ou inconsistentes para constituírem um artigo científico. Levantamentos de dados (ocorrência, diagnósticos, etc.) também se enquadram aqui. Deve ser compacto, com no máximo seis páginas impressas, sem distinção das seções do texto especificadas para "Artigo Científico", embora seguindo aquela ordem. Quando a comunicação for redigida em português deve conter um "Abstract" e quando redigida em inglês deve conter um "Resumo".

Política editorial

Publicar trabalhos científicos originais (artigos, relatos de casos e comunicações) que sejam de interesse para o desenvolvimento da ciência animal. Serão recomendados para publicação somente os trabalhos aprovados pelos editores, baseados na recomendação de dois revisores científicos da área pertinente e/ou do corpo editorial.

Preparação dos manuscritos para publicação

Os trabalhos devem ser redigidos em português ou inglês, na forma impessoal. Para ortografia em inglês recomenda-se o *Webster's Third New International Dictionary*. Para ortografia em português adota-se o *Vocabulário Ortográfico da Língua Portuguesa*, da Academia Brasileira de Letras. Os trabalhos submetidos em inglês deverão conter resumo em português e vice-versa.

Os trabalhos e ilustrações deverão ser apresentados em Microsoft Word, folha no formato A4, fonte Times New Roman tamanho 12, espaço entre linhas 1,5, margens de 3cm, com páginas e linhas numeradas (numeração contínua).

Seções de um trabalho

Título. Em português e em inglês. Deve ser o resumo do resumo e não ultrapassar 100 dígitos.

Autores. Os nomes dos autores virão abaixo do título, com identificação da instituição a que pertencem. Deve estar indicado o autor para correspondência com endereço completo, telefone, fax e e-mail.

Resumo e Abstract devem conter no máximo 200 palavras em um só parágrafo. Não repetir o título. Cada frase é uma informação. Atenção especial às conclusões.

Palavras-chave e Keywords. No máximo cinco.

Introdução. Explicação concisa, na qual são estabelecidos brevemente o problema, sua

pertinência, relevância e os objetivos do trabalho.

Material e Métodos. Citar o desenho experimental, o material envolvido, a descrição dos métodos usados ou referenciar corretamente os métodos já publicados. Não usar subtítulos.

Nos trabalhos que envolvam animais ou organismos geneticamente modificados deverá constar o número do protocolo de aprovação do Comitê de Bioética e/ou de Biossegurança.

Resultados. Apresentar clara e objetivamente os principais resultados encontrados.

Discussão. Discutir somente os resultados obtidos no trabalho.

Obs.: As seções Resultados e Discussão poderão ser apresentadas em conjunto.

Conclusões. As conclusões devem estar apoiadas nos dados da pesquisa executada.

Ilustrações. São tabelas e figuras. Toda ilustração que já tenha sido publicada deve conter, abaixo da legenda, dados sobre a fonte (autor, data) e a correspondente referência deve figurar na lista bibliográfica final.

Tabela. Conjunto de dados alfanuméricos ordenados em linhas e colunas. Usar linhas horizontais na separação do cabeçalho e no final da tabela. A legenda recebe inicialmente a palavra Tabela, seguida pelo número de ordem em algarismo arábico e é referida no texto como Tab., mesmo quando se referir a várias tabelas.

Figura. Qualquer ilustração constituída ou que apresente linhas e pontos: desenho, fotografia, gráfico, fluxograma, esquema etc. As legendas recebem inicialmente a palavra Figura, seguida do número de ordem em algarismo arábico e é referida no texto como Fig., mesmo se referir a mais de uma figura. As figuras devem ser enviadas em arquivo separado, extensão.jpg.

Agradecimentos. Devem ser concisamente expressados.

Referências bibliográficas. As referências devem relacionadas em ordem alfabética.

Citações bibliográficas

Citações no texto deverão ser feitas de acordo com ABNT/NBR 10520 de 2002. A indicação da fonte entre parênteses sucede à citação para evitar interrupção na sequência do texto, conforme exemplos:

autoria única: (Silva, 1971) ou Silva (1971); (Anuário..., 1987/88) ou Anuário...

(1987/88)

dois autores: (Lopes e Moreno, 1974) ou Lopes e Moreno (1974)

mais de dois autores: (Ferguson et al., 1979) ou Ferguson et al. (1979)

mais de um trabalho citado: Dunne (1967); Silva (1971); Ferguson et al. (1979) ou (Dunne, 1967; Silva, 1971; Ferguson et al., 1979), sempre em ordem cronológica ascendente e alfabética de autores para trabalhos do mesmo ano.

Citação de citação. Todo esforço deve ser empreendido para se consultar o documento original. Em situações excepcionais pode-se reproduzir a informação já citada por outros autores. No texto, citar o sobrenome do autor do documento não consultado com o ano de publicação, seguido da expressão citado por e o sobrenome do autor e ano do documento consultado. Na listagem de referência, deve-se incluir apenas a fonte consultada.

Comunicação pessoal. Não fazem parte da lista de referências. Na citação coloca-se o sobrenome do autor, a data da comunicação, nome da Instituição à qual o autor é vinculado.

Referências bibliográficas

São adotadas as normas ABNT/NBR-6023 de 2002, simplificadas conforme exemplos:

Periódicos

ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL. v.48, p.351, 1987-88.

FERGUSON, J.A.; REEVES, W.C.; HARDY, J.L. Studies on immunity to alphaviruses in foals. *Am. J. Vet. Res.*, v.40, p.5-10, 1979.

HOLENWEGER, J.A.; TAGLE, R.; WASERMAN, A. et al. Anestesia general del canino. *Not. Med. Vet.*, n.1, p.13-20, 1984.

Publicação avulsa

DUNNE, H.W. (Ed). *Enfermedades del cerdo*. México: UTEHA, 1967. 981p.

LOPES, C.A.M.; MORENO, G. Aspectos bacteriológicos de ostras, mariscos e mexilhões. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 14., 1974, São Paulo. *Anais...* São Paulo: [s.n.] 1974. p.97. (Resumo).

MORRIL, C.C. Infecciones por clostridios. In: DUNNE, H.W. (Ed). *Enfermedades del cerdo*. México: UTEHA, 1967. p.400-415.

NUTRIENT requirements of swine. 6.ed. Washington: *National Academy of Sciences*, 1968. 69p.

SOUZA, C. F. A. *Produtividade, qualidade e rendimentos de carcaça e de carne em bovinos de corte*. 1999. 44f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

Documentos eletrônicos

QUALITY food from animals for a global market. Washington: Association of American Veterinary Medical College, 1995. Disponível em: <<http://www.org/critical6.htm>>. Acessado em: 27 abr. 2000.

JONHNSON, T. Indigenous people are now more combative, organized. *Miami Herald*, 1994. Disponível em: <<http://www.summit.fiu.edu/MiamiHerald-Summit-Related-Articles/>>. Acessado em: 5 dez. 1994.

Submissão dos trabalhos

A submissão dos trabalhos é feita exclusivamente on-line, no endereço eletrônico www.abmvz.org.br

Taxas de publicação

Taxa de submissão. O pagamento, no valor de R\$30,00, será feito por meio de boleto bancário (emitido quando da submissão do artigo). O autor deverá informar os dados para emissão da nota fiscal (Nome ou Razão Social, CPF ou CNPJ, Endereço).

Taxa de publicação. A taxa de publicação de R\$55,00, por página impressa, será cobrada do autor indicado para correspondência, por ocasião da prova final do artigo. Se houver necessidade de impressão em cores, as despesas correrão por conta dos autores.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Corroborando com os autores é evidente a importância da indústria avícola para o mundo e em especial para o Brasil, no que tange a oferta de alimentos de qualidade e a preços acessíveis para uma grande parcela da população, assim como a significativa entrada de divisas e empregos obtidos com a exportação e comércio interno da carne de aves.

Ficou evidente que o controle da sanidade avícola deve ser intensificado em todas as etapas do processo produtivo, especialmente nos criatórios, antes das aves chegarem às plantas industriais de abate, pois nessa etapa os agentes microbianos, podem ou não ser detectados. No processamento das aves, cada vez mais intenso e veloz, existe a preocupação não somente com o descarte desnecessário de carcaças, mas, sobretudo, com a liberação de carcaças contaminadas com patógenos, haja vista a ausência de lesões que justifiquem a rejeição total ou parcial das mesmas.

Salienta-se ainda a eficácia questionável dos antimicrobianos, administrados em doses subterapêuticas ou terapêuticas, e os prejuízos do seu uso indiscriminado, especialmente no que se refere à *Escherichia coli* patogênica. Nesse caso são necessários estudos para identificar as fontes de contaminação e os fatores predisponentes à infecção, além do conhecimento dos fatores de virulência das cepas patogênicas prevalentes.

Faz-se necessário a ampliação dos parâmetros para que os fiscais agropecuários condenem ou não as aves para o consumo, incluindo não somente a utilização das características macroscópicas dos fígados de frangos, como também a necropsia, análises microbiológicas e sorológicas de uma amostra de aves rejeitadas e outras aparentemente sadias, permitindo o diagnóstico mais preciso e a identificação de agentes patogênicos e prevenção na granja e matadouro, para que o avanço mercadológico internacional obtido pela agroindústria avícola do país não se perca por falhas no processo de inspeção sanitária. Por conseguinte, as medidas de controle adotadas na indústria avícola servirão para garantir o melhor que o médico veterinário poderá oferecer: a produção do alimento seguro.