

RICARDO MENDES DA SILVA

***Escherichia coli* EM AVIÁRIOS, CELULITES E FÍGADOS DE
FRANGO E SUAS CONSEQUÊNCIAS PARA A AVICULTURA**

RECIFE

2015

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL**

RICARDO MENDES DA SILVA

***Escherichia coli* EM AVIÁRIOS, CELULITES E FÍGADOS DE
FRANGO E SUAS CONSEQUÊNCIAS PARA A AVICULTURA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Biociência Animal.

Orientador:

Prof. Dr. Joaquim Evêncio Neto

Co-orientadores:

Profa. Dra. Isabella de Matos Mendes da Silva
e Prof. Dr. Marcílio Delan Baliza Fernandes

RECIFE

2015

RICARDO MENDES DA SILVA

***Escherichia coli* PATOGÊNICA EM AVIÁRIOS, CELULITES E
FÍGADOS DE FRANGO E CONSEQUÊNCIAS PARA A AVICULTURA**

Tese de Doutorado elaborada por
RICARDO MENDES DA SILVA

Aprovada em 10 / 07 / 2015

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Joaquim Evêncio Neto – Presidente
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal / UFRPE

Profa. Dra. Isabella de Matos Mendes da Silva
Centro de Ciências da Saúde / UFRB

Profa. Dra. Sônia Maria Oliveira Cavalcanti Marinho
Centro de Ciências da Saúde / UFRB

Profa. Dra. Juliana Pinto de Medeiros
Departamento de Histologia e Embriologia / UFPE

Dra. Mariana Gomes do Rego
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal / UFRPE

À toda minha família, genética e espiritual, que sustenta a minha vida ontem, hoje e sempre, e aos animais, objeto deste estudo, que sacrificaram suas vidas para o nosso sustento.

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;

- Aos professores Dra. Isabella de Matos Mendes da Silva e Dr. Marcílio Delan Baliza Fernandes, pela co-orientação e, especialmente pela ajuda e dedicação;

- À secretária do Programa de Biociência Animal da UFRPE e amiga, Edna Cherias, pela disponibilidade e ajuda constantes;

- Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), pelos ensinamentos na área;

- Aos colegas do Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da UFRPE pelo companherismo;

- À Profa. Dra. Sibebe Oliveira Tozetto Klein pelos ensinamentos na área de histopatologia;

- Ao Prof. Dr. Carlos Eduarado Crispin de Oliveira Ramos, Prof. Dr. Fábio Santos Oliveira e Prof. MsC Everson Cristiano de Abreu Meireles pelo companherismo e ensinamentos na área de estatística;

- Ao Prof. MsC Maykson Costa de Jesus e à mestranda Vaneza Leal Cardoso e pela ajuda na realização das análises microbiológicas e moleculares;

- À Profa. Dra. Juliana Targino pelos ensinamentos na área de histopatologia;

- À nutricionista Verônica Belote de Moraes pelo auxílio nas análises histopatológicas;

- À MsC Flaviane Santos de Souza pelo auxílio na quantificação do DNA das cepas isoladas;

- Ao Médico Veterinário Daniel Ribeiro Cruz pelo auxílio nas coletas de amostras no matadouro e aviários;

- Profa. Dra. Elizabeth Amélia Alves Duarte pela ajuda e ensinamentos sobre genética e PCR;

- Ao matadouro avícola e toda sua equipe;

- Aos criadores de frango que permitiram a coleta de amostras nos aviários;

- À Nancy Silva Santos pelo auxílio nas análises anátomo-histopatológicas.

We shall never surrender!!

Sir Winston Churchill

RESUMO

Objetivou-se pesquisar *Escherichia coli* (*E. coli*) em aviários, celulites e fígados de frangos e as consequências da presença deste patógeno para a avicultura. No período de agosto de 2013 a janeiro de 2014 foram coletadas 100 amostras de lesões de celulite e 100 fígados oriundos de 100 frangos de uma linha de abate em um matadouro avícola no Recôncavo da Bahia. Foram identificados os nove aviários de origem dos frangos, e entre três e sete dias depois da coleta no matadouro estes foram visitados duas vezes para coleta de amostras de cama, ração e água. Os aviários, números três e sete não permitiram coletas. Foi verificada a população de *E. coli* pelo método de contagem Petrifilm™ (3M Company), (AOAC 998.8) e na água por meio do método cromogênico ReadyCult® (Merck). Genes característicos de *Escherichia coli* patogênica para aves (APEC), *iss* e *iutA*, foram pesquisados nos isolados de *E. coli* utilizando a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). As análises histopatológicas foram realizadas sob microscopia de luz, após corte histológico e coloração de rotina (Hematoxilina Eosina (HE)). Foram feitas análises estatísticas descritivas e nas análises de correlação foram utilizados testes paramétricos e não paramétricos de acordo com os grupos amostrais. A correlação positiva e significativa entre os isolados de *E. coli* das amostras do ambiente dos aviários e das celulites permitiu traçar a rota percorrida pelo patógeno do aviário até o consumidor, reforçando a necessidade de maior atenção no manejo sanitário nos aviários e nas pesquisas sobre o potencial zoonótico da *E. coli* patogênica para aves (APEC). A presença dos fatores de virulência, *iutA* e *iss*, na maioria das vezes que *E. coli* foi isolada simultaneamente em celulites e fígados salienta a possibilidade de que APEC esteja presente nos dois tecidos biológicos, fortalecendo a hipótese de que a bactéria infecta o animal por meio das lesões de pele e posteriormente alcança o fígado, o que configuraria o caráter sistêmico da infecção, demandando assim o descarte total da carcaça quando da presença de lesões de celulite. As alterações macroscópicas do fígado devem continuar sendo utilizadas como critério de descarte total de carcaças, pois reduz o risco de fornecer alimentos inseguros ao consumidor, acrescidas da inclusão das análises microbiológicas e histopatológicas nas rotinas da inspeção sanitária da produção de carne de aves.

Palavras-Chaves: Genes de virulência, inspeção sanitária, heterofilos.

ABSTRACT

This study aimed to research *Escherichia coli* (*E. coli*) in broiler houses, cellulitis lesions and livers and the consequences of the presence of this pathogen for aviculture. From August 2013 to January 2014 100 samples of cellulitis injuries and 100 broiler livers were collected from a slaughter line in a poultry slaughterhouse in the Bahia Recôncavo Region. The number of nine broiler houses identified as being broilers producers and between 3 and 7 days after the slaughterhouse collect the aviary were visited twice to take samples from litter, feed and water. The broiler houses three and seven did not allow collections. It was found the population of *E. coli* by count method Petrifilm™ (3M Company) (AOAC 998.8) and water by the chromogenic method Readycult® (Merck). Genes characteristic of avian pathogenic *Escherichia coli*, *iss* and *iutA*, were investigated in *E. coli* isolates using Polymerase Chain Reaction (PCR). Histopathological analyzes were performed under light microscopy after histological section and routine staining (hematoxylin eosin (HE)). Descriptive analyzes were performed and for the correlation statistics were used parametric and non-parametric tests in accordance with the sample groups. A positive and significant correlation between *E. coli* isolates from environmental samples of broiler houses and cellulitis lesions allows traced the route taken by the pathogen from broiler houses to consumers reinforcing the need for greater attention in sanitary management in broiler houses and in research of the avian pathogenic *E. coli* (APEC) potential zoonotic risk. The presence of virulence factors and *iutA* and *iss*, as often than *E. coli* was isolated simultaneously in cellulitis and livers reinforces the possibility that APEC is present in the two biological tissues providing the hypothesis that the bacteria infect the animal initially from skin lesions and subsequently reaches the liver, which would configure the systemic character of this infection, suggesting that occurs the total disposal of the carcass when cellulitis lesions are found. Macroscopic liver changes should continue to be used as a criterion for complete carcasses disposal because it reduces the risk of delivering unsafe food to the consumer. Added to this is necessary the inclusion of microbiological and histopathological analysis in poultry meat production sanitary inspection routines.

Keywords: Virulence genes, sanitary inspection, heterophilus cells

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Fotografia de lesão de celulite em frango proveniente de um matadouro avícola da Bahia sob inspeção estadual (Acervo pessoal). 36
- Figura 2 – Fotografia de fígado de frango sem alteração macroscópica proveniente de um matadouro avícola sob inspeção estadual (Acervo pessoal). 39
- Figura 3 – Anatomia do fígado de frango (GETTY, 1986). 39
- Figura 4 – Fotografia de fígado de frango proveniente de matadouro avícola da Bahia sob inspeção estadual apresentando áreas pálidas (Acervo pessoal). 44
- Figura 1 – Fotografia de gel de agarose da PCR do gene *iss* em amostras de celulite de frangos, insumos e ambiente de aviários do Recôncavo da Bahia. Fragmento 760pb, PM- Peso Molecular 100pb, CN- Controle negativo, CP- controle positivo, amostras positivas 1 – 12. 67
- Artigo 1
- Figura 2 – Fotografia de gel de agarose da PCR do gene *iutA* em amostras de celulite de frangos, insumos e ambiente de aviários do Recôncavo da Bahia. Fragmento 302pb, PM Peso Molecular 100pb, CN Controle negativo, CP controle positivo, amostras positivas 1 - 12. 67
- Artigo 1
- Figura 1 – Fotomicrografia de fígados de frangos com lesões de celulite de matadouro do Recôncavo da Bahia. Observar em: 1- Degeneração gordurosa macrovesicular (pontas de seta) e microvesicular (setas pequenas), aumento 400x; 2- Área de necrose, aumento 1000x; 3- Hiperplasia de ducto (setas pequenas) - Pericolangite heterofílica; (cabeça de seta) - Hipertrofia dos músculos lisos das artérias (setas longas), aumento 200x; 4-Infiltrado Mononuclear (seta pequena), 400x. Coloração H.E. 97
- Artigo 3

LISTA DE TABELAS

| | | |
|------------------------|---|-----|
| Tabela 1 – Artigo 1 | Características dos <i>primers</i> utilizados para a PCR em insumos e ambiente de aviários e celulite de frangos de um matadouro avícola do Recôncavo da Bahia. | 66 |
| Tabela 2 – Artigo 1 | Frequência de <i>Escherichia coli</i> e genes de virulência em amostras de celulite de frangos em aviários do Recôncavo da Bahia. | 68 |
| Tabela 3 – Artigo 1 | Frequência de <i>Escherichia coli</i> e genes de virulência <i>iss</i> e <i>iutA</i> em insumos e ambiente de aviários da Bahia. | 69 |
| Tabela 4 – Artigo 1 | Correlações da frequência de <i>Escherichia coli</i> e genes de virulência em amostras de celulite de frangos e de cama em aviários do Recôncavo da Bahia. | 70 |
| Tabela 1- Artigo 2 | Características dos <i>primers</i> da PCR em amostras de lesões de celulite e fígados de frangos oriundos de um matadouro avícola do Recôncavo da Bahia. | 83 |
| Tabela 2 – Artigo 2 | Frequência de <i>Escherichia coli</i> e genes de virulência em amostras de lesões de celulite e fígados de frangos oriundos de um matadouro do Recôncavo da Bahia. | 84 |
| Tabela 1 – Artigo 3 | Características macroscópicas de fígados de frangos com lesões de celulite coletados de matadouro avícola no Recôncavo da Bahia. | 96 |
| Tabela 2 – Artigo 3 | Características microscópicas de fígados de frangos com lesões de celulite coletados de matadouro avícola no Recôncavo da Bahia. | 99 |
| Tabela 3 – Artigo 3 | Resultados do teste <i>Kruskal Wallis</i> para comparação das pontuações das características macroscópicas e microscópicas para amostras com e sem isolamento de <i>Escherichia coli</i> . | 102 |
| Tabela 4 – Artigo 3 | Resultados de comparações pelo teste <i>Mann-Whitney U</i> para a variável “Tipo Celular do Infiltrado” comparação feita par a par (Heterófilas x Mononucleares; Heterófilas x Mistas; Mononucleares x Mistas). | 102 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|----------------|--|
| AFEC | <i>Escherichia coli</i> fecal aviária |
| APEC | <i>Escherichia coli</i> patogênica para aves |
| APPCC | Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle |
| ATCC | Coleção de Tipos de Cultura Americana |
| BHI | Infusão de Cérebro Coração |
| BPF | Boas Práticas de Fabricação |
| CCS | Centro de Ciências da Saúde |
| DAEC | <i>Escherichia coli</i> que adere difusamente |
| DNA | Ácido Desoxiribonucleico |
| EaggEC | <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| EIEC | <i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva |
| EHEC | <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica |
| EMB | Eosina Azul de Metileno |
| EPEC | <i>Escherichia coli</i> enteropatogênica |
| ETEC | <i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica |
| EUA | Estados Unidos da América |
| ExPEC | <i>Escherichia coli</i> extraentérica |
| HE | Hematoxilina e Eosina |
| MAPA | Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento |
| MLST | Tipificação Sequencial Multilocus |
| 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 |
| RDC | Resolução da Diretoria Colegiada |
| REDEC | <i>Escherichia coli</i> enteropatogênica para coelhos |
| SANUTRI | Núcleo de Segurança Alimentar e Nutricional |
| SEAGRI | Secretaria de Agricultura, Irrigação e Reforma Agrária |
| SePEC | <i>Escherichia coli</i> causadora de septcemia |

| | |
|-----------|---|
| SIE | Serviço de Inspeção Estadual |
| SIF | Serviço de Inspeção Federal |
| SISBI/POA | Sistema Brasileiro de Inspeção de Produtos de Origem Animal |
| UFC | Unidade Formadora de Colônias |
| UFRB | Universidade Federal do Recôncavo da Bahia |
| UPEC | <i>Escherichia coli</i> uropatogênica |
| TBE | Tris-Borato EDTA |
| TAE | Tris-Acetato EDTA |

SUMÁRIO

| | | |
|----------|--|------------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 13 |
| 2 | OBJETIVOS | 15 |
| 3 | REVISÃO DE LITERATURA | 15 |
| 3.1 | O PROCESSO PRODUTIVO DA CARNE DE FRANGO | 15 |
| 3.1.1 | Avicultura industrial | 15 |
| 3.1.2 | O sistema de inspeção sanitária na produção de carne de aves no Brasil | 18 |
| 3.2 | COLIBACILOSE AVIÁRIA | 23 |
| 3.2.1 | <i>Escherichia coli</i> em aves | 23 |
| 3.2.2 | Genes de virulência de <i>Escherichia coli</i> | 28 |
| 3.2.3 | Etiopatogenia da Colibacilose Aviária | 32 |
| 3.3 | ASPECTOS ANÁTOMO-HISTOFISIOLOGICOS DO TECIDO CUTÂNEO E SUBCUTÂNEO DE FRANGOS | 34 |
| 3.4 | ETIOPATOGENIA DA CELULITE AVIÁRIA | 35 |
| 3.5 | A CELULITE E O MANEJO HIGIÊNICO-SANITÁRIO DOS AVIÁRIOS | 36 |
| 3.6 | ANÁTOMO-HISTOFISIOLOGIA DOS FÍGADOS DE FRANGOS | 38 |
| 3.7 | <i>Escherichia coli</i> EM FÍGADOS DE FRANGOS | 44 |
| 3.8 | POTENCIAL ZONÓTICO da APEC | 45 |
| 4 | REFERÊNCIAS | 47 |
| 5 | ARTIGOS CIENTÍFICOS | 59 |
| 5.1 | PRIMEIRO ARTIGO - PRESENÇA DE GENES DE VIRULÊNCIA <i>iss</i> e <i>iutA</i> EM LESÕES DE CELULITE E INSUMOS E AMBIENTE DOS AVIÁRIOS. | 59 |
| 5.2 | SEGUNDO ARTIGO - CORRELAÇÃO ENTRE A PRESENÇA DE <i>Escherichia coli</i> EM LESÕES DE CELULITE E FÍGADOS DE FRANGO. | 77 |
| 5.3 | TERCEIRO ARTIGO - ACHADOS ANÁTOMO-HISTOPATOLÓGICOS DE FÍGADOS DE FRANGOS COM LESÕES DE CELULITE ASSOCIADOS A <i>ESCHERICHIA COLI</i> | 90 |
| 6 | CONSIDERAÇÕES FINAIS | 108 |

1 INTRODUÇÃO

O consumo de alimentos vem crescendo acentuadamente no decorrer dos anos. A preocupação pela produção acelerada de alimentos, devido à grande demanda proveniente do crescimento populacional mundial, impulsionou os investimentos na área alimentícia. A carne, sendo um alimento indispensável à mesa de toda a família, tornou-se o fruto de investimentos neste setor (BECKER; KIEL, 2011; BARROS et al., 2012)

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).

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 Portaria n. 210 do MAPA, que versa sobre o controle da sanidade em carne de aves no Brasil determina que sejam utilizados parâmetros físicos macroscópicos para permitir ou descartar parcial ou totalmente a carcaça dos animais para o consumo humano (BRASIL, 1998a). 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.

A celulite aviária é um processo infeccioso ocasionado por bactérias que invadem o tecido, por meio das lesões superficiais na pele causadas pelo contato com outras aves ou devido à má qualidade da cama. Salienta-se que estas lesões são comumente causadas pelo subgrupo da *Escherichia coli* patogênica extra-intestinal (ExPEC), especialmente APEC, *Escherichia coli* Patogênica para Aves (HUJA et al., 2015).

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; 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 a carcaça de uma ave em uma linha de abate.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar *Escherichia coli* em aviários, celulites e fígados de frango e suas consequências para a avicultura.

2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar as alterações anatomopatológicas e histopatológicas dos fígados de frangos contaminados com *Escherichia coli*.
- Verificar a ocorrência de *Escherichia coli* em amostras ambientais e insumos de aviários, celulites e fígados de frangos.
- Realizar a caracterização genotípica dos isolados de *Escherichia coli* por meio de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR).
- Identificar a possível fonte de contaminação de *Escherichia coli* patogênica para aves em amostras de ambiente e insumos dos aviários.
- Correlacionar a presença de genes de virulência característicos de *Escherichia coli* patogênica para aves em ambiente e insumos de aviários e lesões de celulite de frangos.
- Correlacionar a presença de genes de virulência característicos de *Escherichia coli* em celulite e fígados de frangos.
- Discutir as consequências da presença da *Escherichia coli* patogênica para aves para a avicultura e saúde pública.
- Sugerir um novo critério para descarte de carcaças com celulite.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 O PROCESSO PRODUTIVO DA CARNE DE FRANGOS.

3.1.1 Avicultura industrial

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; FLÔRES, 2008).

A produção global da carne de aves atingiu 106 milhões de toneladas em 2013. O fator que limita a produção é o custo da matéria prima das rações. Ao contrário da carne bovina e de porco, o crescimento da produção está previsto em ambos os grupos de países, em desenvolvimento e desenvolvidos. Preços competitivos das carnes de aves de em relação a outras carnes é um elemento importante em sua dinâmica (FAO, 2013).

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 de frango de corte de até oito semanas de vida crú contém apenas 108 kcal e 20,32 gramas de proteína e com essa quantidade o consumidor estará satisfazendo 46% de suas necessidades diárias de proteínas (UNIFESP, 2015).

Conforme Robert Feldman, chefe de pesquisa econômica do Morgan Stanley, Tóquio, o consumo mundial de frango cresce mais do que a demanda por carne suína e até a bovina. A principal razão é que a carne de aves é a mais barata, considerando que o preço das rações elevam o preço da carne vermelha (MONTROYA; FINAMORE, 2006).

O Brasil é o terceiro maior produtor de frango do mundo produzindo 12,520 milhões de toneladas em 2014, ficando atrás apenas dos Estados Unidos da América e da China, e o maior exportador de carne de frango do mundo, tendo exportado 3,918 milhões de toneladas, no ano de 2013. Seu consumo no mesmo ano foi em média de 41,8 kg por pessoa (UBAEF, 2014; IBGE, 2015).

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, produzindo 31,12% e exportando 29,35 dos números totais do Brasil em 2013 O consumo *per capita* passou de 2,3kg, em 1971, para 41,8kg em 2013 (UBAEF, 2014).

A grande necessidade de investimentos na produção alimentícia alavancou a avicultura brasileira. A alta qualidade proteica, baixo custo em relação a outros tipos

de carnes, melhoramento genético, melhoramento da alimentação, instalações e processamento, são alguns dos fatores que contribuem para esse crescimento (JACOBSEN; FLÔRES, 2008).

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, com 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). Desta forma 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; 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, biosseguridade 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, 2009).

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 representa 0,69% da produção nacional de carne de frango com aproximadamente 848.700 toneladas de carne de frango produzidas no ano de 2013, sendo o maior produtor da região nordeste (UBABEF, 2014).

Na safra de 2013 a Bahia produziu 6,21 milhões de toneladas de grãos, sendo 2,15 milhões de toneladas de milho e 2,8 milhões de toneladas de soja. Apesar da redução da produção total da safra de grãos em relação ao ano de 2012, em especial na região oeste do estado, o milho teve sua produção e produtividade elevadas e junto com a soja permitiram a sustentabilidade do setor avícola no estado da Bahia. Além disto, o sorgo também representa uma alternativa na produção de ração animal, e no ano de 2012 foram produzidas 30,84 mil toneladas deste grão mas com previsão de quadruplicar a produção para 2014 (SEAGRI, 2015).

3.1.2 O sistema de inspeção sanitária na produção de carne de aves no Brasil

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.

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, 1998a).

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*. O exame *post mortem* é realizado nas linhas de inspeção, que são pontos na seção de matança,

especificamente na calha de evisceração (BRASIL, 1998a; GOMIDE; RAMOS; 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 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, 1998a). Gomide, Ramos, Fontes (2006) ressaltam que cada linha deve respeitar o tempo mínimo de inspeção de dois segundos por ave.

Ressalta-se que 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 (GOMIDE; RAMOS; FONTES, 2006)

Na inspeção *post mortem* é realizado o exame visual macroscópico de carcaças e vísceras e, conforme o caso, palpação e cortes (BRASIL, 1998a). Prata; 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; 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; 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, 1998a). 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 celomática 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 as análises laboratoriais são ferramentas auxiliares 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, 1998a).

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

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%).

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 aerossaculite.

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 freqüentes foram por dermatose, artrite e celulite.

Considerando as bactérias isoladas do ambiente industrial, Gomis et al. (2000) isolaram *Escherichia coli* nas lesões de celulite em mais de 90% das aves, salientando a possibilidade de contaminação cruzada na linha de processamento onde as lesões de celulite estão expostas.

Ressalta-se que as alterações cutâneas macroscópicas em carcaças de frangos de corte não são específicas, não permitindo a classificação adequada das doenças de pele encontradas na linha de processamento nos matadouros. Neste contexto, há possibilidade de erro sistemático de condenação e critérios mais adequados para os serviços de inspeção seriam importantes (FALLAVENA et al., 2000).

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.

Para aumentar a qualidade dos produtos das empresas 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 Boas Práticas de Fabricação (BPF). Os estabelecimentos que optarem pela adesão ao SISBI/POA deverão obrigatoriamente possuir sistema de BPF previamente implantado. A não implantação das BPF no prazo estabelecido implicará no cancelamento do registro de estabelecimentos junto ao SIE (BAHIA, 2008).

Além dos princípios de BPF, deverão ser considerados o Procedimento Padrão de Higiene Operacional (PPHO) e o Programa de 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 da produção (BRASIL, 1997; BRASIL, 1998b;).

Carvalho, Costa e Carvalho (2002) elaboraram um plano APPCC em uma linha de produção de frango inteiro congelado de uma indústria avícola do Rio de Janeiro e concluíram com a determinação de cinco Pontos Críticos de Controle (PCCs) biológicos, nas etapas de pré-resfriamento da moela, do fígado, coração e nas etapas de pré-resfriamento das carcaças no primeiro e segundo estágio. Observou-se que, na análise dos perigos biológicos, *Escherichia coli* patogênica foi mencionada em todas as etapas do processo (FRANÇA, 2007).

Dey et al. (2003) estabeleceram um sistema de inspeção baseado em espectroscopia, como parte do APPCC baseado em um modelo de inspeção, e indicaram que fígados normais e septicêmicos foram corretamente diferenciados em 96% dos 300 fígados analisados.

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).

3.2 COLIBACILOSE AVIÁRIA

3.2.1 *Escherichia coli* em aves

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 (HIRSH; ZEE, 2003; KONEMAN et al., 2008). Alguns gêneros dentro da família são primariamente patógenos de humanos e animais de sangue quente, como *Shigella*, *Salmonella*, *Yersinia*, enquanto outros são membros da microbiota comensal normal do trato gastrointestinal, como *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella* e causam infecções oportunistas (TRABULSI; ALTERTHUM, 2005; EINSENSTEIN; ZALEZNIK, 2009).

As bactérias pertencentes à família Enterobacteriaceae são bacilos gram-negativos não esporogênicos e fermentadores de glicose e outros açúcares. São catalase positivas, oxidase negativas, anaeróbias facultativas, sendo cultivadas em ágar MacConkey, haja vista que não são inibidas pelos sais biliares presentes do meio, além de reduzirem nitrato a nitrito e da maioria ser móvel por flagelos peritríquios. A família contém mais de 28 gêneros e de 80 espécies, incluindo *Escherichia coli*, *Yersinia*, *Proteus*, *Enterobacter* e *Klebsiella*. Esses organismos podem infectar uma enorme variedade de hospedeiros, podendo ser patógenos entéricos e sistêmicos ou oportunistas (QUINN et al., 2005).

Escherichia coli foi descrita pela primeira vez no final do século XIX por Theodor von Escherich, sendo chamada de *Bacterium coli commune*, devido ao fato de ser uma bactéria encontrada no cólon, estando usualmente presente no homem e animais (KONEMAN et al., 2008).

O gênero *Escherichia* contém apenas uma espécie e cerca de mil tipos antigênicos. Constitui-se na espécie bacteriana mais isolada e envolvida em casos de sepse por gram-negativos e choque induzido por endotoxinas. É um mesófilo

capaz de se multiplicar entre 7 e 42 °C, sendo 37 °C a temperatura ótima, embora existam estirpes que se multiplicam a 4-5 °C, existindo relatos de sobrevivência por mais de nove meses em temperatura de congelamento (-20 °C). Temperaturas entre 60° C e 70 °C por 30 minutos são capazes de inativar a maioria das cepas. São consideradas neutrófilas, multiplicando-se numa faixa entre 4,5 a 9,0 O pH próximo do neutro propicia condições ótimas para sua multiplicação (JAY, 2005; TORTORA; FUNKE; CASE, 2006).

Segundo Quinn et al. (2005) *E. coli* é frequentemente fimbriada e algumas estirpes são hemolíticas. Antígenos somáticos (O), flagelar (H) e, por vezes capsular (K) são usados para sorotipagem de *Escherichia coli*. Ressalta-se que 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.

Os fatores de virulência de linhagens patogênicas de *Escherichia coli* incluem enterotoxinas, sideróforos, toxina shiga-símile (verotoxina), fator citotóxico necrosante e hemolisina (HIRSH; ZEE, 2003). Dentre os principais fatores de virulência associados à *E. coli* 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; KNOBL, 2000).

Escherichia coli se constitui em um patógeno entérico e extraintestinal, causando 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 citam o patotipo *E.*

coli enteropatogênica para coelhos (REDEC). Ainda também é citada por Moulin-Schouleur et al. (2007) a *E. coli* causadora de septcemia (SePEC).

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; 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; GERMANO, 2008). Segundo o Ministério da Saúde (2014) foram registrados 239 surtos atribuídos à carne de aves, processados e miúdos no período de 2000 a 2014.

De acordo com Franco e Landgraf (2008) a carne de aves possui elevada atividade de água, é rico em substâncias nitrogenadas, 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.

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; GROSS, 2008). Cepas de APEC têm sido relacionadas com maior prevalência aos sorogrupos O1, O2 e O78 (MCPEAKE, SMITH; BALL, 2005).

Minharro 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 bactéria *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 congestos. Em alguns casos podem ocorrer pequenas lesões focais brancas no fígado (CALNEK, 1997).

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 rápidas 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 colângio-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 as carcaças analisadas em três fases diferentes do desenvolvimento (11, 21 e 42 dias), revelaram que 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).

Além de atuarem como promotores de crescimento e prevenção de doenças, os antimicrobianos apresentam a vantagem da diminuição do tempo necessário para que se atinja o peso ideal para o abate, diminuição do consumo de ração, aumento da eficiência alimentar, melhoria das qualidades organolépticas e conservação da ração, além da diminuição da mortalidade (ALBUQUERQUE, 2005).

Por outro lado, a situação do uso indiscriminado de antimicrobianos no tratamento e prevenção de doenças é um problema de saúde animal e pública (JOHNSON et al., 2005; 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. 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 gastrointestinal 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; 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; KUANA, 2004). Na indústria avícola devem ser introduzidos os programas de qualidade, como BPF, PPHO e APPCC, além da introdução de um processo de avaliação de riscos (ROQUE-SPECHT; CASTRO; FIOD NETO, 2007; MAIA; DINIZ, 2009;).

Durante a maior parte do século XX, a indústria de alimentos considerou a contaminação por *Escherichia coli* como um problema relacionado a práticas insatisfatórias de higiene, especialmente por contaminação fecal. Nas últimas décadas, foi comprovado que muitos sorotipos da bactéria eram patogênicos para o homem e podiam provocar infecções graves, podendo levar os pacientes a óbito (GERMANO; GERMANO, 2008).

3.2.2 Genes de virulência de *Escherichia coli*

O genoma da *E. coli* possui aproximadamente 4,6 milhões de pares de bases e codificam cerca de 4.000 proteínas, sendo que aproximadamente 90% do Ácido Desoxiribonucleico (DNA) é utilizada como sequência codificadora de proteína. Sendo um ser procarioto, seu DNA é uma molécula circular única dispersa no nucleóide, com ausência por carioteca no citosol, o qual possui cerca de 30.000 ribossomos, responsável pela síntese de proteínas (TORTORA; FUNKE; CASE, 2006; ROCHA et al., 2008;).

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 PCR representa um grande avanço no diagnóstico molecular e caracterização genética de microrganismos patogênicos, como a *Escherichia coli* (GARCIA et al., 2008; ROCHA et al., 2008).

A reação consiste na 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, denominada DNA polimerase, que a partir de um segmento de DNA de fita simples como molde, é capaz de construir a fita complementar a esse segmento, por meio da polimerização de nucleotídeos adicionados ao sistema. O início da cópia se dá a partir de dois oligonucleotídeos iniciadores, chamados *primers*, complementares às extremidades 3' e 5' do fragmento do DNA a ser copiado (DE ROBERTIS; HIB, 2006).

A técnica da PCR foi desenvolvida por Saiki et al. em 1985 e aperfeiçoada por Mullis et al. em 1987. Mullis introduziu o conceito de *primer* e o uso de uma enzima termoestável, a *Taq* polimerase, isolada a partir de uma bactéria oriunda de fontes termais, *Thermus aquaticus*. Esta enzima possui a propriedade de se manter estável em temperaturas altas, facilitando a execução da técnica. Em 1989 foi criado o primeiro termociclador automático e na década de 90 esse equipamento 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).

A realização da PCR necessita de 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. Desta forma, o DNA genômico é inicialmente aquecido e desnaturado para formar filamentos únicos. Na fase de helicoidização, o DNA é resfriado, 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, servindo como molde

para o próximo ciclo de aquecimento e resfriamento. Ciclos repetidos produzem um grande número de fragmentos de DNA unidos em cada ponta pela seqüência do *primer*. Em virtude de cada ciclo de aquecimento-resfriamento requerer apenas alguns minutos, uma única molécula de DNA pode ser amplificada para fazer milhões de cópias em poucas horas (JORDE et al., 2004).

Os produtos da PCR são analisados por meio de eletroforese, a qual possui dois modelos básicos, podendo ser 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).

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.

Cepas de APEC podem desenvolver doenças no hospedeiro por meio de muitos fatores de virulência, incluindo adesinas, sistema de captação de ferro, capsula, resistência ao soro, toxinas, evasinas e invasinas (JANBEN et al., 2001). Os genes que codificam os fatores de virulência podem estar localizados em plasmídeos ou nas ilhas de patogenicidade (SMITH; FRATAMICO; GUNTHER, 2007).

Os genes mais frequentemente encontrados em isolados patogênicos e não detectados em isolados fecais de frangos sadios são *tsh*, *iutA*, *iss*, *cvaC* e *papC*, os quais foram encontrados em diferentes associações. (LA RAGIONE, WOODWARD, 2002; RODRIGUEZ-SIEK et al., 2005a, 2005b). 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%).

O gene *iss*, que expressa uma proteína de parede celular bacteriana, tem sido localizado em vários plasmídios de grandes dimensões que são capazes de carrear simultaneamente fatores de virulência e de resistência a antimicrobianos (JOHNSON et al., 2002) e pesquisas o correlacionam fortemente com a habilidade de isolados de APEC em causar patologias em frangos. (RODRIGUEZ-SIEK et al., 2005a)

Ressalta-se que o gene *iss* normalmente é amplificado em estirpes de APEC isoladas de celulite aviária. Sua presença nas lesões confere um possível risco de patogenicidade para os seres humanos, desde que o frango contaminado seja consumido (BARROS et al., 2013),

Diversos trabalhos relatam a presença do gene *iss* como um dos mais prevalentes em aves doentes (EWERS et al., 2004; RODRIGUEZ-SEIK et al., 2005a; DISSANAYAKE; OCTAVIA; LAN, 2014; MOHAMED; SHEHATA; RAFEEK, 2014).

Segundo Johnson et al. (2002), além de conferir resistência sérica ao sistema imune do hospedeiro, esse gene também é capaz de carrear fatores de resistência a substâncias antimicrobianas, Nolan et al. (2002) revelam que apesar da possibilidade da existência da doença animais apresentando estirpes com a ausência desse gene, a sua presença em *E. coli* oriunda de aves com colibacilose pode ser considerada um marcador de patogenicidade para APEC.

Ao estudarem a genômica da *E.coli* de colisepticemia aviária e a filogenia da APEC, Rojas et al. (2014) e Huja et al. (2015) utilizaram o gene *iss* como um dos marcadores de patogenicidade para identificação desse patotipo.

Ao analisarem a amplificação de *iss* em frangos com sintomatologia respiratória sugestiva de colibacilose, Rocha et al. (2008) detectaram o gene em 73,8% dos isolados de *E. coli*. Ewers et al. (2009) isolaram *E. coli* de aves doentes e encontraram a presença do gene *iss* em 88,2% das amostras. Os autores afirmaram que atualmente a resistência sérica é considerada um atributo determinante da virulência da cepa.

Mohamed, Shehata e Rafeek (2014) compararam a presença do gene *iss* em aves doentes e aparentemente saudáveis e encontraram uma positividade em aves doentes de 72,2% e 0% em aves saudáveis.

Escherichia coli também expressa alta afinidade por sistema de captação de ferro que são compostos sideróforos da aerobactina (genes *iuc*) e seus receptores de membrana externa (gene *iutA*). (CHOUIKHA, et al., 2008)

O ferro é um elemento essencial para a sobrevivência de *Escherichia coli*. Facilita inúmeras atividades celulares, como a redução do peróxido, de transporte de elétrons, e biossíntese de nucleotídeos. Como existe ferro em baixas concentrações em locais extra-intestinais da infecção, as cepas ExPEC desenvolveram múltiplas estratégias de seqüestro de ferro a partir do hospedeiro (BRAUN, 2001; HEINEMANN; JAHN; JAHN, 2008).

Segundo Huja et al. (2015), nas células eucarióticas os íons ferro são carregados por proteínas especiais, como transferrinas e ferritinas, que os liberam quando é necessário e também mantém a concentração de íons de ferro livre (Fe^{3+}) em $10^{-24}M$. Desta forma, uma bactéria septicêmica tem que competir contra estas proteínas, daí a necessidade de haver mecanismos específicos para a aquisição de ferro em seus hospedeiros e de fato cepas de *Escherichia coli* O78-9, assim como outras estirpes septicêmicas, codificam outros tipos de sistemas sideróforos. Estes sistemas incluem aerobactinas (LAFONT et al., 1987), yersiniabactina e IronN (SCHUBERT et al., 2002).

Dho e Lafont (1984) observaram uma correlação positiva entre a baixa concentração de ferro e a capacidade de crescimento das estirpes de APEC e de sua letalidade para os frangos de um dia. Silveira et al. (2002) demonstraram que as cepas patogênicas de APEC expressam sistemas de aquisição de ferro enquanto que cepas não patogênicas não apresentam este mecanismo genético.

Os receptores da aerobactina, proteínas de membrana externa sintetizadas pelo gene *iutA*, fazem parte do sistema de captação e transporte de ferro mais utilizado pela *E. coli*. Trata-se de um sideróforo que se liga ao íon ferro quando excretado ao meio, formando um complexo estável, através do qual o ferro é transportado ao citoplasma via componentes específicos das membranas externa e interna (NEILANDS; BINDEREIF; MOTEGOMEREI, 1985)

Muitos autores encontram a associação de estirpes virulentas de *Escherichia coli* com a presença de aerobactina e por conta disto ela vem sendo utilizada como importante marcador de virulência, uma vez que os genes do plasmídeo ColV no qual o gene *iutA* está codificado, também pode carrear outros fatores de virulência (GOES; GAZIRI; VIDOTTO, 1993)

Por conseguinte, é fundamental o conhecimento dos fatores determinantes do surgimento de doenças no homem e animais, visando intervenções efetivas. Dessa forma, a definição dos genes de virulência, e possíveis combinações, são imprescindíveis para a eficácia do diagnóstico e melhoria da saúde da população (CAPRIOLI et al., 2005).

3.2.3 Etiopatogenia da Colibacilose Aviária

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, como aflatoxinas, na ração.

A erradicação de certas doenças aviárias intimamente associadas a infecções secundárias por *Escherichia 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 fatores ambientais adversos estão presentes, como a presença de gases irritantes, principalmente a amônia, umidade da cama, poeira, variações climáticas e alta densidade de ocupação (BARNES; NOLAN, VAILLANCOUT, 2008).

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, panofalmitis, osteomielite/sinovite, onfalite, coligranuloma, síndrome de cabeça inchada e doença crônica respiratória (BARNES; NOLAN; VAILLANCOUT, 2008).

Contudo, segundo Barnes, Nolan e Vaillancout (2008), o aparecimento de lesões ou implicações não pode inferir uma infecção por *E. coli*, visto que outras bactérias oportunistas podem se comportar de forma semelhante a bactéria *Escherichia coli*.

3.3 ASPECTOS ANÁTOMO-HISTOFISIOLOGICOS DO TECIDO CUTÂNEO E SUBCUTÂNEO DE FRANGOS

Assim como em todas as espécies domésticas, a pele reveste todo o corpo dos frangos. Em comparação com outros vertebrados, a pele das aves é fina e flexível e com uma estrutura mais delicada, normalmente possuindo de quatro a sete células de espessura (BERCHIERI JUNIOR; MARCARI, 2000; MARCARI; FURLAN; GONZALES, 2002). A pele das aves se rompe facilmente e é mal suprida de vasos e nervos. Em frangos de corte possui pH da superfície da pele de $7,52 \pm 0,45$ (DICE; SACK; WENSING, 2004; OLKOWSKI et al., 2005).

A pele é constituída por epiderme, derme e o tecido de sustentação (conjuntivo). A epiderme é composta de camada germinativa, células de queratinócitos aviários, e a camada corneificada, células com depósitos de queratina para dar resistência mecânica à pele (BENEZ, 2004).

A região que separa a epiderme da derme é plana em muitas regiões da pele, podendo haver reentrâncias em algumas áreas. É composta de uma camada superficial e outra profunda, sendo a camada profunda composta por camada superior densa e frouxa baixa. Na camada superficial fibras de colágeno estão dispostas frouxamente em volta de numerosos capilares e na camada profunda as fibras de colágeno estão dispostas e justapostas paralelas a superfície da pele (PASS, 1996).

A derme das aves é constituída por tecido adiposo, grandes vasos sanguíneos, vasos linfáticos, nervos, os quais estão associados aos folículos das penas, musculatura e a base dos folículos das penas (BENEZ, 2004).

Uma camada de fibras elásticas separa a derme do tecido subcutâneo, o qual é formado por feixes de colágeno e gordura (PASS, 1996).

A ave não possui glândulas na pele, além da glândula uropígea, que se localiza na base da cauda. Os queratinócitos aviários, denominados seboqueratinócitos, são os únicos que produzem secreções lipídicas responsáveis por proteger a pele e auxiliar na impermeabilização, evitando o ressecamento, tendo ação antimicrobiana (BENEZ, 2004).

Salienta-se que apesar da pele de ser um sistema de defesa com muitas características únicas, representando a primeira linha de defesa contra a invasão microbiana (OLKOWSKI et al., 2005), a fina espessura da pele dos frangos podem

acarretar lesões cutâneas por vários fatores, incluindo deficiência nutricional, substâncias irritantes, toxinas, infecções e manejo inadequado (MARCARI; FURLAN; GONZALES, 2002).

3.4 ETIOPATOGENIA DA CELULITE AVIÁRIA

A celulite aviária é termo utilizado para a inflamação aguda do tecido subcutâneo, geralmente localizada na região ventral do abdome e da coxa, com tendência a ser unilateral (MESSIER et al., 1993; ELFADIL; VAILANCOURT; MEEK, 1996; ODERKIRK, 1997; ALLAN, 2010).

Caracteriza-se pela presença de exsudato purulento, espessamento da derme e formação de placas fibrino-caseosas subcutâneas (Figura 1). Os planos teciduais são separados e o tecido muscular adjacente pode estar envolvido na lesão (MESSIER et al., 1993; NORTON; BILGILI; McMURTREY, 1997; JEFREY; CHIN; SINGER, 1999).

Observa-se que as aves apresentando lesões de celulite parecem grandes, saudáveis e com crescimento normal, mas exibem placas caseosas sob a pele, vistas somente na etapa de processamento, após a depenagem. Desta forma, a celulite é difícil de ser identificada antes do abate. Apesar de não haver sinais clínicos associados a celulite em aves vivas, a presença da patologia resulta na condenação de parte ou a totalidade da carcaça durante a inspeção *post mortem* (BRASIL, 1998a; GOMIS et al., 2000).

Por outro lado, aves com outras comorbidades, como pericardite, aerossaculite, osteomielite, poliserosite, artrite, ou hepatite, apresentam baixa conversão alimentar (GOMIS et al., 1997). As condenações por celulite ocorrem em maior número em lotes com patologias, como ascite, aerossaculite, peritonite e pericardite (KUMOR et al., 1998).

Observa-se que a celulite representa uma porta de entrada de microrganismos, favorecendo a contaminação de vários órgãos como fígado, coração, sacos aéreos e ossos (VIEIRA et al., 2006).

As lesões sofridas pelas aves durante o crescimento permitem a penetração dos microrganismos. Uma vez instalados, os invasores são fagocitados pelo sistema

imunológico do animal, porém não são completamente eliminados, haja vista que o organismo das aves não possui um arsenal bioquímico adequado, induzindo, deste modo, o processo infeccioso e posterior formação da celulite (BRITO et al., 2002).

Santana et al. (2008), ao observar as causas de condenação de carcaças de aves em matadouros localizados no Estado de Goiás, constataram que o principal motivo das condenações das carcaças de frango foi a presença de celulite associada à contaminação por *E. coli*.

Andrade et al. (2006) pesquisaram *E. coli* como agente causal da celulite aviária em frangos de corte inspecionados em um matadouro de São Paulo e encontraram 76,6% de amostras contaminadas por *Escherichia coli*.

Assim como Vieira et al. (2006) encontraram 100% de contaminação por *Escherichia coli* em amostras de celulite de frango oriundas de um matadouro do Rio de Janeiro. Ressalta-se que Andreatti Filho (2006) isolaram *Escherichia coli* em 100% de aves inoculadas com amostras de *E. coli* isoladas de celulite, as quais desenvolveram placas fibrinocaseosas, confirmando a bactéria *Escherichia coli* como um agente etiológico com alta prevalência em lesões de celulite.



Figura 1 - Fotografia de lesão de celulite (seta) na região ventral direita em frango proveniente de um matadouro avícola da Bahia sob inspeção estadual (Acervo pessoal).

3.5 A CELULITE E O MANEJO HIGIÊNICO-SANITÁRIO DOS AVIÁRIOS

A celulite é uma patologia de causa multifatorial, estando ligada a fatores ambientais, densidade populacional, ocorrência de traumas, competição por restrição alimentar e seleção genética (ELFADIL et al.,1996).

Xavier et al. (2010) relataram que a piora na qualidade da cama, principalmente pela compactação decorrente de aumento de umidade, determina o aparecimento de lesões na pele, pododermatites, calo de peito e hematomas. Embora várias bactérias possam estar envolvidas nesse processo, *Escherichia coli* é a mais predominante. Linhagem, alimentação, taxa de lotação, distância entre comedouros e bebedouros, tipo de cama, restrição de alimento e programas de iluminação podem afetar a incidência e a gravidade do problema. A utilização de minerais quelatados, em especial o zinco, associado a uma suplementação adequada de vitamina E, tem dado bons resultados no controle da celulite em frangos de corte. Os autores verificaram que o número de condenações de carcaça se elevou com a sequência de reuso da cama.

Schrader, Singer e Atwill (2004) ressaltam que a maioria das lesões de celulite iniciou durante a fase de crescimento. Os autores obtiveram uma relação positiva entre temperatura ambiental e celulite. De acordo com Ryder, Feddes e Zuidhof (2004), a utilização do sistema de vaporização resulta em melhora da qualidade da carcaça para redução de temperatura ambiente nos galpões, o que resultou na redução de 33% da mortalidade e 40% da condenação de carcaças.

Na ausência de aves, Singer et al. (2000) verificaram que uma cama reutilizada tem contagens bacterianas abaixo do limite de detecção de 2×10^3 UFC/g em matéria seca. Desta forma, sugere-se que um número muito baixo de bactérias persiste em estado de latência na cama reutilizada, começando a se multiplicar quando o próximo lote é introduzido. Outras fontes de microrganismos incluem a sujeira do piso dos aviários e a poeira. Neste estudo as bactérias se demonstraram persistentes por longos períodos na poeira dos aviários.

Em seus estudos Schrader, Singer e Atwill (2004) identificaram dois fatores que afetam a prevalência da celulite, os quais podem ser controlados por meio de manejo adequado, que são a quantidade de aves por utilização da cama e o tempo de vazio sanitário. De acordo com o modelo por eles proposto, a limitação do número de aves criadas na mesma cama e o aumento do tempo do vazio sanitário diminui a incidência de celulite.

Conforme Rocha et al. (2002) a compactação da cama de frango causa lesões na região do peito do animal e a umidade favorece a multiplicação bacteriana e contaminação dos frangos, levando a celulite. Segundo Johnson et al. (2001), a maior incidência de celulite ocorre em machos devido à agressividade que ocasiona o surgimento de arranhões.

Em um estudo realizado com amostras de cama de frango de corte, realizado em aviários de Goiás, ocorreu o isolamento de *Escherichia coli* em 92,3% das 13 amostras (CORRÊA, 2013).

Desta forma, a integridade na pele dos frangos pode ser alcançada a partir de ajustes no manejo dos lotes. É provável que a qualidade da pele se deteriore nos sistemas de produção e processamento desenhados e operados para se obter o máximo de produto ao mínimo custo (BILGILLI; HESS, 2009).

3.6 ANATOMO-HISTOFISIOLOGIA DOS FÍGADOS DE FRANGOS

O fígado se constitui no maior órgão globuloso da cavidade celomática das aves. Apresenta coloração castanha escura e consistência firme quando a ave é adulta (Figura 2) e coloração amarelada em aves jovens, até duas semanas após a eclosão, oriunda dos pigmentos da gema que continuam a ser absorvidos do intestino antes que o saco vitelino finalmente regrida (SAVIANE, 2009).

O tamanho do fígado em relação à massa corpórea varia conforme o animal e no caso da galinha é de 1:37 (GURTLER, 1987). Divide-se em dois lóbulos, o lado direito possui um maior volume e o esquerdo possui uma divisão secundária, os quais são ligados cranialmente por uma ponte dorsal ao coração, localizados logo abaixo do osso esterno (Figura 3). 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; WENSING, 2004).



Figura 2 - Fotografia de fígado de frango apresentando coloração e forma normais e sem alterações macroscópicas, proveniente de um matadouro avícola sob inspeção estadual (Acervo pessoal).

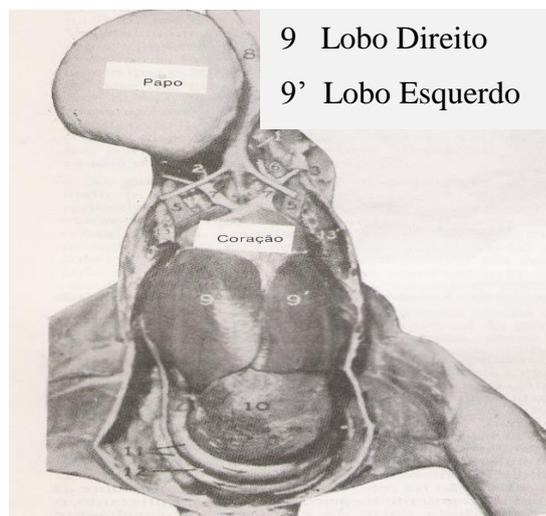


Figura 3 – Localização e anatomia do fígado de frango (GETTY, 1986).

O lobo direito é maior, apresentando a vesícula biliar em sua superfície visceral, sendo atravessado pela veia cava caudal. O lobo esquerdo é dividido em parte lateral e medial por meio de uma profunda incisão, *incisura lobaris*. A superfície parietal é convexa e se localiza contra as costelas esternais e o esterno; ficando exposta quando os músculos peitorais e o esterno são removidos, no exame *post-mortem*. A superfície visceral é côncava, estando 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, transpõem a extremidade distal do duodeno, perto dos ductos pancreáticos; somente o ducto oriundo do lobo direito é ligado à vesícula

biliar. Os lóbulos hepáticos são indistintos, exceto próximo ao hilo, pela inexistência de tecido conjuntivo perilobular (DICE; SACK; WENSING, 2004; BELS, 2006).

Os vasos sanguíneos aferentes do fígado penetram no órgão por meio 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 e a artéria direita se origina 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 por meio 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, que são as fibras simpáticas, provenientes do nervo esplênico, que se relacionam através do gânglio celíaco, e as fibras parassimpáticas provenientes do nervo vago (GÜRTLER, 1987).

O componente estrutural básico do fígado é a célula hepática ou hepatócito. Os hepatócitos são células poligonais que estão próximas umas das outras. A superfície de cada hepatócito entra em contato com a parede do capilar sinusóide por meio do espaço perissinusoidal, denominado espaço de Disse, e com a superfície de outros hepatócitos. Existem junções comunicantes do tipo *gap* que são freqüentes e formam placas anastomosantes de células e exercem função de comunicação intercelular. Considerando que os hepatócitos sintetizam ativamente proteínas, esses possuem ribossomos livres em abundância, 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; HIATT, 2012; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Santos (1986) e Junqueira e Carneiro (2013), 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.

A capacidade funcional do fígado é extremamente importante nos animais domésticos com alta exigência de produtividade (GÜRTLER, 1987). No embrião e feto, o fígado produz células sanguíneas (BOLELI; MAIORKA; MACARI, 2002) e no indivíduo adulto, trata-se de um órgão com funções metabólicas essenciais, incluindo filtração e armazenagem de sangue; metabolismo dos carboidratos, das proteínas, das gorduras, dos hormônios, produtos químicos estranhos e carotenóides; formação de bile; armazenamento de vitaminas e ferro e formação de fatores de coagulação (BENEZ, 2004; GUYTON; HALL, 2006).

Além disso, 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 no metabolismo dos carboidratos. A reabsorção intestinal dos monossacarídeos é auxiliada pelo fígado, haja vista que esse órgão produz enzimas necessárias para a utilização da glicose, frutose e galactose (BENEZ, 2004).

O fígado é 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; 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; HALL, 2006).

Ressalta-se que após a retirada do fígado, as aves morrem após aproximadamente 24-36 horas e a letalidade decorre da diminuição acentuada da glicemia e do aparecimento de substâncias tóxicas no sangue, as quais são normalmente metabolizadas no fígado (GÜRTLER, 1987).

O fígado é também o órgão essencial do metabolismo nitrogenado. Além de promover a biossíntese de suas proteínas, o fígado produz outras proteínas, como albumina do soro, protrombina, fibrinogênio e α e β -lipoproteínas (BACILA, 2003). Existem contribuições hepáticas importante no metabolismo protéico, incluindo a desaminação dos aminoácidos, formação de uréia, formação de proteínas plasmáticas e interconversões de aminoácidos (GUYTON; HALL, 2006).

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, o que representa aproximadamente 90% das proteínas plasmáticas. As células hepáticas produzem também várias glicoproteínas e nas células de Kupffer ocorre a síntese de fatores de coagulação (GÜRTLER, 1987; GUYTON; HALL, 2006).

Embora a maioria das células corporais metabolize gordura, a oxidação dos ácidos graxos, síntese de grande quantidade de colesterol e síntese de gorduras a partir das proteínas e carboidratos ocorre no fígado. O metabolismo dos lipídios é realizado no hepatócito e a síntese de triglicerídeos e produção de ácidos graxos ocorre no citosol (BACILA, 2003; GUYTON; HALL, 2006).

A beta-oxidação das gorduras pode ocorrer em todas as células do corpo, porém o fígado não pode consumir todo o acetil-CoA. Desta forma, este é convertido em ácido acetoacético, que passa para o líquido extracelular, sendo 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; HALL, 2006).

Diversos hormônios secretados pelas glândulas endócrinas são quimicamente alterados ou excretados pelo fígado, como a tiroxina e os hormônios esteróides, cabendo ao fígado regular a influência das glândulas endócrinas sobre as células do organismo (GÜRTLER, 1987; GUYTON; HALL, 2006;).

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 forma depósitos que podem suprir 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 também contêm grandes quantidades de apoferritina, proteína capaz de se combinar reversivelmente com o ferro formando a ferritina. Assim, quando o ferro está em baixos níveis, a ferritina libera o ferro (GUYTON; HALL, 2006). Além do ferro, segundo Gürtler (1987), o fígado é responsável pelo depósito de outros elementos, como 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 ocorre 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 da bile nas galinhas é de 5,88 e ainda nessa espécie ocorre a concentração da bile na vesícula biliar (GÜRTLER, 1987; BACILA, 2003).

O sistema macrofágico hepático cumpre uma função de filtração do sangue, haja vista que o sangue recolhe muitos microrganismos dos intestinos. Uma amostra de sangue oriunda das veias portais antes de sua entrada no fígado quase sempre terá uma alta população microbiana. As células de Kupffer depuram o sangue à medida que ele passa pelos sinusóides. Quando uma bactéria entra em contato com a célula de Kupffer, em menos de 0,01 segundo ela penetra no seu interior até ser destruída. Estima-se que menos de 1% das bactérias que entram no sangue portal a partir dos intestinos consegue passar para a circulação sistêmica. Desta forma, as células de Kupffer podem fagocitar patógenos e evitar que estes cheguem à circulação sistêmica, além de que os hepatócitos podem metabolizar e inativar toxinas absorvidas pela circulação portal (MACLACHLAN; CULLEN, 1998; GUYTON; 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, sendo que a infecção hepática e a consequente inflamação no órgão podem ser primárias ou sistêmicas.

3.7 *Escherichia coli* EM FÍGADOS DE FRANGOS

Considerando o menor preço em comparação com a carne bovina e uma boa qualidade proteica, o frango e suas vísceras comestíveis, incluindo o fígado, estão cada vez mais presentes à mesa da população (ESPOSITO et al., 2009).

O fígado de frango é passível de sofrer contaminações por microrganismos, devido a sua constituição química, condições de obtenção e manipulação. Inúmeras alterações, como distúrbios circulatórios, toxicoses, doenças infecciosas e neoplásicas podem estar relacionadas ao fígado (Figura 5). Salienta-se que muitas lesões hepáticas não são específicas quanto à etiologia, porém fornecem informações importantes sobre a ocorrência de doenças sistêmicas e a bactéria *Escherichia coli* está intimamente associada a infecções sistêmicas e comprometimento hepático (HOERR, 1996; BARCELOS et al., 2006).

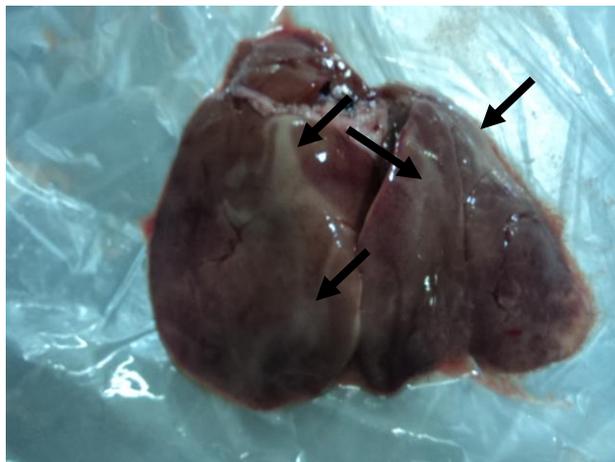


Figura 4 - Fotografia de fígado de frango proveniente de matadouro avícola da Bahia sob inspeção estadual apresentando áreas pálidas-(setas) sugestivo de hepatopatia. (Acervo pessoal).

A Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) 12, de 2 de janeiro de 2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária determina o limite máximo permitido de coliformes termotolerantes de 10^5 UFC por grama para que o fígado de frango seja considerado apto para o consumo humano (BRASIL, 2001). Segundo Franco e

Landgraf (2008) *Escherichia coli* representa o principal membro do grupo dos coliformes termotolerantes, sendo um importante indicador da presença de enteropatógenos.

Em pesquisa desenvolvida por Vieira et al. (2014), envolvendo fígados de frangos de um matadouro, *Escherichia coli* esteve presente em 50,98% das amostras. Resultados semelhantes foram encontrados por Silva et al. (2012), que analisaram a contaminação por *Escherichia coli* em fígados provenientes de dois matadouros do Recôncavo da Bahia e encontraram a bactéria em 28 dos 62 fígados analisados.

Barcelos et al. (2006) em um estudo realizado com 100 fígados de frango, sendo 90 condenados por apresentarem alterações e 10 liberados por ausência de alteração, isolaram *Escherichia coli* em 24 das 90 amostras condenadas e 2 das 10 amostras liberadas.

Guastalli et al. (2010) em trabalho realizado com fígados oriundos de aves de postura com um dia de idade, detectaram *Escherichia coli* em 15 dos 32 lotes analisados e concluíram que aves portadoras de *Escherichia coli* patogênica podem ser veículos de contaminação ambiental, disseminando o microrganismo e comprometendo a saúde de outras aves no mesmo plantel.

3.8 POTENCIAL ZOONÓTICO DA APEC

Estudos de fatores de virulência apontam uma grande semelhança genética entre algumas cepas do patotipo APEC e os demais patotipos do grupo das ExPEC, que reúne ainda cepas de *Escherichia coli* uropatogênicas (UPEC) e de meningite neonatal (NMEC) (SMITH; FRATAMICO; GUNTHER, 2007).

O número de infecções causadas por ExPEC associadas a elevadas taxas de mortalidade vem se elevando drasticamente em todo o mundo, gerando preocupação para a saúde pública (PITOUT, 2012). Além de causarem patologias em humanos, as ExPEC são responsáveis por significantes prejuízos na produção animal, particularmente na indústria avícola.

Pesquisas de Moulin-Schouleur et al. (2007) compararam APEC com estirpes de *Escherichia coli* isoladas a partir de diferentes amostras clínicas, incluindo as cepas associadas a outras síndromes de patologias humanas, tais como UPEC, NMEC, SePEC. Rodriguez-Siek et al. (2005) verificaram que linhagens

de APEC e outras ExPEC compartilham as mesmas origens filogenéticas, conforme determinado pela tipificação sequencial multilocus (MLST).

Segundo Ewers et al. (2007) foram estabelecidas hipóteses de que as aves de produção podem ser veículos para estirpes da bactéria *Escherichia coli*, capazes de causar doenças de origem alimentar nos seres humanos e nas aves, fazendo deste procaríoto um reservatório de genes de virulência e resistência. Isso ocorreu devido à percepção da sobreposição de características entre APEC e UPEC utilizando como critérios de avaliação os sorogrupos, genótipos de virulência e agrupamentos filogenéticos (RODRIGUEZ-SIEK, 2005b)

Segundo Gao et al. (2012) APEC é a principal causa da colibacilose aviária caracterizada pelas infecções localizadas ou sistêmicas, como as sepses agudas e fatais ou pericardites subagudas e aerosaculites. APEC e UPEC possuem fatores de virulência similares para invadir e colonizar o hospedeiro incluindo adesinas, toxinas membranas de polisacarídeos, protectinas invasinas e sistemas de aquisição de ferro.

Embora as infecções por ExPEC já tenham sido facilmente combatidas com antimicrobianos, as condutas tradicionais estão sendo desafiadas pelo surgimento de cepas resistentes aos fármacos conhecidos. O desenvolvimento de estratégias alternativas para prevenir e eliminar as infecções causadas por ExPEC exige a compreensão acerca da virulência, e o risco zoonótico, assim como a necessidade de vigilância epidemiológica constante, considerando as tendências de evolução da resistência dessas bactérias aos antimicrobianos (MELLATA, 2013)

Para Manges e Johnson (2012) a sobreposição das bases filogenéticas (representadas por estirpes similares) com *clusters* de genes de virulência detectados em ExPEC aviárias e humanas, em diferentes regiões do mundo, pode refletir desafios semelhantes que este patógeno tem de superar para colonizar ambos os hospedeiros e que a evolução de estirpes de algumas ExPEC são recentes. Segundo Dissanayake, Octavia e Lan (2014) esta possibilidade é reforçada pelo fato de que muitas novas cepas são derivadas de mutações individuais das estirpes previamente conhecidas.

Um estudo de Schouler et al. (2004) envolvendo a subtração genômica na APEC sorogrupo O2, visando a identificação de novos genes de virulência, revelou alta homologia entre seis das nove seqüências genômicas identificadas com os genes descritos nas estirpes humanas, associado a meningite e infecção do trato

urinário. Estas observações sugerem uma relação clonal entre a APEC e as ExPEC humanas.

A maioria das pesquisas publicadas demonstram as similaridades entre APEC e as ExPEC humanas foram produzidas na Europa e nos Estados Unidos da América entretanto a presença de cepas ST359 no Brasil, com marcadores genéticos de moderada similaridade entre as cepas (APEC e ExPEC humanas) indicam que estas estirpes podem ser caracterizadas como de potencial risco zoonótico (MALUTA et al., 2014)

Em dados obtidos com suas pesquisas e apoiados por literatura sobre as APEC, Knobl et al. (2012) sugerem que os genes *hly* e *cnf* podem atuar como um marcadores de virulência de *Escherichia coli* associada a mamíferos, e a sua presença em aves deve ser monitorizada como um indicador de transposição de barreira entre espécies.

Desta forma, as ExPEC representam uma das principais causas de infecções em seres humanos e em aves de produção. A antibioticoterapia em uso na indústria avícola e a elevação no consumo de produtos de aves poderiam ter causado o surgimento, disseminação e persistência da resistência aos antimicrobianos, o que configura em um grave problema de saúde para animais e seres humanos. Devido à variabilidade e capacidade de adaptação das ExPEC, a vigilância constante de sua epidemiologia em seres humanos e aves é necessária assim como controles rigorosos de todos os contaminantes envolvidos nos processos produtivos das aves (MELLATA, 2013)

4 REFERÊNCIAS

ABEF. Associação Brasileira de Produtores e Exportadores de Frangos. 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.

ANDRADE, C. L.; FERREIRA, G.B.; FRANCO, R.M.; NASCIMENTO, E.R.; TORTELLY, R. Alterações patológicas e identificação da *Escherichia coli* como agente causal da celulite aviária em frangos de corte inspecionados em um matadouro de São Paulo. **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias**, v. 13, n. 3, p. 139-143, set-dez. 2006.

ALLAN, B. Identification and characterization of the causative agent of a new type of cellulites in turkeys. In: WESTERN MEETING OF POULTRY CLINICIANS AND PATHOLOGISTS, 21., 2010, Alberta, Canadá. **Anais Eletrônicos...** Alberta, 2010. Disponível em: <<http://www.westvet.com/cellulitis.html>> Acesso em: 30 abr. 2015.

ALBUQUERQUE, R. Antimicrobianos como promotores de crescimento. In: PALERMO NETO, J.; SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L. Farmacologia aplicada à avicultura. São Paulo: Roca, v. 1, c. 9, p. 149-159. 2005.

ANDREATTI FILHO, R.L. **Saúde Aviária e Doenças**. São Paulo: Roca, 2006.

ANSARI-LARI, M.; REZAGHOLI, M. 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. **Diário Oficial do Estado**. Salvador, BA, 5 ago. 2008. Disponível em: <http://www.adab.ba.gov.br/wp-content/uploads/2012/12/portaria_2900_08.pdf>. Acesso em: 05 jun. 2015.

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.; NOLAN, L.K.; VAILLANCOUT, J. Colibacillosis. In: BARNES, H. J. et al. **Disease of Poultry**. Ames: Blackwell Publishing, p. 691-737, 2008.

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

BARROS, L.S.S.; SILVA, R.M.; SILVA, I.M.M.; BALIZA, M.; FREITAS, F. A Avicultura brasileira e sua afinidade com a celulite aviária. **Arquivos de Pesquisa Animal**, v.1, n.2, p.78-97, 2012.

BECKER, A.K.; KIEL, G. Análise microbiológica de carne bovina in natura comercializada em supermercados de Cascavel-PR. **Revista Thêma et Scientia**, Cascavel, v. 1, n. 2, jan.-dez., 2011.

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.

BERCHIERI JUNIOR, A.; MARCARI, M. **Doença das Aves**. Campinas: FACTA, 2000.

BILGILLI, S.F.; HESS, J.B., Problemas de la piel e la canal del pollo: Calsas y soluciones. In: SIMPOSIO CIENTÍFICO DE AVICULTURA, 56, 2009, Zaragoza. **Anais...** Zaragoza, 2009.

- 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**, v. 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, p. 75-95, 2002.
- 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*, **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, n.6, p.1477-1485, 2004.
- BRASIL. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria n. 326, de 30 de Julho de 1997. **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. 2014.
- BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução-RDC n.12, de 2 de janeiro de 2001. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2001.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto n. 30.691, de 29 de março de 1952. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 7 jul. 1952. Disponível em: < http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/1950-1969/D30691.htm>. Acesso em: 27 mai. 2015.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria n. 210, de 10 de novembro de 1998. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 26 nov. 1998. Disponível em: < <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=1129>>. Acesso em: 28 mai. 2015a.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria n. 46, de 10 de fevereiro de 1998. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 10 fev. 1998. Disponível em: < http://www.fooddesign.com.br/6_legislacao.php?id=3>. Acesso em: 27 mai. 2015b.
- BRAUN, V. Iron uptake mechanisms and their regulation in pathogenic bacteria. **International Journal of Medicine and Microbiology**. v. 291, n. 2, p. 67–79. 2001.
- BRITO, B.G; TAMEHIRO, C.Y.; OKANO, W.; LUZARDO, M.M.; BERBEL, M.M.; GUIMARÃES, I.G. Celulite cervical em frangos de corte causada por *Escherichia coli*. **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 23, n. 1, p. 81-84, jan/jun 2002.
- CALNEK, B.W. (Coord.). **Diseases of Poultry**. 10. ed. Ames Iowa: Iowa State University Press, 1997. 929p.
- CAPRIOLI, A.; MORABITO, S.; BRUGERE, H.; OSWALD, E. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. **Veterinarian Research**, 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.

CHOUIKHA, I.; BREE, A.; MOULIN-SCHOULEUR, M.; GILOT, P.; GERMON, P. Differential survey of aerobic bacteria and fungi in the feces of healthy psittacine birds. **Avian Disease**. v. 32, p.46-52. 2008.

CORRÊA, F.A.F. Pesquisa de bactérias com determinação do perfil de sensibilidade em vísceras comestíveis de frango de corte, penas e camas de aviários. 48f. 2013. **Dissertação** (Mestrado em Ciência Animal) -. Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

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.

DISSANAYAKE, D.R.A.; OCTAVIA, S.; LAN, R. Population structure and virulence content of avian pathogenic *Escherichia coli* isolated from outbreaks in Sri Lanka. **Veterinary Microbiology**. Amsterdam. v. 168, p.403-412, 2014.

DHO, M.e LAFONT, J.P. Adhesive properties and iron uptake abilities in *E. coli* lethal and non-lethal for chicks. **Avian Diseases**, v. 28l, p. 1016-1025. 1984.

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.

ELFADIL, A.A.; VAILANCOURT, J.P.; MEEK, A.H. Farm management risk factors associated with cellulitis in broiler chickens in southern Ontario. **Avian Diseases**. v. 40, p. 699-706, 1996.

ESPOSITO, A.B.M.; LIMA, C.C.; SOUZA, F.N.; RIBAS, F.; KOROLHUK, J.; LUZ, K.C.; MUNARO, V.; RIBAS, A.R.; BALBI, M.E. Avaliação de miúdos de *Gallus domesticus* como fonte proteica. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v.10, n.2, Jul.-Dez., 2009.

EWERS, C.; ANTÃO, E.A.; DIEHL, I.; PHILIPP, H.C.; WIELER, L.H. Intestine and environment of the chicken as reservoirs for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains with zoonotic potential. **Applied and Environmental Microbiology**. Washington, v.75, n.1, p. 184-192, jan., 2009.

EWERS, C.; JANSSEN, T.; KIESSLING, S.; PHILIPP, H.C.; WIELER, L.H. Molecular epidemiology of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from colisepticemia in poultry. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.104, p.91-102, 2004.

EWERS, C.; LI, G.; WILKING, H.; KIESSLING, S.; ALT, K.; ANTÃO, E.M.; LATURNUS, C.; DIEHL, I.; GLODDE, S.; HOMEIER, T.; BOHNKE, U.; STEINRUCK,

H.; PHILIPP, H.C.; WIELER, L.H. Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: How closely related are they? **International Journal of Medical Microbiology**, v. 297, p. 163–176. 2007.

FALLAVENA, L.C.B. MORAES, H.L.S., SALLE, C.T.P. , DA SILVA, A. B. , VARGAS, R.S. , NASCIMENTO, V.P.. Diagnosis of skin lesions in condemned or downgraded broiler carcasses — a microscopic and macroscopic study. **Avian Pathology**, v. 29, n. 6, p. 557 — 562, 2000.

FAO. Food and Agriculture Organization. **Food Outlook – Biannual Report on Global Food Markets**, 2013. Disponível em:

<<http://www.fao.org/docrep/018/al999e/al999e.pdf>>. Acesso em: 05 jun. 2015.

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

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

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

GAO, Q.; WANG, X.; XU, H.; XU, Y.; LING, J.; ZHANG, D.; GAO, S.; LIU, X. Roles of iron acquisition systems in virulence of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: salmochelin and aerobactin contribute more to virulence than heme in a chicken infection model. **BMC Microbiology**, v. 12 v. 143 2012.

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*. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 5, p. 1241-1249, 2008.

GARTNER, L. P. HIATT, J.L. **Histologia Essencial**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

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: Editora 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.

GOES, C.R.; GAZIRI, L.C.J.; VIDOTTO, M.C. Cloned Genes of Virulent Genes of Avian *Escherichia coli* Do Not Confer Virulence to Recombinant Strains. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 26, n. 3, p. 26-275. 1993.

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.
- GOMIS, S.M.; GOMIS, A. I. U.; HORADAGODA, N. U.; WIJEWARDENE, T.G. ; ALLAN, B.J. ; POTTER A.A. Studies on Cellulitis and Other Disease Syndromes Caused by *Escherichia coli* in Broilers in Sri Lanka. **Tropical Animal Health and Production**, v. 32, p. 341-351, 2000.
- 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.
- GUASTALLI, E.A.L.; GAMA, N.M.S.Q.; BUIM, M.R.; OLIVEIRA, R.A.; FERREIRA, A.J.P.; LEITE, D.S. Índice de patogenicidade, produção de hemolisina e sorogrupo de Amostras de *Escherichia coli* isoladas de aves de postura comercial. **Arquivo do Instituto Biológico**. São Paulo, v.77, n.1, p.153-157, jan.-mar, 2010.
- 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.
- HEINEMANN, I.U., JAHN, M., JAHN, D. The biochemistry of heme biosynthesis. **Archives Biochemistry Biophysics**, v. 474, n. 2, p. 238–251. 2008.
- 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, p. 143-166, 1996.
- HUJA, S., OREN, Y., TROST, E., BRZUSZKIEWICZ, E., BIRAN, D., BLOM, J. GOESMANN, A., GOTTSCHALK, G., HACKER, J., RON, E.Z., DOBRINDT, U. Genomic Avenue to Avian Colisepticemia. **Mbio**. Washington, v.6, p.1-13, jan.-fev. 2015.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Indicadores IBGE**. Apresenta: Estatística da Produção Pecuária em 2014. Disponível em: < http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abate-leite-couro-ovos_201404_publ_completa.pdf>. Acesso em: 05 jun. 2015.
- 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.
- JANBEN, T.; SCHWARZ, C.; PREIKSCHAT, P.; VOSS, M.; PHILIPP, H.C.; WIELER, L.H. Virulence-associated genes in avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from internal organs of poultry having died from colibacillosis. **International Journal of Medical Microbiology**. v. 291, p. 371-378, 2001.
- JAY, J.M. **Microbiologia de Alimentos**. 6 ed. São Paulo: Artmed, 2005. 711p.
- JEFREY, J.S.; CHIN, R.P.; SINGER, R.S. Assessing cellulitis pathogenicity of *Escherichia coli* isolates in broiler chickens assessed by an in vivo inoculation model. **Avian Diseases**. v. 43, p. 491-496. 1999.

- JOHNSON, L. C.; BILGILI, S. F.; HOERR, F. J. ; MCMURTREY, B. L.; NORTON, R. A. The influence of *Escherichia coli* strains from different sources and the age of broiler chickens on the development of cellulitis, **Avian Pathology**, v. 30, n. 5, p. 475-478, 2001.
- 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.
- JOHNSON, T.J.; GIDDINGS, C.W.; HORNE, S.M.; GIBBS, P.S.; WOOLEY, R.E.; OLAH, J.S.P.; KERCHER, R.; SHERWOOD, J.S.; FOLEY, S.L.; NOLAN, L.K. Location of increased serum survival gene and selected virulence traits on a conjugative R plasmid in an avian *Escherichia coli* isolate. **Avian Diseases**. Jacksonville, v. 46, n. 2, p. 342-352, abr-jun, 2002.
- 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**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.
- 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.
- KNÖBL, T. Prevalence of Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC) Clone Harboring *sfa* Gene in Brazil. **The Scientific World Journal**. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3361264/pdf/TSWJ2012-437342.pdf>>. Acesso em 14 jun, 2015.
- 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.
- KUMOR, L.W. OLKOWISK, S.M.; GOMIS, S.M.; ALLAN, B.J. Cellulitis in broiler chickens: epidemiological trends, meat hygiene, and possible human health implications. **Avian Diseases**, v. 42, p. 285-291. 1998.
- LAFONT J.P.; DHO, M.; HAUTEVILLE, H.M.D.; BREE, A.; SANSONETTI, P.J. Presence and expression of aerobactin genes in virulent avian strains of *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**,. v. 55, p.193–197. 1987.
- LA RAGIONE, R.M.; WOODWARD, M.J. Virulence factors of *Escherichia coli* serotypes associated with avian colisepticaemia-review article. **Research in Veterinary Science**, v. 73, p. 27-35, 2002.

- MACLACHLAN, N.J.; CULLEN, J.M. Fígado, sistema biliar e pâncreas exócrino. In: THOMSON, R.G. **Patologia Veterinária Especial**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, p. 265-298, 1998.
- 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.
- 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.
- MALUTA, R.P.; LOGUE, C.M.; CASAS, M.R.T.; MENG, T.; GUASTALLI, E.A.L.; ROJAS, T.C.G.; MONTELLI, A.C.; SADASTSUNE, T.; RAMOS, M.C.; NOLAN, L.K.; SILVEIRA, W.D. Overlapped Sequence Types (STs) and Serogroups of Avian Pathogenic (APEC) and Human Extra-Intestinal Pathogenic (ExPEC) *Escherichia coli* Isolated in Brazil. **PLOS ONE**. v. 9, n. 8, 2014.
- MANGES, A.R., JOHNSON, J.R. Food-borne origins of *Escherichia coli* causing extraintestinal infections. **Clinical and Infectious Diseases**, v. 55: p. 712–719, 2012.
- MARCARI, M.; FURLAN, R.L.; GONZALES, E., **Fisiologia Aviária Aplicada a Frangos de Corte**. Jaboticabal: FUNEP\UNESP, 2002.
- MELLATA, M. Human and Avian Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*: Infections, Zoonotic Risks, and Antibiotic Resistance Trends. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 10, n. 11, 2013.
- MESSIER, S. QUESY, S.; ROBINSON, Y.; DEVRIESE, L.A.; HOMMEZ, J.; FAIRBRITHER, J.M. Focal Dermatitis and Cellulites in Broiler Chickens Bacteriological and Pathological Findings. **Avian Diseases**. v.37, p. 839-844, 1993.
- 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. Disponível em: <http://www.researchgate.net/publication/43530039_ENVOLVIMENTO_DE_Escherichia_coli_de_Mycoplasma_gallisepticum_e_de_Mycoplasma_synoviae_EM_LESES_DE_SACOS_AREOS_EM_FRANGOS_ABATIDOS_NO_ESTADO_DE_GOIAS>. Acesso em 14 jun. 2015.
- 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.
- Ministério da Saúde. Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos VE-DTA, ago. 2014. Disponível em: <http://www.anrbrasil.org.br/new/pdfs/2014/3_PAINEL_1_ApresentacaoRejaneAlvesVigilanciaEpidemiologica-VE-DTA-Agosto_2014_PDF.pdf>. Acesso em: 09 ago. 2015.
- MOHAMED, M. A.; SHEHATA, M.A.; RAFEEK, E. Virulence genes content and antimicrobial resistance in *Escherichia coli* from broiler chickens. **Veterinary Medicine International**. Cairo, v. 2014, nov, 2014. doi: 10.1155/2014/195189.

MOULIN-SCHOULEUR, M.; REPERANT, M.; LAURENT, S.; BREE, A.; MIGNON-GRASTEAU, S.; GERMON, P.; RASSCHAERT, D.; SCHOULER, C. Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* Strains of Avian and Human Origin: Link Between Phylogenetic Relationships and Common Virulence Patterns. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, p. 3366–3376, 2007.

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. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, 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/CNPISA, 2002.

NEILANDS, J.B.; BINDEREIF, A.; MOTEGOMEREI, J.Z. Genetic Basis of Assimilation on Pathogenic *Escherichia coli*. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 118, p. 179-195. 1985.

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.

NOLAN, L. K.; GIDDINGS, C.W.; HORNE, S.M.; DOETKOTT, C.; GIBBS, P.S.; WOOLEY, R.E.; FOLEY, S.L. Complement Resistance, as Determined by Viable Count and Flow Cytometric Methods, and Its Association with the Presence of *iss* and the Virulence of Avian *Escherichia coli*. **Avian Diseases**, v. 46, n. 2, p. 386-392. abr, 2002.

NORTON, R.A.; BILGILI, S.F.; McMURTREY, B.C. A Reproducible Model for the Induction of Avian Cellulites in Broiler Chickens. **Avian Diseases**, v. 41, p. 422-428, 1997.

NUNES, F.G. ¿Por qué es tan competitiva la avicultura brasileña? (II). **Mundo Ganadero**, n. 187, p. 24-31, 2006. Disponível em: <[http://www.researchgate.net/publication/28281705_Por_qu_es_tan_competitiva_la_avicultura_brasilea_\(II\)](http://www.researchgate.net/publication/28281705_Por_qu_es_tan_competitiva_la_avicultura_brasilea_(II))>. Acesso em: 14 jun. 2015.

ODERKIRK, A. Broiler Cellulites. **Poultry Fact Sheet**. Nova Escócia, Canada : Poultry Service industry, 1997. Disponível em <http://www.gov.ns.cda/nsaf/elibrary/archive/lives/poultry/broilers/cellulite> Acesso em 01 mar 2009.

OLKOWSKI, A.A. WOJNAROWICZ, C.; CHIRINO-TREJO, M.; WURTZ B. M. ; L. KUMOR. The Role of First Line of Defence Mechanisms in the Pathogenesis of

Cellulitis in Broiler Chickens: Skin Structural, Physiological and Cellular Response Factors. **Journal Veterinary Medicine**, v. 52, p. 517–524, 2005.

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.

PASS, D. A. Integumentary System In: RIEDELL, C. **Avian Histopatology**, 2.ed. American Association of Avian Pathology, p. 219-229, 1996.

PITOUT J.D. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: A combination of virulence with antibiotic resistance. **Front Microbiology**, n. 3, p. 1–7, 2012.

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; DA SILVA, A. C.; BRITO A. B.; MORAES, H.L.S.; PONTES A. P. CE, M. C.; DO NASCIMENTO, V.; SALL, C. T. Virulence factors of avian pathogenic *Escherichia coli* isolated from broilers from the South of Brazil. **Avian Diseases**, v. 46, n. 3, p. 749-753, 2002.

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, mar., 2008.

RODRIGUEZ-SIEK, K.E.; GIDDINGS, C.W.; DOETKOTT, C.; JOHNSON, T.J.; NOLAN, L.K. Characterizing the APEC pathotype. **Veterinary Research**, v. 36, p. 241-256, 2005a.

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**, n. 151, p. 2097–2110. 2005b.

ROJAS, T.C.G.; MALUTA, R.P.; KOENIGKAN, L.V.; SILVEIRA, W.D. In silico phylogenetic and virulence gene profile analyses of avian pathogenic *Escherichia coli* genome sequences. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 2, p. 129-133, 2014.

RON, E.Z. Host specificity 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.

- RYDER, A. A.; FEDDES, J. J. R.; ZUIDHOF, M. J., Field study to relate heat stress index to broiler performance, **Journal of Appliance Poultry Research**. v. 13, p. 493-499, 2004.
- 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.
- SAVIANE, G. **Anatomia das Vias Sanguíneas e Biliares e Histologia do Fígado de Avestruz (Struthio camelus, Linnaeus 1758)**. 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências), Programa de Pós-Graduação em Anatomia de Animais Domésticos e Silvestres, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.
- SCHOULER, C.; KOFFMANN, F.; AMORY, C.; LEROY-SÉTRIN, S.; MOULIN-SCHOULEUR, M. Genomic subtraction for the identification of putative new virulence factors of an avian pathogenic *Escherichia coli* strain of O2 serogroup. **Microbiology**, v. 150, n. 9, p. 2973–2984, 2004.
- SCHRADER, J. S.; SINGER, R. S.; ATWILL, E. R. A Prospective Study of Management and Litter Variables Associated with Cellulitis in California Broiler Flocks. **Avian Diseases**, Elsevier Science, v. 48, n.3, p. 522-530. 2004.
- SCHUBERT, S.; PICARD, B.; GOURIOU, S.; HEESEMANN, J.; DENAMUR, E. *Yersinia* high-pathogenicity island contributes to virulence in *Escherichia coli* causing extraintestinal infections. **Infection and Immunity**, n. 70 p. 5335–5337. 2002.
- SEAGRI. Secretaria de Agricultura, Irrigação e Reforma Agrária. Disponível em:<http://www.seagri.ba.gov.br/investir_oportunidade.asp#AVICULTURA>. Acesso em: 13 out. 2008.
- SEAGRI. Secretaria de Agricultura, Irrigação e Reforma Agrária. Informe conjuntural Disponível em: < http://www.seagri.ba.gov.br/investir_oportunidade.asp>. Acesso em:17 out. 2009.
- SEAGRI. Secretaria de Agricultura, Pecuária, Irrigação, Reforma Agrária, Pesca e Aquicultura. **Informe conjuntural**. Disponível em: < http://www.seagri.ba.gov.br/sites/default/files/informe_conjuntural_producao_de_graos.pdf >. Acesso em: 05 jun. 2015.
- SILVA, I.M.M.; BALIZA, M.; SANTOS, M.P.; REBOUÇAS, L.T.; ROCHA, E.V.S.; SANTOS, V.A.; SILVA, R.M.; EVÊNCIO-NETO, J. Presença de *Escherichia coli* em fígados de frangos provenientes de matadouros avícolas. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v. 13, n. 3, p. 694-700 jul./set., 2012.
- 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.
- SILVEIRA, W.D.; FERREIRA, A.; BROCCHI, M.; HOLLANDA, L.M.; CASTRO, A.F.P.; YAMADA, A.T.; LANCELLOTTI, M. Biological characteristics and pathogenicity of avian *Escherichia coli* strains. **Veterinary Microbiology**, n. 85, p. 47-53. 2002.

- SINGER, R. S.; JEFFREY, J. S.; CARPENTER, T. E.; COOKE, L.C.; ATWILL, E. R.; JOHNSON W. O.; HIRSH, D. C. Persistence of cellulitis-associated *Escherichia coli* DNA fingerprints in successive broiler chicken flocks. **Veterinary Microbiology**, v. 75, p. 59-71, 2000.
- SMITH, J. L.; FRATAMICO, P. M.; GUNTHER, W. N. Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*. **Foodborne Pathogens and Disease**. Knoxville, v. 4, n. 2, 2007.
- 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.
- UBABEF. União Brasileira de Avicultura. **Relatório Anual 2014**. Apresenta anuário estatístico da produção e comércio avícola em 2014. Disponível em: <<http://www.ubabef.com.br/files/publicacoes/8ca705e70f0cb110ae3aed67d29c8842.pdf>>. Acesso em 05 jun. 2015.
- UNIFESP. Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Departamento de Informática em Saúde. Tabela de composição química dos alimentos - Relatório básico: Frango, de corte ate 8 semanas, peito, so carne, enriquecido, cru. Disponível em: <<http://www2.unifesp.br/dis/servicos/nutri/public/alimento/nutriente/ndbno/05314>>. Acesso em: 09 ago. 2015.
- 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, T.B.; FRANCO, R.M.; MAGALHÃES, H.; PRAXEDES, C.I.S.; TORTELLY, R. Celulite em frangos de corte abatidos sob inspeção sanitária: aspectos anatomopatológicos associados ao isolamento de *Escherichia coli*. **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias**, v. 13, n. 3, p. 174-177, set.-dez. 2006.
- 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.
- VIEIRA, T.B.; PEREIRA, V.L.A.; FRANCO, R.M.; NASCIMENTO, E.R.; SILVA, R.C.F.; TORTELLY, R. Potencial patogênico e caráter séptico de *Escherichia coli* pela identificação dos fatores de virulência *iss* e *felA* em celulite e miúdos de frangos sob Inspeção Sanitária. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, Rio de Janeiro, v.36, n.2, p.144-152, abr.-jun., 2014.
- XAVIER, D.B.; BROOM, D.M.; MCMANUS, C.M.P.; TORRES, C.; BERNAL, F.E.M. Number of flocks on the same litter and carcass condemnations due to cellulitis, arthritis and contact foot-pad dermatitis in broilers. **British Poultry Science**, v. 51, n. 5, p. 586-591, 2010.
- 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. **Arquivos do Instituto de Biologia**, v. 71, n. 3, p. 283-286, 2004.

5 ARTIGOS CIENTÍFICOS

5.1- PRIMEIRO ARTIGO

Submetido ao periódico PESQUISA VETERINÁRIA

PRESENÇA DE GENES DE VIRULÊNCIA *iss* e *iutA* EM LESÕES DE CELULITE E INSUMOS E AMBIENTE DOS AVIÁRIOS.

Ricardo M. da Silva^(1e3) Isabella de Matos M. da Silva⁽²⁾, Maykson C. de Jesus⁽¹⁾, Márcilio Delan B. Fernandes⁽²⁾, Vaneza L. Cardoso⁽¹⁾, Carlos E. C. O. Ramos⁽¹⁾ e Joaquim Evêncio-Neto⁽³⁾

ABSTRACT.- Silva R.M., Silva I.M.M., Jesus M.C., Fernandes M.D., Caradoso V.L., Ramos C.E.C.O. & Evêncio-Neto J. [Presence of virulence genes *iss* and *iutA* of cellulitis lesions and inputs and environment samples.] This work aimed to determine the population of *E. coli* and identify virulence genes *iss* and *iutA* in *E. coli* strains of cellulitis coming from a slaughterhouse in Recôncavo southern Bahia and also from inputs and environment samples of broiler houses including food, water and litter. In the period between August 2013 and January 2014 100 cellulitis were collected and *E. coli* population was recorded using the quick count method Petrifilm™ (3M Company), (AOAC 998.8). Samples of *E. coli* were analyzed for the presence of genes *iss*, and *iutA* using the Polymerase Chain Reaction (PCR). In 82% of the samples analyzed, there was the presence of *E. coli* with the samples population between 2,0 and 9,0 log UFC/g. Genes *iss* and *iutA* were found in 89.02% and 97.56% respectively from cellulitis streams and in 42.5% and 90.0% from litter isolates. Findings reveal positive and significant correlation between *E. coli* presence in litter and in cellulitis lesions and also with *iutA* gene and *E. coli* detected from litter isolates. The presence of virulence genes *iss* and *iutA* frequently present in Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) in cellulitis lesions and also in broiler houses litter from Recôncavo of Bahia region demonstrated the importance of rigorously sanitary actions implantation in all phases of the avian meat production chain intended to avoid the transmission of this and others pathogens from broilers house to the final consumer ensuring safety food production.

INDEX TERMS: *Escherichia coli*, aviculture, zoonotic potential, APEC.

RESUMO.- Objetivou-se neste trabalho determinar a população de *Escherichia coli* (*E. coli*) e identificar os genes de virulência *iss* e *iutA* nas cepas isoladas de celulites em matadouro do Recôncavo da Bahia e em amostras de insumos e ambiente dos aviários, incluindo ração, água e cama. No período de agosto de 2013 a janeiro de 2014, foram coletadas 100 amostras de lesões de celulite, sendo verificada a população de *E. coli*, pelo método rápido de contagem Petrifilm™ (3M Company), (AOAC 998.8) e nas amostras de água por meio do método rápido cromogênico ReadyCult® (Merck). As amostras de *E. coli* foram analisadas quanto a presença dos genes *iss* e *iutA*, utilizando a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Em 82% das amostras de celulite analisadas, houve a presença de *E. coli*, com a população entre 2,0 a 9,5 log UFC/g e em 71,43% das amostras coletadas em insumos e ambiente dos aviários. Os genes *iss* e *iutA* foram amplificados em 89,02% e 97,56%, respectivamente, dos isolados originados das celulites e em 42,5% e 90,0% dos isolados originados das amostras das camas dos aviários. Os resultados revelaram correlação positiva e significativa entre a presença da *E. coli* na cama dos aviários e nas lesões de celulite e dos genes *iutA* amplificados dos isolados de *E. coli* da cama dos aviários. Desta forma, considerando a presença dos genes de virulência *iss* e *iutA*, característicos de *Escherichia coli* Patogênica para Aves (APEC), nos isolados oriundos de lesões de celulite e de cama dos aviários da região do Recôncavo da Bahia, enfatiza-se que a implantação de técnicas rigorosas de manejo sanitário, em todas as etapas do processo produtivo da carne de frango que visem evitar a transmissão deste e de outros patógenos do avário para o consumidor final, garantindo a produção segura do alimento.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: *Escherichia coli*, avicultura, potencial zoonótico, APEC

¹ Universidade Federal do Recôncavo da Bahia- Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. Rua Rui Barbosa, 710 - Campus Universitário Cruz das Almas, BA, CEP 44380-000. ricardomendes@ufrb.edu.br, mayk_costa@hotmail.com; vaneza.leal@hotmail.com, carlosramos@ufrb.edu.br

² Universidade Federal do Recôncavo da Bahia- Centro de Ciências da Saúde. Avenida Carlos Amaral, 1015 - Cajueiro, Santo Antônio de Jesus, BA, CEP 44.570-000. isabellamatos@ufrb.edu.br, marciliobaliza@ufrb.edu.br

³ Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, S/N, Dois Irmãos, Recife, PE, CEP 50.171-900. evencio@dmfa.ufrpe.br

INTRODUÇÃO

As patologias infecciosas causadas por *Escherichia coli* geram prejuízos econômicos na indústria avícola, sendo a colibacilose frequentemente associada à mortalidade embrionária e do plantel, má conversão alimentar, menor desenvolvimento corpóreo e custos com medicamentos, elevando o percentual de condenação de carcaças devido às lesões por colisepticemia (Andreatti Filho, 2006).

Sendo considerada uma das principais doenças da indústria avícola moderna, a colibacilose gera quadros como pneumonia, peritonite, coliseptemia, celulite, pleuropneumonia, peri-hepatite, pericardite, salpingite, panofalmitis, osteomielite/sinovite, onfalite, coligranuloma, síndrome de cabeça inchada e doença crônica respiratória. Além disto, *Escherichia coli* contribui não só para o surgimento da doença, mas também gera perda de peso das aves e eleva a taxa de condenação de carcaças durante o abate e processamento (Barnes; et al., 2008; Machado et al., 2013).

Dentre as doenças causadas por cepas patogênicas de *Escherichia coli*, destaca-se a celulite, caracterizada por uma inflamação subcutânea, principalmente na coxa e abdômen. Ressalta-se que as principais alterações macroscópicas encontradas incluem o espessamento e irregularidade da pele, com alterações na coloração e presença de placas amarelas destacáveis no subcutâneo (Andrade et al. 2006; Ghanbarpour; et al. 2010). Esta inflamação pode levar a condenações parciais ou totais da carcaça. A condenação parcial é determinada pela presença de inflamação local ou de algum órgão, e, em existindo a inflamação de caráter sistêmico em carcaça ou vísceras, ocorre a condenação total (BRASIL, 1998).

Muitas bactérias podem estar envolvidas nesse processo, entretanto predomina a bactéria *Escherichia coli*. A linhagem das aves, nutrição, taxa de lotação, distância entre comedouros e bebedouros, tipo e manejo da cama, restrição de alimento e programas de iluminação podem afetar a incidência e a gravidade do problema (Mendes & KOMIYAMA, 2011).

Desta forma, a celulite aviária é um processo infeccioso ocasionado por bactérias que invadem o tecido, por meio das lesões superficiais na pele causadas pelo contato com outras aves ou devido à má qualidade da cama. Salienta-se que estas lesões são comumente causadas pelo subgrupo da *Escherichia coli* patogênica extra-intestinal (ExPEC), especialmente a APEC, *Escherichia coli* Patogênica para Aves (Huja et al. 2015).

Fatores de virulência descritos sobre estas estirpes de bactérias expressam características como adesinas, toxinas, sistemas de aquisição de ferro e resistência ao soro do hospedeiro (Nakazato et al. 2009). Em suas análises Johnson et al. (2008), identificaram um grupo de genes (*iutA*, *hlyF*, *iss*, *iroN*, and episomal *ompT*), que apresentaram correlação com o patótipo APEC, sendo capazes de discriminar isolados APEC de AFEC (Avian Fecal *Escherichia coli*) com a mesmo grau de genotipagem de virulência que um grupo completo com 46 genes diferentes. Brito et al. (2010) afirmaram que os genes *iss* e *iutA* são utilizados como marcadores moleculares de virulência para amostras de *Escherichia coli* associadas a celulite.

Danos na pele e lesões de diferentes tamanhos podem indicar que, durante seu desenvolvimento, as aves sofreram abusos, dor e foram submetidas a ambiente inadequado (Broom & Reefmann 2005). O manejo higiênico-sanitário da cama, incluindo a compostagem, é muito importante para a qualidade microbiológica da mesma, entretanto as condições ambientais, como umidade e temperatura também impactam na população microbiana da cama (Jones; et al. 2005; Mohee; et al. 2008), podendo alterar a proliferação de microrganismos na cama e determinar o surgimento de celulite e outras patologias (Coufal et al. 2006).

Salienta-se que os isolados de *Escherichia coli* oriundos de lesões de celulites apresentam características fenotípicas e genotípicas diferentes dos isolados de origem fecal, haja vista que, segundo Brito et al. (2003), não foram encontrados os genes de virulência *iss* e *iutA* nos isolados fecais, enquanto que eles foram amplificados em 83% e 92%, respectivamente, em isolados de *Escherichia coli* obtidas de lesões de celulites. Segundo Mohamed, Shehata & Rafeek (2014) o gene *iss* foi encontrado em 72.2% das cepas de ExPEC examinadas contrastando com zero por cento nas cepas de AFEC, sendo então considerado um bom marcador para distinguir as APEC.

Um fator preocupante relacionado à APEC consiste na atribuição de risco zoonótico, devido às semelhanças existentes entre as linhagens APEC e estirpes de *Escherichia coli* patogênicas extraintestinais (ExPEC) de origem humana, causadoras de infecção do trato urinário, septicemia, peritonite e meningite (Kaper et al. 2004; Rojas et al. 2014).

As cepas de APEC podem servir de elo até as cepas extra-intestinais patogênicas de *Escherichia coli* em humanos, por possuírem alguns fatores de virulência que as habilitam a causar patologias fora do trato intestinal. Além disto, APEC resistentes podem transferir genes de resistência antimicrobiana para cepas de humanos e para as comensais intestinais, via cadeia de produção alimentar, gerando implicações no tratamento de infecções do trato urinário e outras infecções extra-intestinais (Lima Filho et al. 2013; Kazemina; et al. 2014).

Diante da importância da cadeia produtiva de carne de frango como fonte geradora de receitas e de alimentos para todo o planeta, do impacto econômico e ambiental gerado pelo descarte ocorrido nos matadouros, dos riscos à saúde do consumidor oferecido pelo potencial zoonótico das APEC e da inexistência de um estudo que trace a possível trajetória percorrida desde o surgimento até o destino final deste patógeno, objetivou-se determinar a população de *Escherichia coli* (*E. coli*) e identificar os genes de

virulência *iss* e *iutA* nas cepas isoladas de celulites em matadouro do Recôncavo da Bahia e em amostras de insumos e ambiente dos aviários, incluindo ração, água e cama.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta das amostras. Foram coletadas 100 carcaças de frangos com lesões de celulite, antes da etapa da evisceração, da linha de abate de um matadouro avícola da Bahia sob inspeção estadual entre agosto de 2013 a janeiro de 2014.

Em seguida foi realizada a identificação de nove aviários de origem das amostras de celulite, dos quais sete foram visitados duas vezes entre três e sete dias após a coleta no matadouro, a fim de realizar a coleta de amostras de cama, ração dos comedouros, ração dos depósitos (nos galpões), de água dos bebedouros e água da tubulação do sistema de distribuição, duas de cada amostra. Ressalta-se que os responsáveis por dois aviários (números 3 e 7) não permitiram a coleta das amostras em suas instalações.

Desta forma, foram analisadas 70 amostras de insumos e ambiente provenientes de sete aviários, 10 por aviário. Foram 53 frangos, com lesões de celulite, coletados no matadouro avícola oriundos destas sete granjas.

As amostras foram coletadas assepticamente, identificadas e acondicionadas sob refrigeração, imediatamente transportadas para o Laboratório de Pesquisa em Microbiologia do Núcleo de Segurança Alimentar e Nutricional (SANUTRI) do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (CCS/UFRB), sendo as análises microbiológicas executadas em até duas horas.

Pesquisa de *Escherichia coli*. A presença ou ausência de *Escherichia coli* em 100 mL de cada amostra de água foi realizada por meio do método rápido cromogênico Readycult® (Merck), conforme orientações do fabricante. Uma alíquota das amostras que apresentaram fluorescência azul sob luz ultravioleta, características de serem positivas para *Escherichia coli*, foram transferidas para placas de Petri contendo ágar Eosina Azul de Metileno (Eosine-Methylene Blue, EMB) com auxílio de alça de platina (diâmetro 0,46 por 5 cm), sendo selecionadas as colônias que apresentaram coloração verde metálico (silva et al. 2007).

A população de *Escherichia coli* das demais amostras (celulite, ração e cama) foi determinada por meio de método placas Petrifilm™ (3M Company), utilizando a placa Petrifilm EC, conforme recomendações do fabricante (AOAC 998.8). A contagem de colônias características foi realizada com um contador de colônias modelo CP600 Plus (Phoenix®), sendo a população bacteriana expressa em log UFC/g (SILVA et al., 2007).

Pesquisa de genes de virulência de APEC. Inicialmente foram isoladas até três colônias típicas de *Escherichia coli* oriundas da placas Petrifilm EC™ (3M Company) e EMB. Cada colônia foi inoculada, com o auxílio da alça ou agulha de platina, em microtubo contendo o caldo de infusão de cérebro coração (Brain Heart Infusion, BHI), sendo incubado a 35±1 °C por 24±2 h. Após esse período, foram adicionados 2 mL de glicerol a 15% e as amostras foram congeladas a 20 °C negativos para posterior extração do DNA.

Para a extração do DNA, as amostras foram inoculadas em caldo BHI e incubadas a 35±1 °C por 24±2 h. Após isto foram centrifugadas por 5 minutos a 13.500 rpm. O sobrenadante foi descartado e acrescentado 800µL de água deionizada, sendo realizada a homogeneização e centrifugação nas mesmas condições descritas anteriormente. Novamente o sobrenadante foi descartado e foram adicionados 80µL de água deionizada e o conteúdo resultante homogeneizado. Em seguida as amostras foram aquecidas a 96 °C por 10 minutos aproveitando 2µL do sobrenadante e colocado em um microtubo contendo 18µL de água ultra pura (Hexapur™). As amostras de DNA foram estocadas a 20 °C negativos até o momento da análise.

A quantificação do DNA, a qual foi realizada por espectrofotometria (BioPhotometer D30 Eppendorf™) subsequentemente padronizadas com concentração final de 50 ng/10µL e então pesquisaram-se os genes de virulência associados ao patótipos APEC (*iss* e *iutA*) por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e as características dos primers estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1 - Características dos primers utilizados para a PCR em insumos e ambiente de aviários e celulite de frangos de um matadouro avícola do Recôncavo da Bahia.

| Gene | Sequência de oligonucleotídeos | Amplicom (PM) | Função |
|----------------|--|---------------|---------------------|
| <i>iss</i> * | GTGGCGAAAAGTAGTAAAACAGC | 760 | Resistência ao soro |
| <i>iutA</i> ** | GGCTGGACATCATGGGAACCTGG CGTCGGGAACGGGTAGAATCG | 302 | Aquisição de ferro |

* Fonte- Knöbl et al. (2012) ** Fonte Johnson et al. (2008) PM-Peso Molecular

Fonte: dados da pesquisa

O mix foi preparado em câmara asséptica e 24 µL foram distribuídos em tubos de polipropileno de 0.2mL, e adicionado 1µL de cada amostra por tubo. Para o controle negativo utilizou-se a água ultrapura (Hexapur™), para os controles positivos foram utilizadas cepas padrões cedidas pela Fundação

Oswaldo Cruz do Rio de Janeiro, APEC (ATCC 25922). A reação de PCR foi realizada em termociclador Mastercycler (Amplitherm™).

Posteriormente, 10µL do produto amplificado, assim como os controles positivo e negativo, e 2µL do peso molecular de 50 pb DNA *ladder* foram adicionados em cada poço do gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídio (10 mg/mL), realizando-se a separação por eletroforese, utilizando o equipamento GSR® 1000STD em condições de 100 minutos, 60V, 37mA e 2W. Após essa etapa os resultados foram observados ao transiluminador ultravioleta (Loccus®).

A análise estatística foi realizada por meio do *software* SPSS versão 22.0, empregando-se a média e desvio padrão na análise descritiva dos dados e frequência percentual para as variáveis qualitativas. Para comparar dados obtidos nas carcaças e no ambiente dos aviários foram empregadas as frequências da ocorrência do isolamento da bactéria e amplificação de genes de virulência, utilizando-se o teste de correlação de Pearson para comparações múltiplas e análise de componentes principais com rotação varimax e normalização de Kaiser. Consideraram-se os resultados estatisticamente significantes para valores de p menores ou iguais a 0,05 ou 0,01.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo revelaram que foram amplificados simultaneamente os genes *iutA* e *iss* em 87,80% (72/82), a partir dos isolados de *Escherichia coli* das amostras de celulite. Os genes *iutA* e *iss*, amplificaram em 97,56% (80/82) e 89,02% (73/82) respectivamente, dos isolados de *Escherichia coli* originados de lesões de celulite aviária (Figuras 1 e 2). A amplificação de apenas um gene ocorreu em 9,76% (8/82) para o gene *iutA* e 1,22% (1/82) para o gene *iss* (Tabela 2), confirmando a genotipagem de isolados de *E. coli* oriunda de celulite como um método eficiente para identificação de estirpes bacterianas, permitindo a identificação destes de forma mais precisa que outros métodos, conforme citado por Jeffrey et al. (2004).

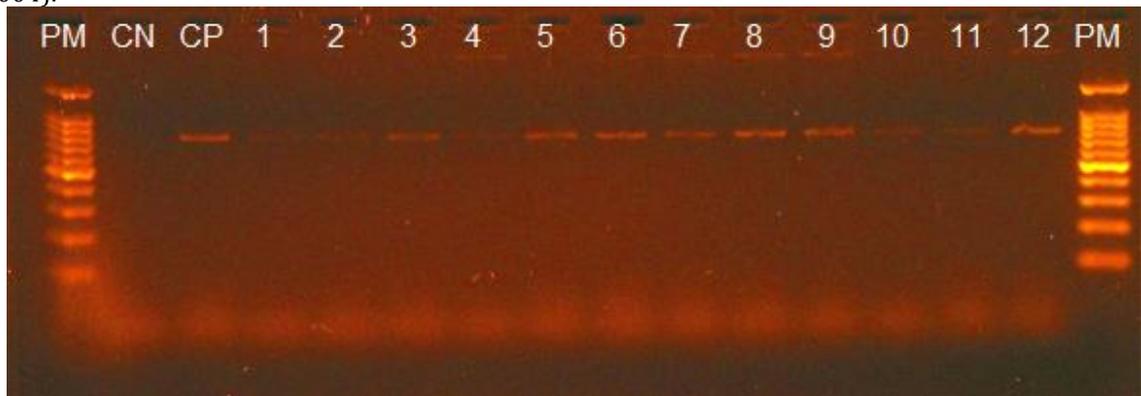


Figura 1 - Fotografia de gel de agarose da PCR do gene *iss* em amostras de celulite de frangos, insumos e ambiente de aviários do Recôncavo da Bahia. Fragmento 760pb, PM-Peso Molecular 100pb, CN- Controle negativo, CP- controle positivo, amostras positivas 1 - 12.

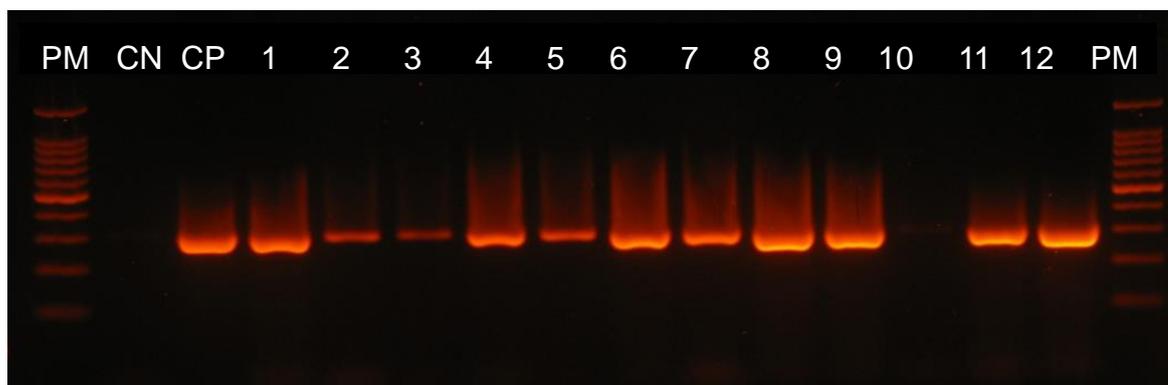


Figura 2 - Fotografia de gel de agarose da PCR do gene *iutA* em amostras de celulite de frangos, insumos e ambiente de aviários do Recôncavo da Bahia. Fragmento 302pb, PM Peso Molecular 100pb, CN Controle negativo, CP controle positivo, amostras positivas 1 - 12.

Tabela 2- Frequência de *Escherichia coli* e genes de virulência *iss* e *iutA* em amostras de celulite de frangos em aviários do Recôncavo da Bahia

| Origem | População * | Média <i>E. coli</i> | <i>E. coli</i> | <i>iss</i> | <i>iutA</i> | n** |
|-----------|--------------------------|----------------------|----------------|------------|-------------|-----|
| Aviário 1 | 2,90-6,34 ($\pm 1,41$) | 5,34 | 5/5 | 2/5 | 5/5 | 5 |
| Aviário 2 | 3,43-7,34 ($\pm 1,62$) | 6,02 | 3/5 | 3/3 | 2/3 | 5 |
| Aviário 3 | <1-9,0 ($\pm 2,91$) | 4,85 | 30/39 | 26/30 | 30/30 | 39 |
| Aviário 4 | <1-7,60 ($\pm 2,26$) | 5,17 | 14/16 | 12/14 | 13/14 | 16 |
| Aviário 5 | <1-8,15 ($\pm 3,65$) | 4,59 | 4/6 | 4/4 | 4/4 | 6 |
| Aviário 6 | <1-7,0 ($\pm 2,38$) | 4,35 | 9/11 | 9/9 | 9/9 | 11 |
| Aviário 7 | <1-7,40 ($\pm 2,35$) | 5,55 | 7/8 | 7/7 | 7/7 | 8 |
| Aviário 8 | 7,08-7,60 ($\pm 0,23$) | 7,37 | 4/4 | 4/4 | 4/4 | 4 |
| Aviário 9 | 7,00-7,97 ($\pm 0,43$) | 7,68 | 6/6 | 6/6 | 6/6 | 6 |
| Total | <1-9,0 ($\pm 2,57$) | 5,66 | 82/100 | 73/82 | 80/82 | 100 |

*População de *E. coli* em log UFC/g **n – número de amostras de celulite

Corroborando com estes resultados, Corrêa et al. (2013) amplificaram o gene *iss* em 92,8% (26/28) e o gene *iutA* em 71,4% (20/28) de amostras coletadas em aves no Brasil. Em um trabalho realizado com frangos na região sul do Brasil, Brito et al. (2003) apresentaram características genotípicas semelhantes, pois amplificaram o gene *iss* em 83% (43/52) das amostras analisadas e o gene *iutA* foi amplificado em 92% (48/52) das cepas de *E. coli* oriundas de lesões de celulites aviárias.

Da mesma forma, em estudo sobre a prevalência de genes de virulência nas APEC nos Estados Unidos, Rodriguez-Siek et al. (2005) encontraram o gene *iss* em amostras de aves (frangos e perus) em 76,5% dos isolados e o gene *iutA* em 92,7% destas amostras.

Barbiere et al. (2013) encontraram o gene *iss* em 78,5% (113/144) de isolados obtidos de graves lesões de celulite em frangos de corte provenientes de matadouros do Paraná e nas cepas APEC isoladas na Coréia do Sul entre 1985 e 2005 e Jeong et al. (2012) amplificaram o gene *iss* em 78,2% das amostras.

A presença de 19 genes de virulência em 460 isolados de *Escherichia coli*, procedentes de França, Espanha e Bélgica, sendo 352 patogênicos e 108 não patogênicos, foi detectada utilizando a PCR e hibridização, e dentre os genes predominantes nas amostras patogênicas, o *iutA*, gene da aerobactina, foi amplificado em 82,7% das cepas patogênicas (Schouler et al. 2012).

A ecologia da *Escherichia coli* geradora de lesões de celulite e de septicemia ainda não está clara, entretanto os estudos de Jeffrey et al. (2004) indicam, baseados em achados genéticos, que os mesmos marcadores de DNA das lesões nos frangos permanecem distintos entre fazendas geograficamente separadas, permitindo inferir que o ambiente do aviário, especialmente a cama, seja o reservatório primário das *Escherichia coli* das lesões de celulite.

Segundo Paganini (2004), cama é todo o material distribuído sobre o piso de galpões para servir de leito às aves, sendo constituído de uma mistura de excreta, penas das aves, ração e o material utilizado sobre o piso, os dados da presente pesquisa revelaram que a cama foi a amostra mais contaminada por *Escherichia coli*. Conforme a tabela 3, a bactéria *Escherichia coli* foi isolada em 92,9% (13/14) das amostras coletadas dos sete galpões analisados.

Tabela 3 - Frequência de *Escherichia coli* e genes de virulência *iss* e *iutA* em insumos e ambiente de aviários do Recôncavo da Bahia.

| Tipo de amostra | População <i>E. coli</i> * | Média <i>E. coli</i> * | <i>E. coli</i> | <i>iss</i> | <i>iutA</i> | n*** |
|-------------------|----------------------------|------------------------|----------------|------------|-------------|------|
| Ração depósito | <1-5,80 ($\pm 1,79$) | 2,33 | 10/14 | 0/10 | 7/10 | 14 |
| Ração comedouro | <1-5,28 ($\pm 1,87$) | 2,81 | 11/14 | 6/11 | 11/11 | 14 |
| Cama | <1-7,79 ($\pm 1,78$) | 5,29 | 13/14 | 4/13 | 11/13 | 14 |
| Água reservatório | NQ** | NQ** | 5/14 | 2/5 | 4/5 | 14 |
| Água bebedouro | NQ** | NQ** | 11/14 | 5/11 | 11/11 | 14 |
| Total | <1-7,79 ($\pm 2,20$) | 3,48 | 50/70 | 17/40 | 36/40 | 70 |

*População em log UFC/g

**NQ - Não quantificado

***n – número de amostras

Resultados semelhantes foram encontrados por Corrêa (2013) que coletou 13 amostras de cama de aviário diretamente nos galpões situados na região sul e sudeste do estado de Goiás e isolou *Escherichia coli* em 92,3% das amostras.

Segundo Xavier et al. (2010) a piora na qualidade da cama, principalmente pelo reuso que gera compactação e aumento de umidade, determina o aparecimento de lesões na pele, ocasionando o surgimento de celulite, infecções subcutâneas resultantes da contaminação bacteriana nos arranhões da pele e, por conta destas lesões, eles puderam observar a elevação no número de condenações de carcaças no processo de abate. Além disto, comparações da microbiota da cama de aves oriundas de propriedades com diferentes manejos podem identificar práticas ou condições que podem reduzir ou até eliminar bactérias vegetativas agressivas.

A tabela 4 evidencia a correlação entre o isolamento de *Escherichia coli* nas amostras de celulite e nas camas dos aviários juntamente com a amplificação dos genes *iss* e *iutA* destas mesmas amostras.

Tabela 4 Correlações da frequência de *Escherichia coli* e genes de virulência *iss* e *iutA* em amostras de celulite de frangos e de cama em aviários do Recôncavo da Bahia.

| Variáveis | <i>E. coli</i> cel | <i>iss</i> cel | <i>iutA</i> cel | <i>E. coli</i> cama | <i>iss</i> cama | <i>iutA</i> cama |
|---------------------|--------------------|----------------|-----------------|---------------------|-----------------|------------------|
| <i>E. coli</i> cel | 1,000 | | | | | |
| <i>iss</i> cel | -0,458 | 1,000 | | | | |
| <i>iutA</i> cel | -0,302 | 0,431 | 1,000 | | | |
| <i>E. coli</i> cama | 0,821*(1ª) | -0,297 | -0,186 | 1,000 | 0,32 | |
| <i>iss</i> cama | 0,596 | 0,046 | 0,357 | 0,32 | 1,000 | |
| <i>iutA</i> cama | 0,821*(2ª) | -0,297 | -0,186 | 1,000**(3ª) | 0,32 | 1,000 |

* A correlação é significativa no nível 0,05 (2 extremidades).

** A correlação é significativa no nível 0,01 (2 extremidades).

cel – celulite

A primeira correlação destacada é entre as estirpes de *Escherichia coli* isoladas nas lesões de celulite e as obtidas nos aviários, permitindo afirmar que é possível que as mesmas estirpes de bactérias que foram encontradas e isoladas de amostras das camas dos aviários ocasionaram a infecção no tecido subcutâneo das aves retiradas da linha de produção ($r=0,821$, $p<0,05$). Destaca-se que não foram encontradas outras pesquisas estudando possível a correlação entre *Escherichia coli* isoladas das lesões de celulite e as obtidas nos aviários.

A segunda é a correlação significativa foi obtida entre estirpes de *Escherichia coli* oriundas das lesões de celulite e a amplificação do gene *iutA* nos isolados de *Escherichia coli* provenientes das camas dos aviários ($r=0,821$, $p<0,05$). Este resultado reforça a primeira correlação, pois o gene *iutA*, característico das APEC, foi amplificado em 86% (12/14) das amostras oriundas de camas dos aviários. Resultado semelhante foi revelado pela pesquisa de Rodriguez-siek et al. (2005) que amplificaram 81,2% (368/451) e de Johnson et al. (2008) quando *iutA*, gene sideróforo da aerobactina, foi amplificado em 97,3% (71/73). Salienta-se que as amostras foram obtidas de aves em ambos os artigos.

A terceira correlação é entre os isolados de *Escherichia coli* oriundos das camas e os amplificados do gene *iutA* de isolados de *Escherichia coli* das camas ($r=1,000$, $p<0,01$), e indica maior possibilidade do patógeno isolado nas lesões de celulite estar contido na cama dos aviários.

Estudos correlacionam a APEC à ocorrência de celulite aviária (Barros et al. 2013; Barbieri et al. 2013; Vieira et al., 2014; Huja et al. 2015), eles observaram que o manejo da cama se constitui em um problema. Otutumi et al. (2013) revelam que o bom desempenho de um lote de frangos é associado à qualidade da cama que é influenciada por sua concentração de bactérias. Jeffrey et al. (2004) afirmam que quando os lotes apresentam alta incidência de celulite é necessário o aumento do período de vazio sanitário e a troca da cama.

Os achados do presente estudo comprovam a presença da APEC na cadeia produtiva da carne de frango, o que, segundo Mohamed et al. (2014) pode permitir a transmissão de patógenos que carregam genes de resistência a antimicrobianos em seu material genético nas fazendas ou nas plantas industriais. A possibilidade de produtos de origem aviária serem fontes de ExPEC causadoras de sepsse em humanos é demonstrada em vários estudos recente que demonstraram as similaridades entre as APEC e as ExPEC humanas, especialmente por seus fatores de virulência (Manges & Johnson 2012), salientando desta forma o potencial zoonótico do patógeno isolado nesta pesquisa.

Os resultados obtidos no presente trabalho apontam a necessidade de que programas de controle higiênico-sanitário sejam implantados e avaliados com mesma intensidade tanto no abate dos animais como no ambiente do aviário, especialmente nas camas para assim reduzir a incidência de lesões de celulite nos frangos de corte.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando a correlação positiva e significativa entre os isolados de *Escherichia coli* das amostras do ambiente dos aviários e das amostras de celulite é possível traçar o provável roteiro por onde a bactéria *Escherichia coli* trafega desde a cama das aves até a planta industrial e daí até o consumidor final por meio das lesões de celulite nos frangos de corte.

Estes resultados reforçam a importância da implantação de técnicas rigorosas de manejo sanitário em todas as etapas do processo produtivo, em especial no aviário, onde a troca ou descontaminação da cama entre os lotes é fundamental para a redução da possibilidade de disseminação de microrganismos patogênicos, em especial *Escherichia coli*.

Um vasto referencial teórico, baseado em pesquisas com uso de diversas técnicas modernas, permite afirmar que o potencial zoonótico das APEC deve ser mais atentamente avaliado por todos os que participam da cadeia produtiva avícola, sejam da iniciativa privada ou dos órgãos públicos de fiscalização e pesquisa.

Assim, a comprovação da presença dos genes de virulência *iss* e *iutA* nos isolados de *Escherichia coli*, oriundos de lesões de celulite e cama dos aviários na região do Recôncavo da Bahia deve ser um alerta para todos que, de alguma forma, se relacionam com esta fonte de proteína tão estratégica que é a carne de frango.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior pela concessão de bolsa de estudos. À Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) do Rio de Janeiro pela disponibilização das cepas padrão utilizadas como controle positivo, ao matadouro avícola e a todos os produtores rurais que permitiram a coleta das amostras.

REFERÊNCIAS

- Allan B., Buchanan R.M., Hauta R., Hurk J.V.D., Wilsoninnate H.L. 2012. Immune Cocktail Partially Protects Broilers Against Cellulitis and Septicemia. *Avian Diseases*, v. 56, n. 4, p.659-669,
- Andrade C.L., Ferreira G.B., Franco R.M., Nascimento E.R., Tortelly R. 2006. Alterações patológicas e identificação da *Escherichia coli* como agente causal da celulite aviária em frangos de corte inspecionados em um matadouro de São Paulo. *Revista Brasileira de Ciências Veterinárias*, v. 13, n. 3, p. 139-143, set-dez.
- Andreatti Filho R.L. 2006. Saúde aviária e doenças. São Paulo: Roca, 314p.
- Barbieri N.L., Oliveira A.L., Tejkowski T.M., Pavanelo D.B., Assumpção M., Rocha D., Matter L.B., Callegari-Jacques S.M., Benito, J.G.B., Brito B.G., Horn F. 2013. Genotypes and pathogenicity of cellulitis isolates reveal traits that modulate APEC virulence. *Plos One*. v. 8, aug.
- Barnes H.J., Vaillancourt J.P., Gross W.B. 2008. Colibacillosis. In: SAIF, Y.M. (Ed.) *Diseases of poultry*. e. 12, p. 631-656.
- Barros L.S.S., Silva R.M. Silva I.M.M., Baliza M., Freitas F. 2013. *Escherichia coli* from cellulitis lesions in broilers., *Food Measure*, v.7, p.40-45.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria n. 210, de 26 de novembro de 1998. Aprova o Regulamento Técnico da Inspeção Tecnológica e Higienização Sanitária da Carne de Aves. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 1998.
- Brito B.G., Gaziri L.C.J. & Vidotto, M.C. 2003. Virulence Factors and Clonal Relationships among *Escherichia coli* Strains Isolated from Broiler Chickens with Cellulitis. *Infection and Immunity*, v. 71, n. 7, p. 4175-4177, jul
- Brito B.G., Tejkowski T.M., Jaenisch F.R.F., Brito K.C.T. 2010 Fatores de risco envolvidos na dermatite necrótica dos frangos de corte, In: SIMPÓSIO DE SANIDADE AVÍCOLA, 7., , Santa Maria. Anais eletrônicos... Santa Maria: UFSM, 2010. Disponível em: <<http://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/874979/1/05.pdf>> Acesso em: 13 mai. 2015.
- Broom, D.M. & Reefmann, N. 2005. Chicken welfare as indicated by lesions on carcasses in supermarkets. *British Poultry Science*, v. 46, n. 4, p. 407-414.
- Corrêa, F.A.F. 2013. Pesquisa de bactérias com determinação do perfil de sensibilidade em vísceras comestíveis de frango de corte, penas e camas de aviários., 48f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Goiás. Goiânia.
- Corrêa, I.M.O.; Flores, F.; Schneiders, G.H.; Pereira, L.Q.; Brito, B.G.; Lovato, M. 2013. Detecção de fatores de virulência de *Escherichia coli* e análise de *Salmonella* spp. em psitacídeos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 33, n. 2, p.241-246, fev.
- Coufal, C.D.; Chavez, C.; Niemeyer, P.R.; Carey, J.B. 2006. Effects of top-dressing recycled broiler litter on litter production, litter characteristics, and nitrogen mass balance. *Poultry Science*, v. 85, p. 392-397.

- Ghanbarpour, R.; Salehi, M. & Oswald, E. 2010. Virulence genotyping of *Escherichia coli* isolates from avian cellulitis in relation to phylogeny. *Comparative Clinical Pathology*, Londres, v.19, p.147-153.
- Huja, S.; Oren, Y.; Trost, E.; Brzuszkiewicz, E.; Biran, D.; Blom, J.; Goesmann, A.; Gottschalk, G.; Hacker, J.; Ron, E.Z.; Dobrindt, U. 2015. Genomic Avenue to Avian Colisepticemia. *Mbio*. Washington, v.6, p.1-13, jan-fev.
- Jeffrey, J.S.; Singer, R.S.; O'Connor, R.; Atwill, E.R. 2004. Prevalence of Pathogenic *Escherichia coli* in the broiler house environment. *Avian Diseases*, v. 48, p.189-195.
- Jeong, Y.W.; Kim, T.E.; Kim, J.H.; Kwon, H.J. 2012. Pathotyping avian pathogenic *Escherichia coli* strains in Korea. *Journal of Veterinary Science*, v. 13, n. 2, p.145-152.
- Johnson, T.J.; Wannemuehler, Y.; Doetkott, C.; Johnson, S.J.; Rosenberger, S.C.; Nolan, L.K. 2008. Identification of Minimal Predictors of Avian Pathogenic *Escherichia coli* Virulence for Use as a Rapid Diagnostic Tool. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 12, p. 3987-3996.
- Jones, T.A.; Donnelly, A.C. & Dawkins, M.S. 2005. Environmental and management factors affecting the welfare of chickens on commercial farms in the United Kingdom and Denmark stocked at five densities. *Poultry Science*, v. 84, p. 1155-1165.
- Kazemnia, A.; Ahmadi & M.; Dilmaghani, M. 2014. Antibiotic Resistance Pattern of Different *Escherichia coli* Phylogenetic Groups Isolated from Human Urinary Tract Infection and Avian Colibacillosis. *Iranian Biomedical Journal*, v. 18, n.4, p. 219-224.
- Kaper, J.B.; Nataro, J.P. & Mobley, H.L.T. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature*, v. 2, p. 123-140.
- Knöbl, T.; Moreno, A.M.; Paixão, R.; Gomes, T.A.T.; Aparecida, M.; Vieira, M.; Leite, D.S.; Blanco, J.E.; Ferreira, A.J.P. 2015. Prevalence of Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC) Clone Harboring *sfa* Gene in Brazil. **The Scientific World Journal**. 7 p., 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3361264/pdf/TSWJ2012-437342.pdf>> . Acesso em: 13 mai.
- Lima-Filho, J.V.; Martins, L.V.; Nascimento, D.C.; Ventura, R.F.; Batista, J.E.; Silva, A.F.; Ralph, M.T.; Vaz, R.V.; Rabello, C.B.; Silva, I.M., Evêncio-Neto, J. 2013. Zoonotic potential of multidrug-resistant extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* obtained from healthy poultry carcasses in Salvador, Brazil. *Brazilian Journal Infectious Diseases*, v. 17, n. 1, p. 54-61.
- Machado, L.S.; Nascimento, E.R.; Pereira, V.L.A.; Almeida, D.O.; Abreu, D.L.C.; Gouvêa R. 2013. PCR na detecção de gene *felA* de *Escherichia coli* em frangos de corte condenados por aerossaculite pela inspeção sanitária federal. *Arquivos do Instituto Biológico* v. 80, n. 2, p. 145-149, abr./jun.
- Manges, A.R. & Johnson, J.R., 2012. Food-Borne Origins of *Escherichia coli* Causing Extraintestinal Infections. *Food Safety*, v. 55, p. 712-719.
- Mendes, A.A. & Komiya, C.M. 2011. Estratégias de manejo de frangos de corte visando qualidade de carcaça e carne. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 40, p. 352-357, (supl. especial).
- Mohamed, M.A.; Shehata, M.A. & Rafeek, E. 2014. Virulence Genes Content and Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli* from Broiler Chickens. *Veterinary Medicine International*. 6 p. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4259055/pdf/VMI2014-195189.pdf>>. Acesso em: 13 mai. 2015.
- Mohee, R.; Driver, M. & Sobratee, N. 2008. Transformation of spent broiler litter from exogenous matter to compost in a sub-tropical context. *Bioresource Technology*, v. 99, p. 128-136.
- Nakazato, G.; Campos, T.A.; Stehling, E.G.; Brocchi, M.; Silveira, W.D. 2009. Virulence factors of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 29, n. 7, p. 479-486.
- Otutumi, L.K.; Previato do Amaral, P.F.G.; Piau Júnior, R.; Moura, D.J., Carvalho, T.M.R.; Dalberto, J.L.; Brito, B.G. 2013. Efeito de micro-organismos benéficos no tratamento da cama de frango. *Arquivo de Ciências Veterinárias e Zoologia UNIPAR, Umuarama*, v. 16, n. 2, p. 121-127, jul./dez.
- Paganini, F.J. 2004. Manejo de Cama. In: Mendes, A.A.; Otutumi Nääs, I.A., Macari, M. *Produção de frangos de corte*. Campinas: FACTA.
- Rodriguez-Siek, K.E., Giddings, C.W., Doetkott, C., Johnson, T.J., Nolan, L.K. 2005. Characterizing the APEC pathotype. *Veterinary Research*, v. 36, p. 241-256.
- Rojas, T.C.G.; Maluta, R.P.; Koenigkan, L.V.; Silveira, W.D. 2014. In silico phylogenetic and virulence gene profile analyses of avian pathogenic *Escherichia coli* genome sequences. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 34, n. 2, p. 129-133.
- Schouler, C.A.; Schaeffer, B.; Brée, A.; Mora, A.; Dahbi, G.; Biet, F.; Oswald, E.; Mainil, J.; Blanco, J.; Schouleur, M.M. 2012. Diagnostic Strategy for Identifying Avian Pathogenic *Escherichia coli* Based on Four Patterns of Virulence Genes *Journal of Clinical Microbiology*, p 1673-1678, feb. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3347144/pdf/zjm1673.pdf>>. Acesso em: 13 mai.2015.
- Silva, N.; Junqueira, V.C.A., Silveira, N.F.A., Taniwaki, M.H., Santos, R.F.S., Gomes, R.A.R 2007. *Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos*. 3. Ed. São Paulo: Livraria Varela.

Vieira, T.B.; Pereira, V.L.A.; Franco, R.M.; Nascimento, E.R.; Silva, R.C.F.; Tortelly, R. 2014. Potencial patogênico e caráter séptico de *Escherichia coli* pela identificação dos fatores de virulência *iss* e *felA* em celulite e miúdos de frangos sob Inspeção Sanitária. Revista Brasileira de Medicina Veterinária, Rio de Janeiro, v.36, n.2, p.144-152, abr.-jun.

Xavier, D.B.; Broom, D.M.; McManus, C.M.P.; Torres, C.; Bernal, F.E.M. 2010. Number of flocks on the same litter and carcass condemnations due to cellulitis, arthritis and contact foot-pad dermatitis in broilers. British Poultry Science, v. 51, n. 5, p. 586-591.

5.2- SEGUNDO ARTIGO

Submetido ao periódico CIÊNCIA RURAL

Correlação entre a presença de *Escherichia coli* em lesões de celulite e fígados de frango
Correlations between the presence of *Escherichia coli* in broilers`s cellulitis lesions and
livers.

Ricardo Mendes da Silva ^(IeIII) Isabella de Matos Mendes da Silva^(II), Maykson Costa de Jesus^(I), Marcílio Delan Baliza Fernandes^(II), Vaneza Leal Cardoso^(I), Fábio Santos Oliveira^(II) e Joaquim Evêncio-Neto^(III)

RESUMO

O objetivo desta pesquisa foi verificar a presença de *Escherichia coli* nas lesões de celulites e fígados de frangos e relatar a correlação entre estes achados. Entre agosto de 2013 a janeiro de 2014, foram retiradas 100 carcaças da linha de produção de um matadouro avícola no estado da Bahia por apresentarem lesões de celulite, estas e os fígados foram retirados assepticamente para serem analisados. Foi quantificada *E. coli*, pelo método rápido de contagem Petrifilm™ (3M Company) (AOAC 998.8), conforme orientações do fabricante e os isolados de *E. coli* foram analisados quanto a presença dos genes *iss* e *iutA*, utilizando a PCR. *E. coli* foi isolada de 82 das 100 aves retiradas da linha de produção, e em 40 destas 82 (48,78%) a bactéria foi detectada concomitantemente nas lesões de celulite e fígado com contagens variando de 1,00 a 4,73 log UFC/g nos isolados dos fígados e de 2,00 a 9,00 log UFC/g, nas lesões de celulite. Das 100 aves analisadas *E. coli* foi detectada em ambas as

I - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia- Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. Rua Rui Barbosa, 710 - Campus Universitário Cruz das Almas, BA, CEP 44380-000. ricardomendes@ufrb.edu.br. mayk_costa@hotmail.com; vaneza.leal@hotmail.com

II - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia- Centro de Ciências da Saúde. Avenida Carlos Amaral, 1015 Cajueiro, Santo Antônio de Jesus, BA, CEP 44.570-000. isbellamatos@ufrb.edu.br, marciliobaliza@ufrb.edu.br fabiojackslater@yahoo.com.br

III - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, S/N, Dois Irmãos, Recife, PE, CEP 50.171-900. evencio@dmfa.ufrpe.br

amostras, fígados e lesões de celulite, em 40 frangos e a análise genotípica revelou a amplificação dos genes *iutA* e *iss* nos isolados de fígado e celulite de 24 das 40 aves (60%). Foi observada correlação positiva e significativa ($r=0,22$; $p<0,05$) entre as variáveis ocorrência de *E. coli* isolada das amostras dos fígados e ocorrência *E. coli* isolada das lesões de celulite e, nos casos em que foi detectada a ocorrência de *E. coli* isolada em fígado e lesões de celulite, correlações positivas e significativas também foram evidenciadas entre as populações de *E. coli* dos isolados dos fígados e das lesões de celulite, ($r=0,46$; $p<0,05$). Assim, a relação entre as lesões de celulite e a contaminação de outros órgãos das aves, como o fígado, caracterizando uma infecção sistêmica, permite afirmar que o descarte parcial das carcaças nas plantas industriais dos matadouros avícolas em caso de ocorrência de celulite aviária, põe em risco o consumidor final, desta forma, sugere-se que a presença de lesões de celulite seja utilizada como critério para o descarte total da carcaça.

Palavras-chave: *Escherichia coli*, inspeção sanitária; colibacilose, genes de virulência

ABSTRACT

The aim of this research was to verify the presence of *Escherichia coli* in broilers` s cellulitis lesions and livers and report correlations between this findings. From August 2013 to January 2014 100 cellulitis lesions were collected from production line from a poultry slaughterhouse located in Bahia State for having cellulitis lesions. These lesions and livers were aseptically removed for analysis. It was verified the *E. coli* population, by the rapid Petrifilm Count Method of TM (3M Company), (AOAC 998.8) according to manufacturer's directions. *E. coli* strains were analyzed for the presence of *iss* and *iutA* genes using the Polymerase Chain Reaction (PCR). *E. coli* was isolated from 82 of 100 poultry removed from the production

line and in 40/82 (48.78%) the bacteria was detected simultaneously in cellulitis lesions and livers with counts ranging from 1.00 to 4.73 log CFU/g from livers isolates and from 2.00 to 9.00 log UFC/g from cellulitis lesions isolates. Of the 100 poultry examined *E. coli* was detected in both samples, livers and cellulitis lesions, in 40 broilers and genotypic analysis revealed the simultaneous amplification of *iutA* and *iss* genes in liver and cellulite isolates in 24 of 40 birds (60%). There was a positive and significant correlation, ($r=0.22$; $p<0.05$), between variables occurrence of *E. coli* isolated from liver samples and occurrence of *E. coli* isolated from cellulitis lesions and, for samples which *E. coli* isolated was obtained for liver and cellulitis lesions, also positive and significant correlation was found between *E. coli* populations in liver and cellulitis lesions ($r=0.46$; $p<0.05$). Thus the relationship between cellulite injuries and other organs contamination such as liver, featuring a systemic infection, permits to affirm that the partial disposal of carcasses in industrial plants of poultry slaughterhouse in the event of avian cellulitis, endanger the consumer this manner is suggested that the presence of cellulitis lesions is used as a criterion for the total carcass discharge.

Key words: *Escherichia coli*, sanitary inspection; colibacillosis, virulence genes

INTRODUÇÃO

A indústria avícola possui forte impacto no mundo, uma vez que fornece proteína animal a baixos custos. Avançando nas áreas de nutrição, genética, manejo e sanidade, a avicultura é considerada a atividade pecuária de maior crescimento dos últimos tempos (JACOBSEN & FLÔRES, 2008).

A produção de carne de frango no Brasil, principal produto avícola, foi de 12,520 milhões de toneladas em 2014, mantendo o posto de terceiro maior produtor de carne de frango, atrás dos Estados Unidos e da China, constituindo-se o maior exportador mundial, enviando para o exterior 3,918 milhões de toneladas de carne e produtos de carne de frango (ABPA, 2014; IBGE, 2015)

Para a manutenção dessa posição de destaque, o país necessita aumentar e incrementar sua eficiência produtiva, atender os aspectos de qualidade da carne e as exigências relacionadas ao bem estar animal, além de preservar o meio ambiente, objetivando o crescimento econômico e evolução na produção (PASCHOAL et al. 2012).

Os órgãos responsáveis pela garantia de qualidade sanitária da carne e vísceras para o consumo são o Serviço de Inspeção Federal (SIF) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), serviço oficial permanente de inspeção sanitária dos matadouros avícolas, e suas representações estaduais e municipais. Os médicos veterinários encarregados da inspeção realizam a inspeção *ante mortem*, que compreende o exame visual dos lotes de aves destinadas ao abate e o exame *post mortem* que é realizado nas linhas de inspeção, que são pontos na seção de matança, especificamente na calha de evisceração (BRASIL, 1998; GOMIDE et al. 2006).

Apesar do ótimo desempenho, a avicultura vem apresentando problemas relacionados à sanidade das aves, em função da escala industrial da criação dos frangos de corte, constatando-se que as enfermidades cutâneas, especialmente a celulite aviária, vêm se tornando cada vez mais frequentes, gerando crescentes prejuízos à produção avícola. Estes danos são causados pela condenação parcial ou total das carcaças nos matadouros, com redução no valor do produto final, despesas com mão-de-obra adicional e equipamentos, redução na velocidade de processamento das carcaças e gastos com limpeza e desinfecção das instalações (ANDRADE et al., 2006, VIEIRA et al., 2014)

Dentre as causas da celulite aviária, destacam-se o manejo e a nutrição inadequados e a presença de patógenos, como *Escherichia coli*, que pode invadir o organismo da ave a partir de uma solução de continuidade na pele (VIEIRA et al. 2006).

As principais características da celulite aviária, causada por cepas patogênicas de *Escherichia coli*, são a inflamação subcutânea, principalmente na coxa e abdômen e as alterações macroscópicas como o espessamento e irregularidade da pele com alterações na coloração e a formação de placas amarelas destacáveis no subcutâneo (ANDRADE et al., 2006; GHANBARPOUR et al. 2010).

Gomis et al. (1997, 2000) demonstraram que aves condenadas por celulite podem apresentar também lesões em coração, sacos aéreos, ossos, articulações e/ou fígado. Objetivando zelar pela saúde pública BRASIL (1998) preconiza que qualquer órgão ou outra parte da carcaça que estiver afetado por um processo inflamatório deverá ser condenado e, se existir evidência de caráter sistêmico do problema, a carcaça e as vísceras na sua totalidade deverão ser condenadas. Os critérios de condenação de vísceras de frango (*Gallus gallus*), especialmente de fígados, consideram os aspectos visuais (cor, forma e tamanho), consistência e odor do órgão.

São inúmeras as alterações que o fígado de frango pode apresentar, incluindo distúrbios circulatórios, degenerativos, inflamatórios e neoplásicos. Muitas lesões hepáticas não são específicas quanto à etiologia, mas fornecem informações importantes sobre a ocorrência de doenças sistêmicas (HOERR, 1996; CALNEK, 1997).

Assim, considerando a escassez de estudos que correlacionem achados microbiológicos e moleculares em lesões de celulites e fígados de frangos, e pela possibilidade de haver correlações entre a presença de *Escherichia coli* e os genes de virulência característicos de *Escherichia coli* Patogênica para Aves (APEC) nas lesões de celulite e nos fígados dos frangos durante a evolução do processo infeccioso, objetivou-se

descrever a presença de *Escherichia coli* nas lesões de celulites e fígados de frangos e relatar a correlação entre estes achados, possibilitando sugerir novos critérios de descarte de carcaças a partir da observação de lesões de celulites nas linhas de produção em matadouros avícolas.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta de amostras, isolamento e contagem bacteriana

No período de agosto de 2013 a janeiro de 2014, em um matadouro avícola do Recôncavo Sul baiano, sob fiscalização da Agência de Defesa Agropecuária da Bahia (ADAB), foram coletadas 100 amostras de lesões de celulites e fígados de frangos (*Gallus gallus*) que apresentavam lesões de celulite, originadas de 100 aves criadas em nove aviários da região.

Para pesquisa de *Escherichia coli*, as amostras foram coletadas assepticamente com auxílio de uma lâmina de bisturi em coletores estéreis, identificados e transportados em caixa isotérmica com gelo químico, e, imediatamente após a coleta, foram enviadas ao Laboratório de Pesquisa em Microbiologia do Núcleo de Segurança Alimentar e Nutricional (SANUTRI) do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (CCS/UFRB). Para isolamento de *Escherichia coli* foi utilizado o método rápido de contagem em placas Petrifilm™ (3M Company), utilizando a Placa Petrifilm EC™ (AOAC 998.8), conforme orientações do fabricante. A contagem de colônias características foi realizada com auxílio de um contador de colônias modelo CP600 Plus (Phoenix®), calculando-se o número de log UFC/g (SILVA et al., 2007). *Pesquisa de genes de virulência de APEC*

Inicialmente foram isoladas até três colônias típicas de *Escherichia coli* oriundas da placas Petrifilm EC™ (3M Company). Cada colônia foi inoculada, com o auxílio da alça ou agulha de platina, em microtubo contendo o caldo de infusão de cérebro coração (*Brain Heart Infusion*, BHI), sendo incubado a 35 ± 1 °C por 24 ± 2 h. Após esse período, foram adicionados

2mL de glicerol a 15% e as amostras foram congeladas a 20 °C negativos para posterior extração do DNA.

Para a de extração do DNA, as amostras foram inoculadas em caldo BHI e incubadas a 35±1 °C por 24±2h. Após isto foram centrifugadas por 5 minutos a 13500 rpm. O sobrenadante foi descartado e acrescentado 800µL de água deionizada, sendo realizada a homogeneização e centrifugação nas mesmas condições descritas anteriormente. Novamente o sobrenadante foi descartado e foram adicionados 80µL de água deionizada e o conteúdo resultante homogeneizado. Em seguida as amostras foram aquecidas a 96 °C por 10 minutos aproveitado 2µL do sobrenadante e colocado em um microtubo contendo 18µL de água ultra pura (Hexapur™). As amostras de DNA foram estocadas a 20 °C negativos até o momento da análise.

A quantificação do DNA, a qual foi realizada por espectrofotometria (BioPhotometer D30 Eppendorf™) subseqüentemente padronizadas com concentração final de 50 ng/10µL e então pesquisaram-se os genes de virulência prevalentes nos patotipos APEC (*iss* e *iutA*) por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

As características dos *primers* estão descritas na tabela 1.
Tabela 1 - Características dos primers da PCR em amostras de lesões de celulite e fígados de frangos oriundos de um matadouro avícola do Recôncavo da Bahia.

| Gene | Sequência de oligonucleotídeos | Amplicom (PM) | Função |
|----------------|--------------------------------|------------------|------------------------|
| <i>iss</i> * | GTGGCGAAACTAGTAAAACAGC | 760 | Resistência ao soro |
| | CGCCTCGGGGTGGATAA | | |
| <i>iutA</i> ** | GGCTGGACATCATGGGAAGTGG | 302 | Aquisição de ferro |
| | CGTCGGGAACGGGTAGAATCG | | |

* Fonte- Knöbl et al. (2012) ** Fonte Johnson et al. (2008). PM-Peso Molecular

O mix foi preparado em câmara asséptica e 24µL foram distribuídos em tubos de polipropileno de 0.2mL, e adicionado 1µL de cada amostra de DNA por tubo. Para o controle negativo utilizou-se a água ultrapura (Hexapur™), para os controles positivos foram utilizadas cepas padrões cedidas pela Fundação Oswaldo Cruz do Rio de Janeiro, APEC (ATCC 25922). A reação de PCR foi realizada em termociclador Mastercycler (Amplitherm™).

Posteriormente, 10µL do produto amplificado, assim como os controles positivo e negativo, e 2µL do peso molecular de 100pb DNA *ladder* foram adicionados em cada poço do gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídio (10 mg/mL), realizando-se a separação por eletroforese, utilizando o equipamento GSR®1000STD em condições de 100 minutos, 60V, 37mA e 2W. Após essa etapa os resultados foram observados ao transiluminador ultravioleta (Loccus®).

A análise estatística foi realizada por meio do *software* SPSS versão 22.0, empregando-se a média e desvio padrão na análise descritiva dos dados e frequência percentual para as variáveis qualitativas. Para comparar as frequências da ocorrência do isolamento da bactéria *Escherichia coli* das lesões de celulite e dos fígados e das quantificações dos isolados de *Escherichia coli* nas lesões de celulites e dos fígados utilizou-se o Teste de Correlação de Pearson. Consideraram-se os resultados estatisticamente significantes para valores de p menores ou iguais a 0,05.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Escherichia coli foi isolada de 82 das 100 aves retiradas da linha de produção e em 40/82 (48,78%) a bactéria foi detectada concomitantemente nas lesões de celulite e fígado (Tabela 2). As populações de *Escherichia coli* nos isolados dos fígados variaram de 1,00 a

4,73 log UFC/g e nas lesões de celulite de 2,00 a 9,00 log UFC/g, corroborando com os resultados de Vieira et al. (2013) que isolaram estirpes de *Escherichia coli* em 50 amostras de aves oriundas de um matadouro frigorífico do Estado do Rio de Janeiro, nas quais em 50% (n=25) a bactéria estava presente simultaneamente nas lesões de celulite e fígado.

Tabela 2. Frequência de *Escherichia coli* e genes de virulência em amostras de lesões de celulite e fígados de frangos oriundos de um matadouro do Recôncavo da Bahia.

| Achado /Localização | Celulites | Fígados | Celulites e Fígados |
|--------------------------|-----------|---------|---------------------|
| <i>Escherichia coli</i> | 82/100* | 45/100* | 40/100* |
| <i>iutA</i> | 80/82 | 43/45 | 38/40 |
| <i>Iss</i> | 73/82 | 29/45 | 24/40 |
| <i>iutA</i> e <i>iss</i> | 24/40 | 24/40 | 24/40 |

* 100 número de carcaças com lesões de celulite retiradas da linha de produção de matadouro frigorífico do Recôncavo da Bahia.

Resultados contrastantes foram encontrados por Gomis et al. (2001), em pesquisa realizada no Canadá, que isolaram *Escherichia coli* em 237 amostras de celulite e apenas em três destas a bactéria também foi isolada no fígado com lesões macroscópicas, entretanto a inexistência de achados macroscópicos não garante a inocuidade do órgão, como comprovaram Silva et al. (2012) quando isolaram *Escherichia coli* em 60% (18/30) das amostras de fígados de frangos sem alterações macroscópicas no Recôncavo da Bahia.

Foi observada correlação positiva e significativa ($r=0,22$; $p<0,05$) entre as variáveis ocorrência de *Escherichia coli* isolada das amostras de fígado e *Escherichia coli* isolada das lesões de celulite, utilizando-se o coeficiente de correlação linear de Pearson. Brito, et al. (2003) afirmaram que estirpes de *Escherichia coli* isoladas de celulite estão mais associadas ao surgimento de sepse do que isolados de outras manifestações clínicas de colibacilose. Johnson et al. (2001) inocularam experimentalmente a bactéria *Escherichia coli* em aves para

propiciar o surgimento de lesões de celulite e constataram outras manifestações clínicas da colibacilose na maioria das aves contaminadas, incluindo perihepatite, pericardite e aerosaculite.

Outra correlação positiva e significativa observada, para a amostra em que *Escherichia coli* foi isolada no fígado e nas lesões de celulite, foi entre a população de *Escherichia coli* dos isolados de fígados e das lesões de celulite, ($r=0,46$; $p<0,05$), revelando que quanto maior a presença da bactéria nas lesões de celulite, maior será a população bacteriana nos fígados, reforçando assim os achados de Vieira et al. (2013), que sugerem que estirpes de *Escherichia coli* penetram no organismo animal por meio da lesão de celulite e alcançam os órgãos internos.

Em 40 das 100 amostras de fígado e lesões de celulite analisadas foi detectada a *Escherichia coli* e a análise genotípica revelou a amplificação concomitante dos genes *iutA* e *iss* em 24 das 40 amostras (60%) positivas para *E. coli*, caracterizando assim estas estirpes como APEC, haja vista que, segundo Brito et al. (2010), os genes pesquisados são considerados marcadores moleculares de virulência para os isolados de *Escherichia coli* associados a lesões de celulite.

Os achados das amplificações da PCR dos genes *iutA* e *iss*, característicos de APEC, nos isolados de fígado e celulite foram encontrados em oito dos nove aviários de onde foram obtidas as amostras, demonstrando a possibilidade deste patógeno estar disseminado nesta região do Estado da Bahia.

Resultados semelhantes foram encontrados por Brito et al. (2003) que identificaram estirpes de *Escherichia coli* oriundas de lesões de celulites apresentando fatores de virulência semelhantes em 52 lotes de aves oriundas dos Estados da Região Sul do Brasil, sugerindo uma disseminação endêmica deste patógeno.

Considerando a carne de frango como potencial veículo de disseminação de patógenos de origem alimentar, especialmente APEC (RODRIGUEZ-SIEK et al., 2005), sendo as ExPEC importantes causadores de infecções em humanos e aves, e ainda tendo em vista os achados de homologia de sequências genômicas entre cepas de APEC e de ExPEC humanas, além da presença de fatores de virulência de mamíferos em isolados oriundos de aves (SCHOULER et al., 2004 e MALUTA et al., 2014), é evidente o potencial zoonótico deste agente patogênico.

Por conseguinte, diante do eminente risco gerado pelas APEC para a saúde humana e corroborando com Vieira et al. (2014), que afirmaram que a remoção parcial das lesões de celulite apenas minimiza o aspecto repugnante da carcaça, sendo mais estética do que higiênica, não contribuindo para eliminação da contaminação, que poderia se estender às linhas de produção, evidencia-se que os critérios oficiais de descarte de carcaças, sobretudo no que tange o descarte parcial das áreas afetadas por lesões de celulite, precisam ser revistos, passando a presença de lesões de celulite a ser um critério de descarte total e não parcial da carcaça, haja vista a possibilidade de insegurança alimentar gerada pelo consumo de carne de frango e de seus subprodutos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A correlação positiva e significativa entre o isolamento de *Escherichia coli* nas lesões de celulite e nos fígados oriundos de aves criadas e abatidas na região do Recôncavo da Bahia sugere que a celulite aviária seja o fator iniciador do processo patogênico infeccioso que poderá alcançar outros órgãos, em especial no fígado destas aves.

A amplificação concomitante dos fatores de virulência, *iutA* e *iss*, na maioria das vezes que *Escherichia coli* foi isolada simultaneamente em celulites e fígados reforça a

possibilidade de que o patótipo APEC esteja presente nos dois tecidos biológicos fortalecendo a hipótese de que a bactéria infecta o animal por meio das lesões de pele e posteriormente alcança o fígado, o que configuraria o caráter sistêmico, e não local, dos achados de lesões de celulite.

O potencial zoonótico das APEC e as evidências da relação entre as lesões de celulite e a contaminação de outros órgãos das aves, como o fígado, permite afirmar que o descarte parcial das carcaças nas plantas industriais dos matadouros avícolas, em caso de ocorrência de celulite aviária, põe em risco não somente o consumidor de carne e produtos avícolas, como também a cadeia produtiva de frango de corte, desde o aviário até o ponto de venda, passando por todo o processo industrial e de distribuição.

Por conseguinte, considerando a etiopatogenia da colibacilose iniciada pelas lesões de celulite, e o eminente caráter sistêmico da infecção, pela presença APEC no fígado, torna-se necessário que todas as carcaças que apresentarem lesões de celulite sejam totalmente descartadas visando a sustentabilidade dos negócios e a segurança dos consumidores.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior pela concessão de bolsa de estudos. À Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) do Rio de Janeiro pela disponibilização das cepas padrão utilizadas como controle positivo, ao matadouro avícola e a todos os produtores rurais que permitiram a coleta das amostras.

REFERÊNCIAS

ABPA. **Relatório Anual 2014**. São Paulo: [online], 2014. Disponível em <www.ubabef.com.br>. Acesso em: 16 out. 2014.

ANDRADE, C.L. et al. Alterações patológicas e identificação da *Escherichia coli* como agente causal da celulite aviária em frangos de corte inspecionados em um matadouro de São Paulo. **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias**, v. 13, n. 3, p. 139-143, set-dez. 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Portaria nº 210, de 10 de novembro de 1998. Regulamento Técnico da Inspeção Tecnológica e Higiênico-Sanitária de Carne de Aves. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 10 de novembro de 1998.

Disponível em: < <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=1129>>. Acesso em: 03 jun 2015.

BRITO, B.G. et al. Virulence Factors and Clonal Relationships among *Escherichia coli* strains Isolated from Broiler Chickens with Cellulitis. **Infection and Immunity**, v.71, p. 4175-4177, 2003.

BRITO, B.G. et al. Fatores de risco envolvidos na dermatite necrótica dos frangos de corte. Artigo em anais de congresso (CNPSA), 2010. In: SIMPÓSIO DE SANIDADE AVÍCOLA, 7., 2010, Santa Maria. **Anais...** Santa Maria: UFSM, 2010.

CALNEK, B.W. (Coord.). **Diseases of Poultry**. 10. ed. Ames Iowa: Iowa State University .

GHANBARPOUR, R. et al. Virulence genotyping of *Escherichia coli* isolates from avian cellulitis in relation to phylogeny. **Comparative Clinical Pathology**, Londres, v.19, p.147-153, 2010.

GOMIDE, L.A.M. et al. **Tecnologia de Abate e Tipificação de Carcaças**. Viçosa: Ed. Viçosa, 2006, 370p.

GOMIS S.M. et al. Isolation of *Escherichia coli* from cellulitis and other lesions of the same bird in broiler at slaughter. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 38, p. 159-162, 1997.

GOMIS, S.M. et al. Studies on Cellulitis and Other Disease Syndromes Caused by *Escherichia coli* in Broilers in Sri Lanka. **Tropical Animal Health and Production**, v. 32, p. 341-351, 2000.

GOMIS, S.M. et al. Phenotypic and genotypic characterization of virulence factors of *Escherichia coli* isolated from broiler chickens with simultaneous occurrence of cellulitis and other colibacillosis lesions. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 65, p. 1-6, 2001.

HOERR, F. J. Liver. In.: RIDDELL, C. **Avian Histopathology**. Pennsylvania: Library of Congress, 1996. p. 143-166.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Indicadores IBGE. Apresenta: Estatística da Produção Pecuária em 2014 Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abat-e-leite-couro-ovos_201404_publ_completa.pdf>. Acesso em: 05 jun. 2015.

JOHNSON, L. C. et al. The influence of *Escherichia coli* strains from different sources and the age of broiler chickens on the development of cellulitis, **Avian Pathology**, v. 30, n. 5, p. 475-478, 2001.

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.

MALUTA, R.P. et al. Overlapped Sequence Types (STs) and Serogroups of Avian Pathogenic (APEC) and Human Extra-Intestinal Pathogenic (ExPEC) *Escherichia coli* Isolated in Brazil. **PLOS ONE**. v. 9, n. 8, 2014.

PASCHOAL, E.C. et al. Principais causas de condenações no abate de frangos de corte de um abatedouro localizado na região noroeste do Paraná Brasil. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia**, UNIPAR, Umuarama, v. 15, n. 2, p. 93-97, jul./dez. 2012.

RODRIGUEZ-SIEK, K.E. et al. Characterizing the APEC pathotype. **Veterinary Research**, v. 36, p. 241-256, 2005.

SCHOULER, C. et al. Genomic subtraction for the identification of putative new virulence factors of an avian pathogenic *Escherichia coli* strain of O2 serogroup. **Microbiology**, v. 150, n. 9, p. 2973–2984, 2004.

SILVA, I.M.M. et al. Presença de *Escherichia coli* em fígados de frangos provenientes de matadouros avícolas. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v. 13, n. 3, p. 694-700 jul./set., 2012.

SILVA, N. et al. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos**. 3. Ed. São Paulo: Livraria Varela, 2007.

VIEIRA, T.B. et al. Análise molecular de *Escherichia coli* isoladas de celulite e miúdos (fígado e coração) de frangos sob inspeção sanitária. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.35, n.3, p.247-252, jul/set 2013.

VIEIRA, T.B. et. al. Celulite em frangos de corte abatidos sob inspeção sanitária: aspectos anatomopatológicos associados ao isolamento de *Escherichia coli*. **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias**, v. 13, n. 3, p. 174-177, set.-dez. 2006.

VIEIRA, T.B. et al. Potencial patogênico e caráter séptico de *Escherichia coli* pela identificação dos fatores de virulência *iss* e *felA* em celulite e miúdos de frangos sob Inspeção Sanitária. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, Rio de Janeiro, v.36, n.2, p.144-152, abr.-jun., 2014.

5.3- TERCEIRO ARTIGO

Submetido ao periódico PESQUISA AGROPECUÁRIA

Achados anátomo-histopatológicos de fígados de frangos com lesões de celulite associados a *Escherichia coli*

Ricardo Mendes da Silva^(1 e 3), Isabella de Matos Mendes da Silva⁽²⁾, Marcílio Delan Baliza⁽²⁾ e Sibeles de Oliveira Tozetto Klein⁽²⁾, Veronica Belote de Moraes⁽²⁾, Joaquim Evêncio-Neto⁽³⁾

⁽¹⁾ Universidade Federal do Recôncavo da Bahia- Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. Rua Rui Barbosa, 710 - Campus Universitário Cruz das Almas, BA, CEP 44380-000. ricardomendes@ufrb.edu.br. ⁽²⁾ Universidade Federal do Recôncavo da Bahia- Centro de Ciências da Saúde. Avenida Carlos Amaral, 1015 - Cajueiro, Santo Antônio de Jesus, BA, CEP 44.570-000. isbellamatos@ufrb.edu.br, marciliobaliza@ufrb.edu.br sibeletozetto@ufrb.edu.br, veronica_morais1@hotmail.com. ⁽³⁾ - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, S/N, Dois Irmãos, Recife, PE, CEP 50.171-900. evencio@dmfa.ufrpe.br

Resumo- Foram caracterizados aspectos anátomo-histopatológicos de fígados de frangos, relacionando os achados à presença ou ausência de *Escherichia coli*. Foram coletadas 100 amostras de fígados de frangos (*Gallus gallus*) colhidas de carcaças com lesões de celulite em uma linha de abate em um matadouro avícola no Estado da Bahia. Análises histopatológicas foram realizadas sob microscopia de luz, após corte histológico e coloração de rotina pela Hematoxilina e Eosina (H.E). Análise microbiológica utilizou Placas Petrifilm EC™ (3M Company) (AOAC 998.8), conforme orientações do fabricante. *Escherichia coli* foi isolada em 44/100 dos fígados. Na análise anátomo-morfológica não houve diferença estatística entre as amostras oriundas de fígados contaminados e não contaminados. A alteração histopatológica em que foi detectada diferença estatisticamente significativa foi o tipo celular dos infiltrados, sendo os heterófilos mais prevalentes nos fígados contaminados por *Escherichia coli* e os infiltrados mistos característicos de fígados não contaminados por *Escherichia coli*. Aspectos macroscópicos do fígado devem continuar sendo utilizados como critério de descarte total de carcaças de frango nos matadouros avícolas devendo ser incluídas as análises microbiológicas e histopatológicas nas rotinas de inspeção da produção de carne de aves, para garantir produção segura dos alimentos.

Termos para indexação: Heterófilos; colibacilose; inspeção sanitária; lesão hepática.

Anatomical and histopathological findings of broiler livers with cellulitis lesions associated with *Escherichia coli*.

Abstract- This study characterized anatomical and histopathological aspects of broilers livers associated with the presence or absence of *Escherichia coli*. Broilers livers samples were collected taken from 100 carcasses that had cellulitis lesions in a slaughter line in a poultry slaughterhouse in the Bahia State. Histopathological analyzes were performed under light microscopy after histological section and routine staining (hematoxylin and eosin). Microbiological analysis used the rapid Petrifilm Count Method EC™ (3M Company), (AOAC 998.8) according to manufacturer's directions. *Escherichia coli* was isolated from 44 of 100 livers. In the analysis of anatomical and morphological characteristics there were no statistical differences between the samples from contaminated livers and those not contaminated. The only histopathological alteration detected with statistically significant difference was the infiltrates cell type. Heterophils cells were more prevalent in the contaminated livers with *Escherichia coli* and mixed infiltrate were characteristic of livers without *Escherichia coli* isolates. Macroscopic livers` characteristics should continue to be used as a total disposal criteria of broilers` carcasses in slaughterhouses. Microbiological and histopathological should be routine analysis in the poultry meat production sanitary inspection. This approach would ensure greater safety in broiler meat production.

Index terms: Heterophils; colibacillosis; sanitary inspection; liver injury.

Introdução

A indústria avícola possui forte impacto no mundo, uma vez que fornece proteína animal a baixos custos. No Brasil a produção de carne de frango, principal produto avícola, foi de 12,520 milhões de toneladas em 2014. O país manteve o posto de terceiro maior produtor de carne de frango, atrás dos Estados Unidos e da China, entretanto se constitui no maior exportador mundial, com o envio de 3,918 milhões de toneladas de carne e produtos de carne de frango para o exterior em 2013 (IBGE, 2015).

Desta forma, torna-se necessária a preocupação com os aspectos sanitários, objetivando o crescimento econômico e evolução na produção, sendo imprescindível o

aprimoramento tecnológico, o qual deve estar associado à evolução nas pesquisas relacionadas à sanidade das aves (FRANÇA, 2007).

O Serviço de Inspeção Federal (SIF) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) é o serviço oficial permanente de inspeção sanitária dos matadouros avícolas, como também suas representações estaduais e municipais. Os médicos veterinários realizam a inspeção *ante mortem*, que compreende o exame visual dos lotes de aves destinadas ao abate e o exame *post mortem* que é realizado nas linhas de inspeção, que são pontos na seção de matança, especificamente na calha de evisceração (Brasil, 1998).

Em função da produção em larga escala, do tipo de criação e do manejo de frangos de corte as lesões cutâneas, como a celulite aviária, vêm se tornando cada vez mais frequentes e são consideradas como uma das maiores causas de condenações totais e parciais em todo o mundo (Vieira et al., 2014).

As principais características da celulite aviária, causadas por cepas patogênicas de *Escherichia coli*, são a inflamação subcutânea, principalmente na coxa e abdômen, e as alterações macroscópicas, como o espessamento e irregularidade da pele com alterações na coloração e a formação de placas amarelas destacáveis no subcutâneo (Andrade et al., 2006; Ghanbarpour et al., 2010).

O critério de condenação por lesões de celulite, segundo dados de Brasil (1998), indica que estas, como qualquer órgão ou outra parte da carcaça que estiver afetada por um processo inflamatório, deverão ser condenadas e, se existir evidência de caráter sistêmico do problema, a carcaça e as vísceras na sua totalidade também deverão ser condenadas, para os fígados, consideram-se majoritariamente os aspectos visuais, que são cor, forma e tamanho do órgão.

Gomis et al. (2000) demonstraram que aves condenadas por celulite apresentaram uma combinação com outras lesões em coração, sacos aéreos, ossos, articulações e/ou fígado. Segundo Barcelos et al. (2006) no fígado são observadas alterações macroscópicas de

coloração, entretanto a principal alteração não residia somente na cor, mas no conjunto de alterações, envolvendo cor, forma e consistência. Dentre alterações microscópicas mais observadas destacaram-se a colangiohepatite multifocal e os infiltrados heterofílicos estendendo-se também pelo parênquima hepático. Os autores ressaltaram que muitas lesões hepáticas não são específicas quanto à etiologia, mas fornecem informações importantes sobre a ocorrência de doenças sistêmicas.

Em seu estudo com 45 frangos de corte condenados por colibacilose no Rio Grande do Sul, Casagrande (2013) também observou que as principais lesões histológicas ocorreram no fígado. Entretanto Silva et al (2012) analisaram 30 amostras de fígados de frango macroscopicamente inalterados na Bahia e observaram a presença de *Escherichia coli* em 18 amostras dos fígados analisados, sendo que todos os órgãos comestíveis foram oriundos de dois matadouros inspecionados e iriam ser liberados para consumo.

São escassos estudos que correlacionem às lesões macroscópicas de causa infecciosa observadas em frangos de corte com a caracterização histológica e o isolamento do patógeno nos órgãos lesionados. Casagrande (2013) elucida que essa correlação é de extrema importância para que se estime o real impacto dos agentes infecciosos como causa de condenação de carcaças.

Assim, considerando a necessidade de aprofundar o conhecimento acerca das características anátomo-histopatológicas do processo infeccioso causado pela bactéria *Escherichia coli* em fígados de frango oriundos de carcaças com lesões de celulite, objetivou-se neste trabalho caracterizar os aspectos anátomo-histopatológicos de fígados de frangos, relacionando os achados à presença ou ausência de *Escherichia coli*.

Material e Métodos

No período de agosto de 2013 a janeiro de 2014, foram coletadas 100 amostras de fígados de frangos (*Gallus gallus*) que apresentavam lesões de celulite, na linha de abate de um matadouro avícola do Recôncavo Sul baiano, sob fiscalização da Agência de Defesa Agropecuária da Bahia (ADAB). Além das amostras de fígados oriundas de carcaças com celulite, três amostras de fígados de frango sem alterações macroscópicas e provenientes de carcaças inalteradas também foram analisadas como controle negativo.

Para a avaliação das alterações macroscópicas dos fígados foram utilizados como parâmetros de descrição comprimento, largura, espessura, peso e coloração, além de observações da conformação e consistência da cápsula e, cor e aspecto do parênquima. Posteriormente todas as amostras foram fotografadas com uma câmera Olympus modelo E330. A análise anátomo-patológica foi realizada no Laboratório de Microbiologia do Núcleo de Segurança Alimentar e Nutricional (SANUTRI) do Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB).

As amostras dos fígados, removidas sempre de um mesmo lóbulo hepático, foram coletadas assepticamente com auxílio de material cirúrgico, imersas em solução de formol neutro tamponado a 10%, durante 24 horas. Em seguida, foram conservadas em solução de etanol a 70% até o processamento histológico. Após processamento de rotina e inclusão em parafina líquida (60 °C), os cortes (5 µm) foram realizados em micrótomo Leica RM2235 e corados em Hematoxilina e Eosina (H.E). As análises foram realizadas sob microscopia de luz e os resultados registrados com fotomicrografias (câmera Olympus modelo DP21) (microscópio Olympus modelo BX51).

Para pesquisa de *Escherichia coli*, as amostras foram coletadas assepticamente, transportados em caixa isotérmica com gelo, e, imediatamente após a coleta, foram enviadas ao Laboratório de Microbiologia da SANUTRI (CCS/UFRB). Para isolamento de *Escherichia*

coli foi utilizado o método rápido de contagem em placas Petrifilm™ (3M Company), utilizando a Placa Petrifilm EC™ (AOAC 998.8), conforme orientações do fabricante.

Os dados foram tabulados com o programa estatístico SPSS versão 20, sendo realizadas análises descritivas e testes estatísticos de normalidade, seguidos por análises de correlação não paramétrica de *Spearman* e testes comparativos (*Kruskal Wallis* e *Mann-Whitney U*) para avaliar a se havia diferenças significativas nas pontuações dos achados anátomo-histopatológicos de fígados de frangos contaminados, ou não, com *Escherichia coli* (Reidy & Dancey, 2013).

Resultados e Discussão

Escherichia coli foi isolada em 44% (44/100) dos fígados coletados, corroborando com Silva et al. (2012) que isolaram *Escherichia coli* em 45,50% (28/62) dos fígados de frango coletados em dois matadouros da Bahia. Por outro lado, Casagrande (2013) isolou *Escherichia coli* em 18,42% dos 45 frangos de corte analisados no Rio Grande do Sul.

Tabela 1 - Características macroscópicas de fígados de frangos com lesões de celulite coletados de matadouro avícola no Recôncavo da Bahia.

| Diagnóstico Macroscópico | | Com <i>E. coli</i> | Sem <i>E. coli</i> |
|--------------------------|-----------------------|--------------------|--------------------|
| | | n= 44 | n=56 |
| Comprimento Médio | | 6,45 cm | 6,54 cm |
| Largura Média | | 3,74 cm | 3,65 cm |
| Espessura Média | | 2,37 cm | 2,19 cm |
| Peso Médio | | 52,84 g | 49,82 g |
| Coloração | Castanho escura | 14 (31,81%) | 19 (33,90%) |
| | A. áreas pardas | 17 (38,63%) | 21(37,50%) |
| | A. áreas esverdeadas | 4 (9,09%) | 7 (12,50%) |
| | A. áreas enegrecidas | 0 (0,00%) | 1 (1,80%) |
| | A. áreas avermelhadas | 4 (9,09%) | 2 (3,60%) |
| | Pardo | 5 (11,36%) | 6 (10,70%) |
| Cápsula | Lisa | 43 (97,72%) | 55 (98,21%) |
| | Hemorrágica e friável | 1 (2,28%) | 1 (1,79%) |
| Consistência | Elástica | 39 (88,63%) | 52 (92,86%) |
| | Friável | 5 (11,37%) | 2 (7,14%) |
| Cor do parênquima | Acastanhado | 34 (72,27%) | 46 (82,14%) |
| | Pardo | 10 (22,73%) | 10 (17,86%) |
| Aspecto do parênquima | Compacto | 44 (100,00%) | 55 (98,21%) |
| | Friável | 0 (0,00%) | 1 (1,79%) |

A.- Acastanhada

O peso dos fígados variou de 36g a 84g, para os fígados contaminados com *Escherichia coli* e entre 28g a 60g para os órgãos isentos deste microrganismo, apresentando uma média de 52,84g e 49,82g, respectivamente.

O tamanho do fígado em relação à massa corpórea varia conforme o animal e no caso da galinha representa aproximadamente 2,7% do peso da carcaça. Neste estudo o peso dos fígados com isolados de *Escherichia coli* tiveram média de 2,79% do peso da carcaça, e

naqueles não contaminados com esta bactéria a média de 2,63% do peso das carcaças, observando-se percentuais semelhantes. É interessante lembrar que, segundo Santos et al. (2008), os fígados condenados se apresentam, na maioria das vezes, aumentados de volume, com coloração variando entre manchas avermelhadas intercaladas com áreas esverdeadas, amareladas e pálidas, mas ainda assim não permitem ao inspetor diagnóstico etiológico preciso.

De acordo com Silva et al. (2012) a coloração esperada para um fígado saudável é castanho escura, no presente estudo este achado foi encontrado em 14 (31,81%) e 19 (33,90%) das amostras com presença e ausência de *Escherichia coli*, respectivamente.

A coloração acastanhada com áreas pardas, a mais prevalente na presente pesquisa, foi encontrada em 38,63% (17/44) em fígados com isolados de *Escherichia coli* e em 37,50% (21/56) dos fígados onde não foram encontradas cepas de *Escherichia coli*. Resultados contrastantes foram encontrados por Supartika et al. (2007) que observaram fígados acastanhados com áreas pardas em apenas 3,56% (13/365) de frangos com doenças hepáticas na Holanda.

Fígados com áreas esverdeadas foram detectados em 9,09% das amostras contaminadas com *Escherichia coli* e em 12,50% daquelas que não produziram isolados de *Escherichia coli*. A coloração com áreas esverdeadas foi observada por Casagrande (2013) em 15,55% (7/45) dos fígados de carcaças de aves com colibacilose e por Barcelos et al. (2006) em 21,11% (19/90), ambos estudos realizados no Rio Grande do Sul.

Apesar de Brasil (1998) determinar que as alterações macroscópicas do fígado sejam critérios utilizados para descarte total das carcaças, é importante ressaltar que segundo Dey et al. (2003) a variação de coloração e peso dos fígados pode estar relacionada à alimentação, condições ambientais que podem oscilar durante o ano. Além disto, os estudos de Silva et al.

(2012) concluíram que a ausência de alteração na coloração no fígado não é garantia de que este não possui alteração microscópica ou isenção de patógenos.

As alterações na consistência do parênquima não foram percebidas em grande número de amostras no presente estudo, sendo constatada apenas uma amostra friável em um fígado isento de *Escherichia coli*. Já a coloração foi alterada em 22,73% dos fígados contaminados com *Escherichia coli* e em 17,86% das amostras isentas deste agente patogênico.

Os resultados das análises microscópicas estão sumarizados na Figura 1 e na tabela 2

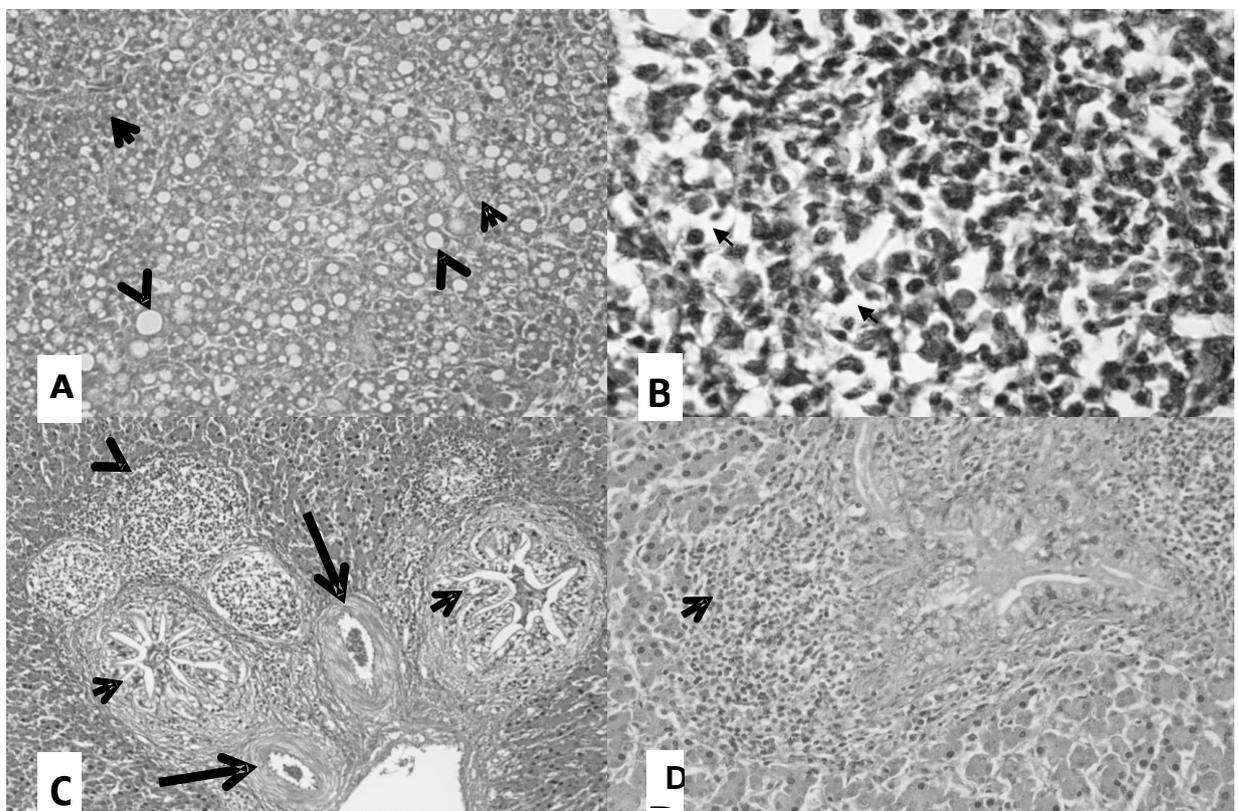


Figura 1 -. Fotomicrografia de fígados de frangos com lesões de celulite de matadouro do Recôncavo da Bahia. Observar em: A- Degeneração gordurosa macrovesicular (pontas de seta) e microvesicular (setas pequenas), aumento 400x; B- Área de necrose, aumento 1000x Apoptose (setas pequenas); C-Área portal com: Hiperplasia de ducto (setas pequenas) - Pericolangite heterofílica (cabeça de seta) - Hipertrofia dos músculos lisos das artérias (setas longas), aumento 200x; D- Infiltrado Mononuclear (seta pequena), 400x. Coloração H.E.

Tabela 2 Tabela 2 - Características microscópicas de fígados de frangos com lesões de celulite coletados de matadouro avícola no Recôncavo da Bahia.

| Diagnóstico microscópico | | Com <i>E. coli</i> | Sem <i>E. coli</i> |
|----------------------------|------------------|--------------------|--------------------|
| | | n= 44 | n=56 |
| Esteatose | Presença | 10 (22,73%) | 12 (21,43%) |
| | Ausência | 34 (72,27%) | 44 (78,57%) |
| Grau de esteatose | Leve | 2 (4,54%) | 3 (5,36%) |
| | Moderada | 2 (4,54%) | 2 (1,78%) |
| | Severa | 6 (13,63%) | 7 (15,64%) |
| Infiltrado | Presença | 44 (100,00%) | 56 (100,00%) |
| | Ausência | 0 (0,00%) | 0 (0,00%) |
| Tipo celular do infiltrado | Heterófilo | 15 (34,09%) | 11(19,64%) |
| | Mononuclear | 20 (45,45%) | 23 (41,07%) |
| | Misto | 9 (20,45%) | 22 (39,29%) |
| Intensidade do infiltrado | Leve | 24 (54,54%) | 31 (55,36%) |
| | Moderado | 16(36,36%) | 9 (16,07%) |
| | Severo | 3 (6,82%) | 14 (29,28%) |
| Localização do infiltrado | Pericolangite | 27 (61,36%) | 39 (69,64%) |
| | Colangiohepatite | 3 (6,81%) | 3 (5,36%) |
| | Misto | 14 (31,81%) | 14 (25,00%) |
| Necrose | Ausência | 35 (79,54%) | 44 (78,57%) |
| | Presença | 9 (20,45%) | 12 (21,43%) |
| Hiperplasia de ducto | Ausência | 12 (27,27%) | 12 (21,43%) |
| | Presença | 32 (72,73%) | 44 (78,57%) |
| Focos de infiltrado | Focal | 1 (2,28%) | 2 (3,57%) |
| | Multifocal | 43 (97,72%) | 54 (96,43%) |

A degeneração gordurosa, esteatose, foi observada em 22,73% das aves contaminadas com *Escherichia coli* e em 21,43% dos fígados não contaminados (Figura 1-A). Gesek et al.

(2013) sugerem em sua pesquisa com três linhagens diferentes de frangos de corte, que a degeneração gordurosa pode estar associada à seleção genética, a qual prioriza a conversão alimentar, ou relacionada à presença de infecções subclínicas, sendo esta última a mais provável no presente estudo, já que a seleção das carcaças obedeceu o critério da presença de lesões de celulite, que majoritariamente fazem parte de um processo infeccioso.

A necrose celular foi evidenciada em 20,45% dos fígados contaminados por *Escherichia coli* e em 21,43% dos órgãos que não estavam contaminados por este microrganismo (Figura 1-B). Dados contrastantes foram encontrados por Supartika et al. (2007) no qual foi evidenciada a presença de focos de necrose em 51,66% das amostras de fígados de frangos.

Neste estudo a pericolangite (Figura 1-C) foi observada em 61,36% dos fígados com isolados de *Escherichia coli* e em 69,64% dos fígados associados à ausência desse microrganismo. Em contraste, Barcelos et al. (2006) observaram este achado em apenas 9% dos fígados estudados com isolados de *Escherichia coli*.

No presente estudo a ocorrência de colangiohepatite foi de 6,81% para os fígados contaminados e 5,36% em fígados não contaminados por *Escherichia coli*, divergindo dos resultados encontrados por Silva et al. (2012) que observaram estas alterações em 25,92% dos fígados contaminados com *Escherichia coli*, respectivamente.

Os monócitos são as principais células fagocíticas do sangue das aves e são as precursoras do sistema mononuclear fagocítico podendo se fundir e formar células gigantes multinucleadas. Infiltrados mononucleares foram denotados em 41,07% das amostras que não isolaram *Escherichia coli* e em 45,45% das amostras infectadas (Figura 1-D) e Silva et al. (2012) demonstraram porcentagens menores (25,93%).

Infiltrados inflamatórios com presença de heterófilos foram notificados em 19,64% nas amostras de fígados sem a presença de *Escherichia coli* e em 34,09% dos fígados com

isolados de *Escherichia coli*. Resultados semelhantes foram revelados por Silva et al. (2012), que constataram a presença de heterófilos em 29,63%. Por outro lado, o mesmo tipo de processo inflamatório foi verificado em um percentual maior de amostras (56%) por Oliveira et al. (2014) em Minas Gerais, em seus estudos, com 100 fígados condenados na linha B de inspeção.

Resultados de testes estatísticos de normalidade *Kolmogorov-Smirnov* e *Shapiro-Wilk* indicaram que a distribuição das pontuações das variáveis descritoras de aspectos anátomo-histopatológicos dos fígados de frango desviava significativamente da distribuição normal padrão ao nível de $p < 0,05$ (Razali & Wah, 2011). Considerando os referidos resultados, bem como recomendações da literatura estatística (Reidy & Dancey, 2013), optou-se por realizar os testes de associação e de comparação por meio de estatísticas não paramétricas. Assim, por meio de análises de correlação de *Spearman* identificou-se que a única variável com associação significativa, ao nível de $p \leq 0,05$, com os grupos amostrais com e sem *Escherichia coli* foi o “Tipo celular do infiltrado” ($Rho [\rho] = -0,21$ e $p \leq 0,039$). Por seu turno, análises comparativas com o teste *Kruskal Wallis* indicaram diferenças significativas ao nível de $p \leq 0,05$ para a variável “Tipo celular do infiltrado” na comparação dos grupos amostrais classificados com e sem *Escherichia coli* ($\chi^2 = 4,231$; $p < 0,040$), conforme resultados sumarizados na Tabela 3.

Tabela 3. Tabela 3 - Resultados do teste *Kruskal Wallis* para comparação das pontuações das características macroscópicas e microscópicas para amostras com e sem isolamento de *Escherichia coli*.

| Variáveis | χ^2 | gl | p |
|----------------------------|----------|----|-------|
| Coloração | 0,172 | 1 | 0,678 |
| Aspecto da Cápsula | 0,035 | 1 | 0,851 |
| Consistência | 0,586 | 1 | 0,444 |
| Cor do parênquima | 0,435 | 1 | 0,509 |
| Aspecto do parênquima | 0,768 | 1 | 0,381 |
| Presença de esteatose | 0,047 | 1 | 0,829 |
| Grau de esteatose | 0,054 | 1 | 0,815 |
| Presença de infiltrado | 0,000 | 1 | 1,000 |
| Localização do infiltrado | 0,877 | 1 | 0,349 |
| Intensidade do infiltrado | 0,122 | 1 | 0,727 |
| Tipo celular do infiltrado | 4,231 | 1 | 0,040 |
| Necrose | 0,119 | 1 | 0,730 |
| Hiperplasia do ducto | 0,233 | 1 | 0,629 |
| Focos de infiltrado | 0,127 | 1 | 0,721 |
| Congestão de Sinusóides | 0,111 | 1 | 0,739 |
| Bilestase | 1,302 | 1 | 0,254 |

Para compreender melhor essas diferenças, foram realizados testes com a estatística *Mann-Whitney U*, avaliando-se, par a par, os tipos celulares dos infiltrados avaliados (Heterófilas x Mononucleares; Heterófilas x Mistas; Mononucleares x Mistas). Os resultados dessas análises comparativas são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Tabela 4 – Resultados de comparações pelo teste *Mann-Whitney U* para a variável “Tipo Celular do Infiltrado” comparação feita par a par (Heterófilas x Mononucleares; Heterófilas x Mistas; Mononucleares x Mistas).

| Tipo celular | N | Postos médios | Soma dos postos | Estatística | |
|---------------|----|---------------|-----------------|-----------------------|----------|
| | | | | <i>Mann-Whitney U</i> | <i>p</i> |
| Heterófilas | 26 | 36,54 | 913,50 | 486,500 | 0,454 |
| Mononucleares | 43 | 33,31 | 1.432,50 | | |
| Heterófilas | 26 | 32,68 | 817,00 | 283,000 | 0,043 |
| Mistas | 31 | 25,13 | 779,00 | | |
| Mononucleares | 43 | 40,21 | 40,21 | 1729,00 | 0,131 |
| Mistas | 31 | 33,74 | 33,74 | | |

Conforme os resultados apresentados na Tabela 4 foram identificadas diferenças significativas ao nível de $p \leq 0,05$ apenas para a contagem das células heterófilas e mistas ($U = 283,000$; $p \leq 0,043$). Desse modo, ao avaliar as contagens dessas células nos grupos amostrais com e sem *Escherichia coli*, é possível compreender que a contagem de células heterófilas no grupo “com *Escherichia coli*” (n=15) foi significativamente maior que a contagem dessas células no grupo “sem *Escherichia coli*” (n=11). Já para as células mistas, o grupo “com *Escherichia coli*” apresentou contagem significativamente inferior (n=9) na comparação com o grupo “sem *Escherichia coli*” (n=22) (Reidy & Dancey, 2013).

Os heterófilos representam as primeiras células a migrarem para o sítio inflamatório e atuam de forma semelhante aos neutrófilos dos mamíferos, apresentando núcleo segmentado (dois a três lóbulos), com heterocromatina, formando massa densa. Seus grânulos citoplasmáticos específicos são elípticos e esféricos de coloração acidófila e a presença deste tipo celular pode representar infecções bacterianas recentes. Por outro lado, apesar dos heterófilos serem a principal linha de defesa contra os microrganismos nas aves, pode ocorrer redução da atividade fagocitária em situações de estresse, portanto a ausência destas células não indica, necessariamente, ausência de agentes infecciosos (Spinu et al., 1999).

Foi observada hiperplasia do ducto biliar em 72,73% dos fígados com isolados de *Escherichia coli* e em 78,57% dos órgãos isentos desta bactéria (Figura 01). Resultados contrastantes foram obtidos por Silva et al. (2012), que observaram esta alteração em 33,33% (9/27) dos fígados de frangos com isolados de *Escherichia coli*.

Três amostras de fígados de frango sem alterações macroscópicas e provenientes de carcaças com ausência de celulite também foram analisadas como controle negativo. Essas lâminas apresentaram infiltrados inflamatórios de grau leve, sendo os heterófilos o tipo celular predominante. Hiperplasia de ducto (2/3), esteatose (1/3) e colangiohepatite (1/3) e pericolangite (1/3) também foram observadas. Apesar da presença de alterações microscópicas observadas no tecido hepático dos animais utilizados como controle, percebeu-se que a intensidade das lesões era bastante discreta quando comparada a das amostras de fígados de frangos com celulite.

Considerações Finais

No que se refere aos achados das alterações macroscópicas e microscópicas, o tipo celular do infiltrado, representado pela presença de heterófilos nas amostras com isolamento de *Escherichia coli*, foi a única alteração cujos achados apresentaram diferença estatisticamente significativa entre as amostras contaminadas e as não contaminadas com *Escherichia coli*, podendo ser utilizada como um critério para caracterizar histologicamente infecções por este patógeno em fígados de frangos.

Por outro lado as outras alterações microscópicas, com exceção do tipo celular dos infiltrados inflamatórios, não variaram entre os fígados contaminados com *Escherichia coli* e os não contaminados. Desta forma, baseados nos dados deste estudo, estes não podem ser utilizadas como critérios diferenciais no diagnóstico histopatológico de infecções por este patógeno nos fígados de frangos.

Apesar de não permitirem diagnóstico do agente etiológico e de nem sempre estarem relacionadas a um processo infeccioso, as alterações macroscópicas do fígado devem continuar sendo utilizadas como critério de descarte total de carcaças, pois reduz o risco de fornecer alimentos inseguros ao consumidor.

Também são necessários estudos incluindo outros patógenos, comparações entre fígados oriundos de aves sem lesões de celulite e com lesões de celulite, além de pesquisas com inoculação de *Escherichia coli* causadora de celulite para verificação da etiopatogenia desta infecção.

Por fim, as análises microbiológicas e histopatológicas devem ser incluídas nas rotinas da inspeção sanitária da produção de carne de aves, oferecendo maior confiabilidade nos critérios de descarte de carcaças, permitindo o acompanhamento mais acurado das condições sanitárias em todo o processo produtivo, da criação ao abate, e, sobretudo, garantindo maior segurança na produção dos alimentos.

Agradecimentos

A Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública pelo auxílio nas análises histopatológicas.

Referências

ANDRADE, C. L.; FERREIRA, G.B.; FRANCO, R.M.; NASCIMENTO, E.R.; TORTELLY, R. Alterações patológicas e identificação da *Escherichia coli* como agente causal da celulite aviária em frangos de corte inspecionados em um matadouro de São Paulo. **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias**, v. 13, n. 3, p. 139-143, set-dez. 2006.

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 (MAPA). Portaria nº 210, de 10 de novembro de 1998. **Regulamento Técnico da Inspeção Tecnológica e Higiênico-Sanitária de Carne de Aves**. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 10 de novembro de 1998.

CASAGRANDE, R.A. Caracterização anatomopatológica, imuno-histoquímica e molecular de doenças infecciosas em aves de produção e ornamentais. 2013. 86f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação, Porto Alegre.

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.

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.

GESEK, M.; SZAREK, J.; OTROCKA-DOMAGALA, I.; BABINSKA, I.; PAZDIOR, K.; SZWEDA, M.; ANDRZEJEWSKA, A.; SZYNAKA, B. Morphological pattern of the livers of different lines of broiler chickens during rearing. **Veterinarni Medicina**, v. 58, n. 1, p. 16-24, 2013.

GHANBARPOUR, R.; SALEHI, M.; OSWALD, E. Virulence genotyping of *Escherichia coli* isolates from avian cellulitis in relation to phylogeny. **Comparative Clinical Pathology**, Londres, v.19, p.147-153, 2010.

GOMIS, S.M.; GOMIS, A. I. U.; HORADAGODA, N. U.; WIJEWARDENE, T.G. ; ALLAN, B.J. ; POTTER A.A. Studies on Cellulitis and Other Disease Syndromes Caused by *Escherichia coli* in Broilers in Sri Lanka. **Tropical Animal Health and Production**, v. 32, p. 341-351, 2000.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Indicadores IBGE. Apresenta: Estatística da Produção Pecuária em 2014 Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abat-e-leite-couro-ovos_201404_publ_completa.pdf>. Acesso em: 05 jun. 2015.

OLIVEIRA, F.R.; MACHADO, F.M.E.; COELHO, H.E. Estudo anatomopatológico de fígados que levam a condenação total de carcaça, na linha de inspeção, durante o abate de frangos de corte (*Gallus gallus domesticus*) na região do Triângulo Mineiro. **PUBVET**, Londrina, v. 8, n. 2, 2014. Disponível em: http://www.pubvet.com.br/artigos_det.asp?artigo=1550. Acesso em: 06 jul. 2015.

RAZALI, N. M.; WAH, Y. B. Power comparisons of Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov, Lilliefors and Anderson-Darling tests, **Journal of Statistical Modeling and Analytics**. v. 2, n. 1, p. 21-33, 2011.

REIDY, J.; DANCEY, C. **Estatística sem Matemática para Psicologia**. Rio de Janeiro: Penso-Artmed, 2013.

SANTOS, B.M.; MOREIRA, M.A.; DIAS, C.C.A. **Manual de Doenças Avícolas**. Viçosa, MG: Ed. UFV, 2008. p. 224.

SILVA, I.M.M.; BALIZA, M.; SANTOS, M.P.; REBOUÇAS, L.T.; ROCHA, E.V.S.; SANTOS, V.A.; SILVA, R.M.; EVÊNCIO-NETO, J. Presença de *Escherichia coli* em fígados de frangos provenientes de matadouros avícolas. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v. 13, n. 3, p. 694-700 jul./set., 2012.

SPINU, M.; SPINU, A.; DEJEN, A.. Haematological and immunological variables in a domesticated and wild subspecies of ostrich (*Struthio camelus*). **British Poultry Science**, v. 40, n. 5, p.613-618, 1999.

SUPARTIKA, I.K.; STROOM-KRUYSWIJK, J.H.V.D.; TOUSSAINT, M.J.; GRUYS, E. Necrotizing granulomatous hepatitis in slaughtered broilers. **Avian Diseases**, v. 51, n. 2, p. 632-638, 2007.

VIEIRA, T.B.; PEREIRA, V.L.A.; FRANCO, R.M.; NASCIMENTO, E.R.; SILVA, R.C.F.; TORTELLY, R. Potencial patogênico e caráter séptico de *Escherichia coli* pela identificação dos fatores de virulência *iss* e *felA* em celulite e miúdos de frangos sob Inspeção Sanitária. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 36, n .2, p.144-152, abr.-jun., 2014.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Baseado nos resultados desta pesquisa e na revisão da literatura existente fica clara a necessidade de revisão, implementação e fiscalização de novas práticas sanitárias em todo o processo produtivo das carnes e derivados de aves. As práticas precisam ser revistas, desde o manejo dos frangos nos aviários, principalmente na forma como as camas são utilizadas e reutilizadas, até as ações da inspeção sanitária.

Não se trata de afirmar que este estudo irá exaurir a necessidade de novas pesquisas, mas, corroborando com muitos autores, comprova a urgente necessidade de quebrar paradigmas e de voltar às atenções para aspectos que aparentemente estão consolidados ou isentos de necessidade de revisão.

É necessário um programa permanente de extensão rural e fiscalização dos aviários, haja vista a alta prevalência de *Escherichia coli* nas amostras de ambiente e insumos, como também nas lesões de celulite e fígados dos frangos avaliados.

A comprovada correlação entre a presença de *Escherichia coli* isolada nas amostras de camas e nas lesões de celulite das aves retiradas das linhas de abate em um matadouro do Recôncavo da Bahia pode estar relacionada à prática usual de reutilização indiscriminada das camas nos aviários, pondo em risco a manutenção da posição do Brasil no mercado mundial de carne e produtos avícolas e à saúde dos consumidores.

Considerando a presença de genes de virulência de *Escherichia coli* nos fígados e lesões de celulite, outro aspecto a ser revisto é a utilização da lesão de celulite como um critério de descarte parcial de carcaças de frango. A aceitação deste sinal clínico como um processo infeccioso local, na maioria das vezes, permite que alimentos sanitariamente inseguros sejam liberados para o consumo e, de acordo com a competência imunológica dos comensais, pode propiciar o surgimento de infecções alimentares de níveis de gravidade diversos.

Desta forma, sugere-se a revisão nos critérios de descarte de carcaças nas linhas de inspeção nos matadouros avícolas, como também a inclusão de análises microbiológicas e histopatológicas dos produtos finais e o controle da qualidade dos insumos produtivos, pois ficou evidenciado que a presença de heterófilos nos

tecidos hepáticos pode ser considerada como critério característico de infecção por *Escherichia coli*.

Por fim evidenciou-se a necessidade de mais pesquisas, pois *Escherichia coli*, assim como outros patógenos, estão em constante evolução e modificam suas relações com seus hospedeiros, se adaptam a outros, criam alternativas de sobrevivência a antigas e novas ameaças, demandando vigilância e pesquisas constantes de todos os envolvidos com a avicultura industrial.