

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E
BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE MESTRADO

Caracterização fenotípica e genotípica de *Escherichia coli*
proveniente de lesões de celulite de frangos de corte

RICARDO MENDES DA SILVA

CRUZ DAS ALMAS-BAHIA
MARÇO - 2011

**Caracterização fenotípica e genotípica de *Escherichia coli*
proveniente de lesões de celulite de frangos de corte**

RICARDO MENDES DA SILVA

Médico Veterinário

Universidade Federal da Bahia, 2008

Dissertação submetida ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Ciência Animal.

Orientadora: Ludmilla Santana Soares e Barros

Co-Orientadora: Isabella de Matos Mendes da Silva

Co-Orientador: Marcílio Delan Baliza Fernandes

CRUZ DAS ALMAS – BAHIA
MARÇO – 2011

FICHA CATALOGRÁFICA

S586	<p>Silva, Ricardo Mendes da.</p> <p>Caracterização fenotípica e genotípica de <i>Escherichia coli</i> proveniente de lesões de celulite de frangos de corte / Ricardo Mendes da Silva. - Cruz das Almas-Ba, 2011. 54f.; il.</p> <p>Orientadora: Ludmilla Santana Soares e Barros.</p> <p>Co-orientadores: Isabella de Matos Mendes da Silva e Marcílio Delan Baliza.</p> <p>Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas.</p> <p>1.Frango de corte - Microbiologia. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. Centro de Ciências</p>
------	---

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECONCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIENCIAS AGRARIAS AMBIENTAIS E
BIOLOGICAS
PROGRAMA DE POS - GRADUACAO EM CIENCIA ANIMAL
CURSO DE MESTRADO

COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE
RICARDO MENDES DA SILVA

Profa Dra. Ludmilla Santana Soares e Barros
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
(Orientadora)

Prof. Dr. Ricardo Duarte Abreu
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

Prof. Dr. Ferlando Lima Santos

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA
MARÇO – 2011
DEDICATÓRIA**

A minha esposa e filha, as melhores companhias que um homem pode ter e para quem eu sempre recorro quando minhas forças começam a se esvair pois o amor e a paixão são inesgotáveis fontes e energia.

E para meus pais, que sempre estiveram e sempre estarão ao meu lado, independente de presença física.

AGRADECIMENTOS

A Deus e toda as forças positivas do universo, que permitiram que chegasse este momento.

A minha orientadora Professora Ludmilla Santana Soares e Barros, que muito colaborou, sempre de forma clara, positiva, honesta e carinhosa.

Aos meus Co-orientadores Professora Isabella de Matos Mendes da Silva e Professor Marcílio Delan Baliza Fernandes pela motivação, conhecimento e segurança que me transmitiram.

A Professora Fernanda de Freitas Virginio Nunes pelo seu apoio no isolamento das bactérias e pelos conselhos e dicas.

Ao Professor Jorge Teodoro de Souza pelo apoio durante a caracterização molecular.

Aos professores pelo conhecimento que me passaram, para que possa exercer a minha profissão da melhor forma possível.

Aos mestres pelo conhecimento e exemplo, para que possa exercer a minha cidadania da melhor forma possível.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	01
2	OBJETIVOS	03
3	REVISÃO DE LITERATURA	03
3.1	CONSIDERAÇÕES SOBRE A AVICULTURA NO MUNDO, NO BRASIL E NA BAHIA	03
3.2	A INSPEÇÃO SANITÁRIA NOS MATADOUROS AVÍCOLAS	06
3.3	ASPECTOS ANÁTOMO-HISTOFISIOLÓGICOS DO TECIDO CUTÂNEO E SUBCUTÂNEO DOS FRANGOS	10
3.4	ETIOPATOGENIA DA CELULITE AVIÁRIA	11
3.5	RELAÇÃO ENTRE MANEJO SANITÁRIO DO AVIÁRIO E A QUALIDADE DA PELE DAS CARÇAÇAS	12
3.6	CONSIDERAÇÕES SOBRE A ETIOPATOGENIA DA CELULITE AVIÁRIA POR <i>ESCHERICHIA COLI</i>	14
3.6.1	<i>ESCHERICHIA COLI</i> EM AVES	14
3.6.2	<i>ESCHERICHIA COLI</i> COMO AGENTE ETIOLÓGICO DA CELULITE AVIÁRIA	20
3.7	CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE <i>ESCHERICHIA COLI</i>	21
4	REFERÊNCIAS	25
5	CAPÍTULO 1	39

5.1	CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> PROVENIENTE DE LESÕES DE CELULITE DE FRANGOS DE CORTE	40
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	48
	ANEXO A	50

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE *ESCHERICHIA COLI* PROVENIENTE DE LESÕES DE CELULITE DE FRANGOS DE CORTE

Autor: Ricardo Mendes da Silva

Orientadora: Ludmilla Santana Soares e Barros

Co-orientadores: Isabella de Matos Mendes da Silva e Marcílio Delan Baliza Fernandes

RESUMO: Coletaram-se, de forma asséptica 40 amostras de lesões de celulite de frangos provenientes de matadouro avícola localizado no Recôncavo da Bahia para a caracterização fenotípica e genotípica de *Escherichia coli*. Os animais deste estudo foram oriundos de quatro aviários localizados na mesma região, pesavam entre 1.050g a 2.867g e 90% eram isentos de patologia associada à celulite. Observou-se caquexia em dois frangos, sendo um caso de pericardite e outro de contusão. O peso das lesões de celulite variou de 0,9 a 1,7g e 85% destas estavam no lado esquerdo do abdômen dos frangos. *Escherichia coli* foi isolada em 82,5% das amostras por meio de método rápido de contagem por placas Petrifilm™ (3M Company). Utilizou-se a Reação em Cadeia de Polimerase para verificação do gene de resistência sérica (*iss*), identificando, assim, *E. coli* patogênica para aves (APEC). Identificou-se *iss* em 87,9% dos isolados. Com os resultados deste trabalho ficou clara a necessidade da revisão do manejo nos aviários, de estudos que confirmem a presença de APEC nos alimentos e do seu potencial zoonótico e da

intensificação da fiscalização nos matadouros, a fim de se evitar o surgimento e a liberação, para consumo, de aves com lesões de celulite.

Palavras-chave: Infecção; caracterização bacteriana; avicultura; APEC.

FENOTIPICAL AND GENOTIPICAL CHARACTERIZATION OF *ESCHERICHIA COLI* FROM CELLULITIS LESIONS IN BROILERS.

Autor: Ricardo Mendes da Silva

Orientadora: Ludmilla Santana Soares e Barros

Co-orientadores: Isabella de Matos Mendes da Silva e Marcílio Delan Baliza Fernandes

ABSTRACT: Were collected aseptically 40 samples from lesions of chickens from poultry slaughterhouse located in Bahia Recôncavo for phenotypic and genotypic characterization of *Escherichia coli*. The animals of this research were from four poultry houses located in the same region, weighed 1.050 g 2.867 g 90% were free of pathology associated with cellulitis. Cachexia observed in two chickens, one case of pericarditis and another injured. The weight of the cellulitis lesions ranged from 0.9 to 1.7 g and 85% of these were on the left side of the abdomen of chickens. *Escherichia coli* was isolated in 82.5% of samples by means of a rapid method for counting by Petrifilm™ plates (3M Company). Was used the Polymerase Chain Reaction (PCR) for verification of the gene of serum resistance (iss), identifying Avian Pathogenic, *E. coli* (APEC). Iss was detected in 87.9% of isolates. The results of this study showed a clear need for the revision of management in the aviaries, more studies that confirm the presence of APEC in food and its zoonotic potential and the intensification of surveillance in slaughterhouses in order to prevent the emergence and liberation, to consumption of birds with cellulitis lesions.

Key-words: Infection; bacterial characterization; aviculture, APEC

1 INTRODUÇÃO

Com uma população se aproximando dos 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 as 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, 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 SEAGRI (2008).

O consumo de carne de frango vem aumentando em todo o mundo e a elevação da oferta, que vem atendendo a essa crescente demanda, deve-se a alguns fatores como: melhoramento genético mais veloz, visto que a distância entre gerações é muito pequena se comparada com outras criações; estudos aprofundados sobre nutrição e convertibilidade, desenvolvendo dietas especiais para várias etapas da vida destes animais, o que os torna extremamente eficientes ao transformar alimento em massa corpórea; gestão e processamento de todas as etapas da produção, com auxílio tecnológico intenso e aperfeiçoamento no manejo operacional e sanitário dos rebanhos, desde a postura até o abate e comercialização (ABEF, 2009), entretanto, como em qualquer atividade que se expande e se intensifica, a avicultura, em especial a industrial, tem novos desafios, como atender vários povos, com peculiaridades culturais e geográficas diversas e sempre com elevados níveis de excelência em qualidade de produtos, em diversos aspectos, sendo o sanitário o mais básico e importante de todos.

Infecções causadas por *Escherichia coli* são responsáveis por prejuízos econômicos na indústria avícola, sendo a colibacilose frequentemente associada à mortalidade embrionária e do plantel, pior conversão alimentar, menor desenvolvimento corpóreo e custos com medicamentos, além do aumento da condenação de carcaças devido às lesões por colisepticemia (ANDREATTI FILHO, 2006).

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

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

Observou-se um crescente aumento das perdas na indústria avícola com a condenação total ou parcial das carcaças por conta das dermatites, sobretudo causadas pelas celulites (ELFADIL, VAILLANCOURT e MEEK, 1996; ONDERKA et al., 1997). Somente nos Estados Unidos estima-se uma perda anual superior a 80 milhões de dólares (NORTON e HESS, 1999). No Canadá estima-se que a celulite aviária é responsável pela condenação de 1,2% dos frangos de corte abatidos (KUMOR et al., 1998). No Brasil as perdas por condenação no abate, atingem uma soma de 10 milhões de dólares (BRITO e TAGLIARI, 2000).

Santana et al (2008) afirmam que a celulite pode ser considerada como uma das mais importantes causas de condenação da carne de frango em todo o mundo, gerando interesses em termos econômicos por conta das perdas financeiras impostas aos produtores, (VAILLANCOURT e BARNES, 2003) corroboram quando afirmam que a celulite é um processo infeccioso que emergiu como uma patologia aviária de relevância financeira por conta do crescimento do número de condenações de carcaças, da redução da qualidade do processamento industrial e pelo aumento dos custos relativos às condenações parciais e ao reprocessamento das carcaças afetadas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Verificar a ocorrência de *Escherichia coli* em amostras de lesões de celulite em frangos provenientes de matadouro avícola do Recôncavo da Bahia.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Verificar a ocorrência de *Escherichia coli* em amostras de lesões de celulite em frangos provenientes de matadouro avícola do Recôncavo da Bahia.

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

3 REVISÃO DE LITERATURA

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

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

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

O consumo mundial de frango deverá provavelmente crescer nos próximos anos mais do que a demanda por carne suína e até a bovina. A

principal razão é que a carne de aves vai continuar sendo a mais barata, uma vez que os preços recordes das rações elevarão ainda mais o preço da carne vermelha, acredita Robert Feldman, chefe de pesquisa econômica do Morgan Stanley, em Tóquio (MONTTOYA e FINAMORE, 2006).

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

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

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

o que garante um valor agregado à carne (NAAS, 2002), haja vista que a rastreabilidade é hoje um pré-requisito para os sistemas de segurança alimentar, permitindo, por exemplo, conhecer a origem dos ingredientes de um produto, assim como o caminho e o destino desse produto final, facilitando a identificação e segregação de lotes de produtos ou populações de animais afetados (MAIA e DINIZ, 2009).

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

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

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

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

3.2 A INSPEÇÃO SANITÁRIA NOS MATADOUROS AVÍCOLAS

De acordo com França (2007), produzir alimentos seguros é premissa fundamental, não constituindo diferencial de mercado, uma vez que atender

aspectos relacionados à presença de patógenos e resíduos associados à carne de frango é condição determinante da participação no comércio internacional. Assim, a elevação dos níveis de controle e prevenção da contaminação em todos os pontos da cadeia produtiva é fundamental para o futuro do negócio da avicultura, pois o mercado nacional, e, sobretudo o internacional, exigem que toda a cadeia produtiva atinja padrões de segurança sanitária elevados.

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

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

velocidade de abate ficará condicionada a perfeita execução dos trabalhos de inspeção. As carcaças que não atendem ao padrão são desviadas para o Departamento de Inspeção.

Especificamente sobre a pele, Gomide, Ramos e Fontes (2006) afirmam que, durante a inspeção, o inspetor deve observar o aspecto da ave em geral, verificando: a coloração da pele e o seu estado de integridade, o cheiro e a consistência da musculatura.

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

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

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

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. Realiza-se a visualização das superfícies externas na linha C e a presença de celulite é considerada causa de apreensão total ou parcial da carcaça, a depender do número e localização das lesões (BRASIL, 1952; BRASIL, 1998).

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

bacteriológico. Andreatti Filho (2006) cita que o laboratório é uma ferramenta auxiliar para os técnicos na prevenção, no diagnóstico e no tratamento de doenças. O autor ressalta que os dados são importantes para proporcionar informações epidemiológicas para definição de fontes comuns de infecção.

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. O custo de produção total dos frangos no período de estudo foi de aproximadamente 159,4 milhões de reais, e as perdas econômicas em decorrência das condenações foram de aproximadamente 3,7 milhões de reais.

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

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

Carvalho, Costa e Carvalho (2002) elaboraram um plano APPCC em uma linha de produção de frango inteiro congelado, de uma indústria avícola situada no Estado do Rio de Janeiro e concluíram com a determinação de 5 (cinco) Pontos Críticos de Controle (PCC) biológicos, nas etapas de pré-resfriamento da moela, do fígado, coração e nas etapas de pré-resfriamento das carcaças no primeiro e segundo estágio. Salienta-se que na análise dos

perigos biológicos a *E. coli* patogênica foi citada em todas as etapas do processo. O sistema APPCC passou a ter base legal no Brasil com a Portaria 46 de 10/02/1998, do MAPA (FRANÇA, 2007).

Para aumentar a qualidade dos produtos das indústrias cadastradas no Serviço de Inspeção Estadual (SIE), de modo a garantir segurança alimentar para a população e acesso dos produtores a mercados competitivos, a Bahia aderiu ao Sistema Brasileiro de Inspeção de Produtos de Origem Animal (SISBI/POA) do MAPA. Parte do processo para adequação dos estabelecimentos do sistema estadual ao SISBI, a Portaria nº 290/2008, reitera a importância da aplicação das BPFs. Os estabelecimentos que optarem pela adesão ao SISBI/POA deverão obrigatoriamente possuir sistema de BPF previamente implantado. A não implantação das BPFs no prazo estabelecido implicará no cancelamento do registro de estabelecimentos junto ao SIE (BAHIA, 2008).

Fallavena et al. (2000) concluíram que as alterações cutâneas macroscópicas em carcaças de frangos de corte não são específicas, e não permitem classificação correta das doenças de pele encontradas na linha de processamento nos matadouros frigoríficos. Neste contexto, há possibilidade de erro sistemático em interpretação dos dados estatísticos da condenação e mais critérios adequados para os serviços de inspeção seriam úteis. Gomis et al. (2000) afirmam que, a *Escherichia coli* foi isolada de lesões de celulite em mais de 90% das aves. Isto enfatiza a possibilidade de contaminação cruzada na linha de processamento onde as lesões de celulite estão expostas, por conseguinte, a condenação de carnes e vísceras impróprias para o consumo visa zelar pela saúde pública, uma vez que a carne de frango e seus subprodutos são uma das mais importantes fontes de enfermidades transmitidas por alimentos (JAY, 2005).

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

Como em todas as espécies domesticadas, a pele reveste todo o corpo dos frangos sendo que Berchieri Junior e Marcari (2000) afirmam que em comparação com outros vertebrados, a pele das aves é fina e flexível e com

uma estrutura mais delicada e segundo Marcari, Furlan e Gonzales (2002) a pele da ave é fina e flexível na maior parte do corpo, normalmente possui de quatro a sete células de espessura, complementando Dice, Sack e Wensing (2004) reiteram afirmando que a pele é fina e solta, rompendo-se facilmente; porém sendo mal suprida de vasos e nervos, os ferimentos não sangram tanto como nos mamíferos. De acordo com Olkowski et al (2005), o pH da superfície da pele nos frangos de corte é de aproximadamente $7,52 \pm 0,45$.

Como um sistema de defesa com muitas características únicas a pele se constitui em uma notável primeira linha de defesa contra a invasão bacteriana. (OLKOWSKI et al., 2005). Benez (2004) afirma que a estrutura da pele constitui em sua totalidade dos seguintes elementos: epiderme, derme e o tecido de sustentação (conjuntivo), onde 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).

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

Na derme encontram-se o tecido adiposo, grandes vasos sanguíneos, vasos linfáticos, nervos (principalmente associados aos folículos das penas), musculatura e a base dos folículos das penas (BENEZ, 2004).

A derme é separada do tecido subcutâneo através de uma camada de fibras elásticas. O tecido subcutâneo é formado por feixes de colágeno e gordura. (PASS, 1996)

A ave não possui glândulas na pele, além da uropígea, localizada na base da cauda. Os queratinócitos aviários (seboqueratinócitos) são os únicos que produzem secreções lipídicas que protegem a pele auxiliando na impermeabilização, evitando o ressecamento, produzindo ação antifúngica e antibacteriana (BENEZ, 2004).

Marcari, Furlan e Gonzales (2002) ressaltam que por conta da fina espessura da pele dos frangos, vários fatores como deficiência nutricional,

substâncias irritantes, toxinas, infecções e problemas de manejo podem potencialmente levar lesões cutâneas. Em estudo comparativo, Olkowski et al (2005) descobriram que quando defrontado com Leghorns, o estrato córneo em frangos de corte aparece esparso, frouxamente organizado e fragmentado e com menor número de células no estrato germinativo. Além disso, os elementos celulares da derme superior em frangos apareceram esparsos. A camada da derme é, aparentemente, mais estreita, com estruturas de tecido conjuntivo mal definidas, mal representadas e com fibras colágenas irregularmente distribuídas.

3.4 ETIOPATOGENIA DA CELULITE AVIÁRIA

Celulite aviária é termo utilizado para a inflamação aguda do tecido subcutâneo (ODERKIRK, 1997). Geralmente está localizado na região ventral do abdome e da coxa (ALLAN, 2010; ODERKIRK, 1997), com tendência a ser unilateral (MESSIER et al.) , 1993; ELFADIL et al., 1996) É caracterizada pela presença de exsudato purulento, espessamento da derme e formação de placas fibrino-caseosas subcutâneas (NORTON, BILGILI e McMURTREY, 1997; JEFREY, CHIN e SINGER, 1999). Planos teciduais são separados, e o tecido muscular adjacente pode estar envolvido (MESSIER et al., 1993).

As aves afetadas parecem grandes, saudáveis e com crescimento normal, mas exibem placas caseosas sob a pele, vistas somente no processamento das mesmas. Isto faz com que a celulite seja quase imperceptível de se identificar antes do abate, pois geralmente requer a visualização do tecido subcutâneo. Apesar de não haver sinais clínicos associados com a celulite em aves vivas, a presença da lesão resulta na condenação de parte ou a totalidade da carcaça durante a inspeção *post mortem* (MESSIER et al. , 1993; ELFADIL, VAILLANCOURT e MEEK, 1996; GOMIS et al. 2000). Já as aves com outras doenças concomitantes, pericardite, aerossaculite, osteomielite, poliserosite, artrite, ou hepatite, apresentam-se pequenas e com musculatura pouco desenvolvida (GOMIS et al., 1997). As condenações por celulite são maiores em lotes com problemas sanitários, como ascite, aerossaculite, peritonite e pericardite (KUMOR et al., 1998).

Em contraste, Gomis et al. (2000) citam que a razão para a ausência de *Escherichia coli* no pericárdio, sacos de ar, fígado e poliserosite lesões de aves com lesões graves nesses órgãos não é totalmente clara, mas é possível que as aves sejam capazes de conter a infecção completamente, enquanto depósitos fibrinosos inflamatórios persistem.

Amostras de *Escherichia coli* são isoladas nos locais lesados 100% de aves inoculadas com amostras de *E. coli* isoladas de casos de celulite, desenvolvem placas fibrinocaseosas características (ANDREATTI FILHO, 2006) e Peighambari et al. (1995) afirmam que as lesões de celulite são mais comuns e relevantes quando ocorrem no abdômen e sobrecoxas.

3.5 RELAÇÃO ENTRE MANEJO SANITÁRIO DO AVIÁRIO E A QUALIDADE DA PELE DAS CARÇAÇAS

Segundo Elfadil et al. (1996) a celulite é uma patologia de causa multifatorial e está ligada a fatores ambientais, densidade populacional no galpão, com ocorrência de traumatismos (arranhões), pela competição (restrição alimentar) e seleção genética. Schrader, Singer e Atwill, (2004) declaram que é provável que a maioria das lesões de celulite observadas durante o processamento tenha iniciado durante a fase de crescimento. Os dados da pesquisa de Norton, Macklin e McMurtrey (2000) reforçam a hipótese de que a celulite é resultado de infecções que ocorrem em idade adiantada, portanto a ênfase das intervenções não é nos matadouros mas sim no momento da criação.

A coliseptemia afeta frangos, perus, patos e aves ornamentais entre 4 e 12 semanas, e o desenvolvimento e crescimento da indústria avícola contribuiu para a expansão das criações (maior número de aves por galpão, ventilação deficiente) e o surgimento de infecções virais e bacterianas aumentando a predisposição dessa infecção (LA RAGIONE e WOODWARD, 2002)

Schrader, Singer e Atwill (2004) obtiveram uma associação positiva entre temperatura ambiente e celulite, significando que lotes criados em temperaturas mais elevadas contraem mais celulites. Segundo Ryder, Feddes e Zuidhof, (2004) a utilização do sistema de vaporização para redução de

temperatura ambiente nos galpões resulta em melhora da qualidade da carcaça e redução de 33% e 40% na mortalidade e condenação de carcaças, respectivamente.

Entretanto, faz-se necessário o controle da umidade, pois foi observada uma associação positiva entre umidade relativa e celulite, quando a umidade relativa se elevou a incidência de celulite teve o mesmo sentido. A umidade relativa medida no período entre 26 a 46 dias de idade esteve significativamente associada com a celulite. É tarefa árdua refrigerar um galpão de frangos em uma situação de elevada umidade relativa, isto pode afetar negativamente o comportamento dos frangos estimulando-os a sentar ou deitar durante o período mais quente do dia. (SCHRADER, SINGER e ATWILL, 2004).

Em oposição, Feddes et al. (2003) não perceberam qualquer alteração na incidência de celulites em tratamentos com diferentes níveis de ventilação e velocidade do ar desde que a temperatura seja mantida igual.

Em seus estudos Schrader, Singer e Atwill, (2004) identificaram dois fatores que afetam a prevalência da celulite e que podem ser completamente controlados através de gerenciamento do manejo: a quantidade de aves por utilização da cama e o tempo de vazio sanitário. De acordo com o modelo por eles proposto, limitando o número de aves criadas na mesma cama e elevando o tempo do vazio sanitário a taxa de celulite será reduzida significativamente. Rocha et al. (2002) complementam quando afirmam que a compactação da cama causa lesões na região do peito e a umidade favorece a multiplicação bacteriana que encontra facilidades para penetrar e causar a inflamação.

Em estudos de campo Singer et al. (2000), verificaram que uma cama reutilizada, na ausência de aves, muitas vezes tem contagens bacterianas abaixo do limite de detecção de 2×10^3 UFC/g em matéria seca. É possível, no entanto, que um número muito baixo de bactérias, persiste em um estado de latência na cama reutilizada, e, quando o próximo lote for introduzido, o microrganismo começar a se multiplicar. Outras fontes potenciais incluem a sujeira do piso dos aviários e a poeira. As bactérias têm se demonstrado persistentes por longos períodos na poeira dos aviários.

Johnson et al. (2001) destacam que a maior incidência de celulite em machos freqüentemente observada em criações de aves comerciais parece ser

uma função da agressividade (arranhões associados) e não diferem marcadamente das taxas observadas no sexo feminino, quando ambos os sexos são desafiados por um modelo de injeção do inóculo (*Escherichia coli*) no tecido subcutâneo.

Para conseguir integridade na pele dos frangos pode ser que sejam necessários ajustes no manejo dos lotes assim como durante o processamento. 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 e HESS, 2009)

3.6 CONSIDERAÇÕES SOBRE A ETIOPATOGENIA DA CELULITE AVIÁRIA POR *Escherichia coli*

3.6.1 *Escherichia coli* em aves

Escherichia coli foi descrita pela primeira vez no final do século XIX por Theodor von Escherich e denominada *Bacterium coli commune*, devido ao fato de ser uma bactéria encontrada no cólon e extremamente comum nos humanos e animais. Pertence à família *Enterobacteriaceae*, que estão amplamente distribuídos na natureza, sendo encontrados no solo, água, plantas e, como indica o nome da família, no trato intestinal de seres humanos e animais de produção ou companhia (KONEMAN et al., 2008; HIRSH e ZEE, 2003). Alguns gêneros dentro da família são primariamente patógenos de humanos e animais de sangue quente (ex. *Shigella*, *Salmonella*, *Yersinia*), enquanto outros são membros da microbiota comensal normal do trato gastrointestinal (ex. *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*) e causam infecções oportunistas. De modo geral, as enterobactérias são os microrganismos mais isolados de processos infecciosos, representando em torno de 70 a 80% das bactérias Gram-negativas isoladas em rotina de laboratório. (EINSENSTEIN e ZALEZNIK, 2009; TRABULSI e ALTERTHUM, 2005).

As bactérias que pertencem à família *Enterobacteriaceae* são bacilos gram-negativos não esporogênicos que fermentam a glicose e ampla variedade de outros açúcares. São oxidase negativa, catalase positiva, anaeróbios facultativos que crescem bem em ágar MacConkey porque não são inibidos

pelos sais biliares do meio. Esses microrganismos entéricos reduzem nitrato a nitrito, e algumas espécies, notadamente a *Escherichia coli*, fermentam a lactose. A maioria das enterobactérias é móvel por flagelos peritríquios. A família contém mais de 28 gêneros e de 80 espécies, incluindo *Escherichia coli*, sorotipos de *Salmonella*, *Yersinia*, *Proteus*, *Enterobacter* e *Klebsiella*. Esses organismos podem infectar uma enorme variedade de hospedeiros (incluindo humanos), resultando em algumas situações, em portadores e, em outras instâncias, causando doenças, pois os microrganismos podem ser patógenos entéricos e sistêmicos ou oportunistas (QUINN et al., 2005).

O gênero *Escherichia* contém apenas uma espécie e, aproximadamente, mil tipos antigênicos. É a espécie bacteriana mais comumente isolada nos laboratórios clínicos. É um dos microrganismos comumente envolvidos em septicemias por gram-negativos e em choque induzido por endotoxinas. É um mesófilo típico capaz de se desenvolver entre 7 e 42°C sendo 37°C a temperatura ótima, embora existam cepas que possam se multiplicar a 4°C. Não apresenta termorresistência, sendo destruído a 60°C em poucos segundos, mas é capaz de resistir por longo tempo em temperatura de refrigeração. O pH próximo do neutro propicia condições ótimas para o seu desenvolvimento (KONEMAN et al., 2008; GERMANO e GERMANO, 2008).

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

Os fatores de virulência de linhagens patogênicas de *Escherichia coli* incluem enterotoxinas, sideróforos, toxina shiga-símile (verotoxina), fator

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

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

Com base nas características de patogenicidade, no efeito em certas culturas de células e nos grupos sorológicos são reconhecidos nove grupos de *Escherichia coli* virulentos (patotipos): *Escherichia coli* enteroagregativa (EaggEC), *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC), *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC), *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) e *E. coli* que adere difusamente (DAEC) *Escherichia coli* uropatogênica (UPEC), *Escherichia coli* de meningite neonatal (NMEC), *Escherichia coli* patogênica para aves (APEC) (KAPER, 2005). Ferreira e Knobl (2000) ainda cita o patotipo *Escherichia coli* enteropatogênica para coelhos (REDEC).

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

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

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

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

Em seus experimentos Ewers, Jansen e Wieler (2003) ressaltam que as APEC partilham não somente idênticos sorotipos com as *Escherichia coli* patogênicas para humanos, mas também fatores de virulência específicos, portanto o seu potencial zoonótico deve ser considerado (KAPER, 2005) afirma que, o patotipo APEC causa infecções extraintestinais em aves, como infecção respiratória, pericardite e septicemia. Em humanos estão associados a infecções intra-abdominais.

Frangos também são susceptíveis à colonização por *Escherichia coli* O157:H7, pertencente ao patotipo EHEC, responsável pela síndrome da colite urêmica-hemolítica hemorrágica em humanos (BARNES, VAILLANCOURT e GROSS, 2008). Cepas de APEC tem sido relacionadas com maior prevalência aos sorogrupos O1, O2 e O78 (MCPEAKE, SMITH e BALL, 2005).

De acordo com Andreatti Filho (2006), a colibacilose é o termo comumente empregado para designar as infecções causadas por *Escherichia coli* nos animais. A colibacilose aviária esteve posicionada em papel secundário, necessitando impreterivelmente de um fator estressante primário para o desencadeamento da doença. Aparecia associada à *Mycoplasma*

gallisepticum, *M. synoviae*, *Pasteurella multocida*, *Haemophilus paragallinarum*, Pneumovírus, vírus da bronquite infecciosa (incluindo vírus vacinal), doença de Marek e de New Castle, doença infecciosa bursal (Gumburo) e presença de micotoxinas (Aflatoxina) na ração. A erradicação de certas doenças aviárias intimamente associadas a infecções secundárias por *Escherichia coli* e a diminuição da ocorrência de outras, pela adoção de melhores práticas de manejo e programas sanitários, vieram ressaltar a importância da *Escherichia coli* na patologia aviária. Além desses agentes infecciosos, a infecção por *Escherichia coli* se torna clinicamente aparente quando e, principalmente, fatores ambientais adversos estão presentes, como a presença de gases irritantes, principalmente a amônia, umidade da cama, poeira, variações climáticas e alta densidade.

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

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

Por outro lado, a situação do uso indiscriminado de antimicrobianos no tratamento e prevenção de doenças é um problema de saúde animal e pública (MOTA et al., 2005; JOHNSON et al., 2005a). 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 *Escherichia 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 *Escherichia 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 *Escherichia coli* resistente a sulfametoxazol-trimetropim, quinolona e cefalosporina de amplo espectro. Eles concluíram que muitas cepas de *Escherichia coli* resistentes aos antimicrobianos isoladas de humanos podem ter sido oriundas do frango, por ingestão do alimento contaminado, entretanto as cepas resistentes aos antimicrobianos isoladas de frangos provavelmente são oriundas de precursores de animais susceptíveis.

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

Por fim, para prevenir a entrada de *Escherichia coli* na cadeia produtiva, deve ser efetuado monitoramento bacteriológico e a rejeição das aves infectadas na granja e indústria. Na granja devem ser implantadas as Boas Práticas de Manejo seguida da APPCC (GRANDO, SONCINI e KUANA, 2004). Na indústria avícola devem ser introduzidas as BPFs, o PPHO e a APPCC, além da introdução de um processo de avaliação de riscos (MAIA e DINIZ, 2009; ROQUE-SPECHT, CASTRO e FIOD NETO, 2007).

3.6.2 *Escherichia coli* como agente etiológico da celulite aviária

De acordo com Ron (2006) a *Escherichia coli* tem comprovado papel como patógeno entérico e também extraintestinal como causa de amplo espectro de infecções invasivas em humanos e animais. Segundo Zavalla (2000), a manipulação das aves, a penetração da pele com agulhas, os arranhões da pele, as lesões nas cristas e barbelas, podem contribuir para penetração de bactérias na pele das aves. As lesões de pele cicatrizam e desaparecem, entretanto as bactérias permanecem no tecido subcutâneo,

onde a fagocitose das bactérias é ineficiente, e os fagócitos encarregados de eliminar a infecção carecem de arsenal bioquímico que está presente nos fagócitos dos mamíferos, isto significa que as infecções tenderão a serem mais crônicas nas aves.

Em frangos de corte, a possível associação entre bactérias e lesões de celulite foi primeiramente reportada em 1984, quando foram isoladas *Escherichia coli* e ocasionalmente *Pasteurella multocida* (RANDALL et al., 1984). *E. coli* são os organismos predominantemente isolados destas lesões, e numerosos investigadores tem casualmente conectado a presença de *E. coli* com a celulite (PEIGHAMBARI et al., 1995; GOMIS et al., 1997; NORTON, BILGILI e McMURTREY, 1997; JEFFREY, CHIN e SINGER, 1999). Messier et al. (1993) isolaram a bactéria em 88,1% das amostras, sendo que em 62,5% destas, foi a única bactéria isolada. Gomis et al. (1997) isolaram *E. coli* e 75% das lesões de aves que reproduziram experimentalmente a doença. Em outro estudo, 83,3% das lesões de celulite foram positivas para a presença de *E. coli* (ONDERKA et al., 1997)

Andrade (2005) em sua pesquisa afirmou que de forma geral, das 30 amostras comprovadamente com celulite, 23 foram positivas na identificação de *Escherichia coli*, das amostras controle, 18 confirmaram a presença da bactéria.

Escherichia coli foi isolada da superfície assim como de lesões da pele de muitos frangos. É possível que esta aparente susceptibilidade da pele dos frangos para a colonização da *E. coli* está associada a especificidades estruturais e fisicoquímicas da pele dos frangos. Olkowski et al. (2005).

Schrader, Singer e Atwill, (2004) encontraram elevados níveis de *Escherichia coli* no terço final da criação e este período está associado a elevada prevalência de celulite. É neste momento que a densidade das aves no galpão é mais elevada concomitante ao pico no nível de concentração da *Escherichia coli* na cama oferecendo uma crítica justaposição de lesões de pele e dose de inóculo infeccioso

3.7 CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE *Escherichia coli*

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

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

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

Desenvolvida por Saiki e seus colaboradores em 1985, a técnica de PCR foi aperfeiçoada por Mullis e seus colaboradores em 1987. As melhorias introduzidas por Mullis foram o conceito de *primer* de PCR e o uso de uma enzima termoestável (*Taq* DNA polimerase) isolada de uma bactéria que vive em fontes termais, conhecida como *Thermus aquaticus*. Esta enzima possui a propriedade de se manter estável em temperaturas altas, facilitando a realização da técnica. Em 1989 foi criado o primeiro termociclador automático e em meados dos anos 90 foi aperfeiçoado com o emprego de um bloco de aquecimento composto por uma liga metálica que aquece ou esfria de acordo com a programação do aparelho conhecido como padrão Peltier (VIEIRA, 2009).

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

Existem diversas reações que utilizam a PCR, como a RT-PCR (*Reverse Transcriptase Chain Reaction*), *Multiplex PCR*, *Nested PCR* e PCR Competitiva. A reação de RT-PCR é composta de duas partes: a transcrição reversa e a amplificação. Seu principal diferencial é que esta reação não parte de um molde de DNA diretamente extraído da amostra; a amostra fornece o RNA, que é convertido em cDNA (DNA complementar). Consiste em uma ferramenta útil em estudos de expressão gênica, pois avaliando o mRNA, podemos detectar quais proteínas estão sendo efetivamente expressas (VIEIRA, 2009). Na *Multiplex PCR* dois ou mais *locus* são amplificados simultaneamente na mesma reação, mostrando-se um ensaio rápido e eficiente

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

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

Rocha et al. (2008) citaram que os mecanismos de virulência das amostras de *Escherichia coli* potencialmente patogênicas têm sido continuamente estudados e acredita-se ser multifatorial. No caso de APEC os autores detectaram diversos genes, como o resistência sérica - *iss* (73,8%), hemaglutinina sensível a temperatura - *tsh* (55,7%) e presença de aerobactina - *iutA* (45,9%). Nakazato et al. (2009) relataram que a caracterização molecular e

biológica é necessária para o entendimento da patogênese da APEC, visando o desenvolvimento de ferramentas que podem prevenir as perdas econômicas causadas por estas linhagens.

É imprescindível o conhecimento dos fatores que determinam o aparecimento de doenças no homem e animais, visando intervenções efetivas. Dessa forma, a definição dos genes de virulência (e possíveis combinações) é vital para a eficácia do diagnóstico e melhoria da saúde pública (CAPRIOLI et al., 2005), acrescentando-se a isso os resultados de estudos de Johnson et al. (2005b) demonstrando a presença de ExPEC em alimentos, sugerindo que elas representam uma nova classe de patógenos alimentares, contudo novos estudos são necessários para obter uma melhor compreensão da extensão da contaminação dos alimentos por ExPEC e o real potencial destes patógenos em gerar patologias diretamente relacionadas com alimentos.

4 REFERÊNCIAS

ABEF. Associação Brasileira de Produtores e Exportadores de Frangos. Apresenta informações sobre a avicultura do Brasil e sobre a entidade. Disponível em: <http://www.abef.com.br/site1/anuario/2009/revista_digital/Propro%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.

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 jan. 2011.

ANDRADE, C. L., **Histologia e identificação da *Escherichia coli* como agente causal da celulite aviária em frangos de corte**, 2005. 62 f.

Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2005.

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

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

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

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, 800 p.

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**, n. 47, p. 763-771, 2001.

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

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

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

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

BRITO, B.G.; TAGLIARI, K.C. Celulite aviária Por *Escherichia coli*. **Unopar Científica**, Londrina, v.2. n.1. p. 143-149, 2000.

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

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

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

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

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

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

EWERS, C.; JANSSEN, T.; WIELER, L. H., Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). **Berliner und Munchener Tierarztlitche Wochenschrift**, v. 116, n 9\10, p. 381-395, 2003.

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**, Kennett Square, v. 40. P699-706. 1996.

ELFADIL, A.A.; VAILANCOURT, J.P.; MEEK, A.H.; JULIAN R. J.; EGYLES C.R.; Descriptios of cellulitis lesions and associations between cellulitis and others categories of condenation. **Avian Diseases**, v. 40, n.3, p. 690-698, 1996.

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.

FEDDS, J. J. R.; EMMNUEL, E. J.; ZUIDHOF, M. J.; KORVER, D. R., Ventilation rate, air circulation and BIRD disturbance: Effects on the incidence of cellulitis and broiler performance. **Journal of Appliance Poultry Research**, v. 12, p. 328-334, 2003.

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

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**, n.1, p. 20-25, 2007.

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

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

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

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

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

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

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.

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

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

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

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, 2005a.

JOHNSON, J. R.; DELAVARI, P.; O'BRYAN, T. T.; SMITH, K.E.; TATINI, S. Contamination of retail foods, particularly turkey, from community markets (Minnesota, 1999–2000) with antimicrobial-resistant and extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. **Foodborne Pathogen Diseases**, n.2, p.38–49, 2005b.

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

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

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

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

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

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.

LA RAGIONE, R. M.; WOODWARD, M. J., Virulence factors of *Escherichia coli* serotypes associated with avian colisepticemia. **Research in Veterinary Science**, v. 73, n. 1, p. 27-35, 2002

MARCARI, M.; FURLAN, R.L.; GONZALES, E., **Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte**. Jaboticabal: FUNEP\UNESP, 2002.

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

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

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

MESSIER, S.; QUESSY, S.; ROBINSON, Y.; DEVRIESE, L.A.; HOMMEZ, J.; FAIRBRATHER, J.M. Focal Dermatitis and Cellulites in Broiler Chickens Bacteriological and Pathological Findings. **Avian Diseases**, v.37, p. 839-844, 1993.

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

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

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

NAAS, I.A. Rastreabilidade: uma exigência do mercado globalizado. In: CONFERÊNCIA ELETRÔNICA: OS DESAFIOS DA AMÉRICA LATINA PARA PRODUÇÃO DE SUÍNOS NO MERCADO GLOBALIZADO, 2., 2002. **Anais...** Embrapa/CNPISA, 2002.

NORTON, R.A.; HESS, J.B. Cellulites in broiler chickens. **World Poultry**, Doetinchem, v.15, n.12, p.56-59. 1999.

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.

NORTON, R. A. ; MACKLIN, K. S. ; MCMURTREY, B. L, The association of various isolates of *Escherichia coli* from the United States with induced cellulitis and colibacillosis in young broiler chickens. **Avian Pathology**, v. 29, n. 6, p. 571 – 574, 2000.

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

ODERKIRK, A. Broiler Cellulitis. **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.

ONDERKA, D.K.; HANSON, J.A.; MACMILLAN, K.R.; ALLAN, B. *Escherichia coli* Associated Cellulites in Broilers: Correlation with Systemic Infection and Microscopic Visceral Lesions and Evaluation for Skin Trimming. **Avian Diseases**, v. 41, p. 935-940, 1997.

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.

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

PATRÍCIO, I.S. Desempenho do frango nos últimos 17 anos (de1990 a 2006). **Revista Avicultura Industrial**, n.5, p. 35-37, 2007.

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

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

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.; MEAKINS, P. A.; HARRIS, M. P.; WATT, D. J., A new skin diseases in broilres? **The Veterinary Record**, v. 114, n. 246, 1984.

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, 2008.

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

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

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

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

Acesso em: 13 out. 2008.

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

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

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.

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

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

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.

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

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

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

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

VAILLANCOURT, J. P.; H. J. BARNES. Coliform cellulitis (inflammatory process). In: SAIF, Y. M.; BARNES, H.J.; GLISSON, J. R.; FADLY, A. M.; McDOUGALD. L.R.; SWAYNE, D.E. (Eds). **Diseases of poultry**. Ames: Iowa State University Press, 2003. p. 652–656.

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.

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

ZAVALLA, G. Manejo de problemas locomotores em reprodutoras pesadas. **Prevent News**, v.3, n.35, p.1-3, 2000.

CAPÍTULO 1

Caracterização fenotípica e genotípica de *Escherichia coli* provenientes de lesões de celulite de frangos de corte¹

¹Artigo submetido ao comitê editorial do periódico científico Pesquisa Veterinária Brasileira

Caracterização fenotípica e genotípica de *Escherichia coli* provenientes de lesões de celulite de frangos de corte¹

ABSTRACT.- Silva R.M., Silva I.M.M., Baliza M., Freitas F. & Barros L.S.S. 2011. [Fenotípica e genotípica caracterização de *Escherichia coli* de celulite]

lesions in broilers.] Caracterização fenotípica e genotípica de *Escherichia coli* provenientes de lesões de celulite de frangos de corte. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Rua Rui Barbosa, 710, Centro, Cruz das Almas, BA 44.380-000, Brazil. E-mail: riccomendes@yahoo.com.br

Were collected aseptically 40 samples from lesions of chickens from poultry slaughterhouse located in Bahia Recôncavo for phenotypic and genotypic characterization of *Escherichia coli*. The animals of this research were from four poultry houses located in the same region, weighed 1.050 g 2.867 g 90% were free of pathology associated with cellulitis. Cachexia observed in two chickens, one case of pericarditis and another injured. The weight of the cellulitis lesions ranged from 0.9 to 1.7 g and 85% of these were on the left side of the abdomen of chickens. *Escherichia coli* was isolated in 82.5% of samples by means of a rapid method for counting by Petrifilm™ plates (3M Company). Was used the Polymerase Chain Reaction (PCR) for verification of the gene of serum resistance (*iss*), identifying Avian Pathogenic, *E. coli* (APEC). *Iss* was detected in 87.9% of isolates. The results of this study showed a clear need for the revision of management in the aviaries, more studies that confirm the presence of APEC in food and its zoonotic potential and the intensification of surveillance in slaughterhouses in order to prevent the emergence and liberation, to consumption of birds with cellulitis lesions.

INDEX TERMS: Infection; bacterial characterization; aviculture, APEC

¹ Recebido em

Aceito para publicação em

² Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Rua Rui Barbosa 710, Centro, Cruz das Almas, BA, 44.380-000, Brasil. *Autor para correspondência: riccomendes@yahoo.com.br

³ Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Rua do Cajueiro S/N, Cajueiro, Santo Antônio de Jesus, BA, 44.570-000, Brasil.

RESUMO: Coletaram-se, de forma asséptica 40 amostras de lesões de celulite de frangos provenientes de matadouro avícola localizado no Recôncavo da Bahia para a caracterização fenotípica e genotípica de *Escherichia coli*. Os animais deste estudo foram oriundos de quatro aviários localizados na mesma região, pesavam entre 1.050g a 2.867g e 90% eram isentos de patologia associada à celulite. Observou-se caquexia em dois frangos, sendo um caso de pericardite e outro de contusão. O peso das lesões de celulite variou de 0,9 a 1,7g e 85% destas estavam no lado esquerdo do abdômen dos frangos. *Escherichia coli* foi isolada em 82,5% das amostras por meio de método rápido de contagem por placas Petrifilm™ (3M Company). Utilizou-se a Reação em Cadeia de Polimerase para verificação do gene de resistência sérica (*iss*), identificando, assim, *E. coli* patogênica para aves (APEC). Identificou-se *iss* em 87,9% dos isolados. Com os resultados deste trabalho ficou clara a necessidade da revisão do manejo nos aviários, de estudos que confirmem a presença de APEC nos alimentos e do seu potencial zoonótico e da intensificação da fiscalização nos matadouros, a fim de se evitar o surgimento e a liberação, para consumo, de aves com lesões de celulite.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Infecção; caracterização bacteriana; avicultura; APEC.

INTRODUÇÃO

A celulite aviária é um termo utilizado para a inflamação aguda do tecido subcutâneo (Oderkirk 1997), comumente localizada na região ventral do abdome e da coxa (Allan 2004, Oderkirk 1997), usualmente unilateral (Messier et al. 1993, Elfadil et al. 1996). Caracteriza-se pela presença de exsudato purulento, espessamento da derme e formação de placas fibrino-caseosas

subcutâneas (Norton et al. 1997, Jeffrey et al. 1999), estando os planos teciduais separados e o tecido muscular adjacente possivelmente envolvido (Messier et al. 1993).

Vaillancourt & Barnes (2003) afirmam que a celulite é um processo infeccioso que emergiu como uma patologia aviária de relevância financeira por conta do crescimento do número de condenações de carcaças, da redução da qualidade do processamento industrial e pelo aumento dos custos relativos às condenações parciais e ao reprocessamento das carcaças afetadas. Santana et al. (2008) corroboram quando afirmam que a celulite pode ser considerada como uma das mais importantes causas de condenação de carne de frango em todo o mundo, gerando interesses em termos econômicos por conta das perdas financeiras impostas aos produtores.

Em frangos de corte, a possível associação entre bactérias e lesões de celulite foi primeiramente reportada em 1984, quando foram isoladas *Escherichia coli* e, ocasionalmente, *Pasteurella multocida* (Randall et al. 1984). Vários estudos evidenciaram o isolamento de *E. coli* oriunda de lesões de celulite em frangos (Peighambari et al. 1995, Gomis et al. 1997, Norton et al. 1997, Jeffrey et al. 1999, Zavalla 2000, Andrade 2005, Olkowski et al. 2005). Para o isolamento de *E. coli* são utilizados diversos métodos, dentre eles o de Petrifilm, que consiste numa modificação da contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) em placas, reconhecido pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) e pelo *Nordic Committee on Food Analysis* (NMKL), sendo muito utilizado em alimentos (Silva et al. 2007).

A *Escherichia coli* tem comprovado papel como patógeno entérico e também extraintestinal, sendo o agente etiológico de um amplo espectro de infecções invasivas no homem e animais, além de ser um dos integrantes da microbiota intestinal de mamíferos e aves (Ron 2006). A *Escherichia coli* patogênica extraintestinal (ExPEC) possui fatores de virulência que permitem invadir, colonizar e induzir patologias fora do trato gastrointestinal (Smith et al. 2007).

Com base nas características de patogenicidade, no efeito em certas culturas de células e nos grupos sorológicos são reconhecidos nove grupos de *Escherichia coli* virulentos (patotipos): *Escherichia coli* enteroagregativa (EaggEC), *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC), *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC), *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC), *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC), *Escherichia coli* que adere difusamente (DAEC), *Escherichia coli* uropatogênica (UPEC), *Escherichia coli* de meningite neonatal (NMEC) e *Escherichia coli* patogênica para aves (APEC) (Kaper 2005). Ferreira & Knobl (2000) ainda citam o patotipo *Escherichia coli* enteropatogênica para coelhos (REDEC).

Nakazato et al. (2009) e Ewers et al. (2004) afirmam que linhagens de APEC causam uma grande diversidade de doenças em aves e são responsáveis por grandes prejuízos na indústria aviária. *E. coli* patogênica para aves (APEC) é um dos agentes etiológicos da colibacilose, uma síndrome caracterizada por lesões em múltiplos órgãos como aerosaculite, pericardite, peritonite, salpingite, sinovite, osteomielite, infecção no saco vitelínico.

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

Dentre os métodos rápidos de diagnóstico molecular de *E. coli* patogênica, como APEC, destaca-se reação em cadeia da polimerase, denominada PCR (*Polimerase Chain Reaction*) (Garcia et al. 2008).

Dentre os genes de virulência encontrados em APEC, o gene "increased serum survival" (*iss*), confere à bactéria resistência aos efeitos bactericidas do soro do hospedeiro, causando bloqueio do complexo terminal do sistema do complemento que atua na membrana celular provocando a lise da célula (Dho-Moulin & Fairbrother 1999). Esse gene foi descrito pela primeira vez associado com o plasmídeo ColV-I-K94 em um isolado de *Escherichia coli* proveniente de humano (Binns et al. 1979). Esse gene codifica uma lipoproteína da membrana externa da bactéria, denominada colicina. Esta proteína pode ser utilizada para estimular a produção de anticorpos monoclonais específicos para detecção de cepas virulentas de *Escherichia coli* (Foley et al. 2003). Johnson et al. (2008) estudaram a evolução do gene *iss* e

detectaram a existência de três alelos nas cepas de *Escherichia coli* (tipos I a III), sendo que o *iss* ocorre em múltiplas regiões do genoma. Houve a relação do referido gene com cepas de *Escherichia coli* oriundas de infecções extraintestinais em humanos, apesar de Kaper (2005) citar que em humanos a APEC está associada a infecções intra-abdominais.

Campos et al. (2008) concluíram que a proximidade genética entre a APEC e a *Escherichia coli* humana é percebida pelo sequenciamento do DNA e das regiões *fliC* conservadas, e estes dados exibem o risco zoonótico da bactéria e Antão et al. (2008) corroboram quando afirmam que, em seus estudos envolvendo patógenos humanos (UPEC e NMEC), descobriram que estes também podem infectar frangos, evidenciando o potencial zoonótico da APEC.

Ewers et al. (2007) realizaram estudos que suportam as seguintes hipóteses: (a) frangos podem ser veículos ou reservatórios para cepas humanas de ExPEC, (b) APEC serve como reservatório para genes associados com virulência das UPEC e NMEC (c), algumas linhagens de ExPEC, apesar de diferentes patótipos, podem compartilhar ancestrais em comum e (d) alguns subgrupos de APEC tem considerável potencial como agentes zoonóticos.

Este trabalho teve como objetivo caracterizar fenotipicamente e genotipicamente *Escherichia coli* oriundas de lesões de celulite de frangos provenientes de matadouro avícola.

MATERIAL E MÉTODOS

O isolamento e identificação bacteriana foi realizado pelo método microbiológico rápido de contagem por placas Petrifilm™ (3M Company), método AOAC (998.08).

Foram colhidas, 40 amostras de lesões de celulite de frango provenientes de matadouro avícola do Recôncavo da Bahia, sob a fiscalização do Serviço de Inspeção Estadual (SIE), que realiza o abate de 22.000 aves/dia, estando sob a fiscalização do SIE, aves estas oriundas de quatro aviários localizados na mesma região. As amostras foram coletadas assepticamente com lâmina de bisturi estéril, precedida pela antisepsia do tecido cutâneo, acondicionadas em recipientes estéreis, identificadas, acondicionadas em caixa térmica contendo gelo químico e prontamente enviadas ao Laboratório de Microbiologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, sendo imediatamente executadas as análises segundo Silva et al. (2007).

Foi diluído 1 g da lesão de celulite em 9 ml de solução salina 0,9% e realizada inoculação de 1 ml na placa para cultivo de *Escherichia coli* (EC), contendo meio base Vermelho Violeta Bile (VRB), indicador cloreto de trifeniltetrazolium (TTC), lactose e substrato cromogênico para β -glicuronidase. A inoculação foi feita no filme inferior que, depois de inoculado, foi coberto com o filme superior. O inóculo foi espalhado com um difusor plástico, por leve pressão manual e, depois da solidificação do gel, as placas foram incubadas para desenvolvimento das colônias a $35\pm 1^\circ\text{C}/24\pm 2\text{h}$. Foram considerados como *E. coli* os cultivos que apresentaram as seguintes características: coloração azul ou vermelho azulada e presença de bolhas de gás.

Os isolados foram estocados em caldo BHI (Brain and Heart Infusion) com glicerol a 15% e mantidos a 20°C negativos para posterior extração do DNA bacteriano e realização da PCR.

Polimerase Chain Reaction (PCR):

Extração de DNA

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

Mix

Os componentes da PCR estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Componentes da PCR

Componente	Volume	Concentração final
10X PCR buffer	2,5µl	1X
10mM dNTP mix	0,5µl	0,2mM
50mM MgCl ₂	0,75µl	15mM
Taq DNA polimerase (5U/µl)	0,2µl	2U
Água Mili-Q estéril	16,05µl	-
Iniciadores(10µl) (os dois primers)	1µl	0,5µl
DNA-molde	3µl	-
Total	25µl	

Amplificação

As condições da PCR para o gene *iss* para diagnóstico molecular da APEC foram as seguintes: 5 minutos a 94°C; 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 61°C e 2 minutos a 72°C; com extensão final de 10 minutos a 72°C. As sequências dos *primers* foram 5'-GTG GCG AAA ACT AGT AAA ACA GC-3' e 5'-CGC CTC GGG GTG GAT AA-3' e o tamanho do fragmento amplificado do gene estudado foi 760pb. As reações de amplificação foram realizadas em termociclador do tipo *Mastercycler* (Eppendorf®). Os componentes da reação de PCR foram misturados em câmara asséptica e distribuídos 22µl em tubos de polipropileno de 0,2ml. Posteriormente, 3µl do lisado de cada amostra foram adicionados. Os produtos de amplificação foram separados mediante eletroforese em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídio (1µg/ml) utilizando o equipamento *Eletroforesis power supply EV 243*™-Consort. Um volume de 10µl do produto amplificado foi misturado a 2µl de tampão da amostra e aplicados no gel, sendo o tempo de corrida de 2 horas a 40mA. Em seguida os produtos da amplificação foram observados em transluminador ultravioleta (BDH®). Foi utilizado como marcador de peso molecular o padrão de 100pb DNA *ladder*.

RESULTADOS

Os animais envolvidos no estudo pesavam entre 1,050g a 2,867g e 90% (36/40) não apresentavam patologia associada à celulite. A caquexia foi observada em apenas 2 frangos, seguida um caso de pericardite e um de contusão. O peso das lesões de celulite variou de 0,9 a 1,7g e 85% destas (34/40) estavam localizadas no lado esquerdo do frango. *Escherichia coli* foi isolada em 82,5% (33/40) amostras de lesões de celulite. O gene *iss* foi identificado em 87,9% (29/33) das amostras. Como mostra a figura 1, apenas os isolados 7, 11, 29 e 32 foram negativos para o gene *iss*. Foram utilizados um controle negativo da reação de PCR e um controle positivo. Entretanto, o controle positivo, uma amostra de DNA de *Escherichia coli* sabidamente portadora do gene *iss*, não amplificou. Uma das possibilidades para a sua não amplificação é a degradação do DNA devido ao longo tempo de armazenamento dessa amostra.

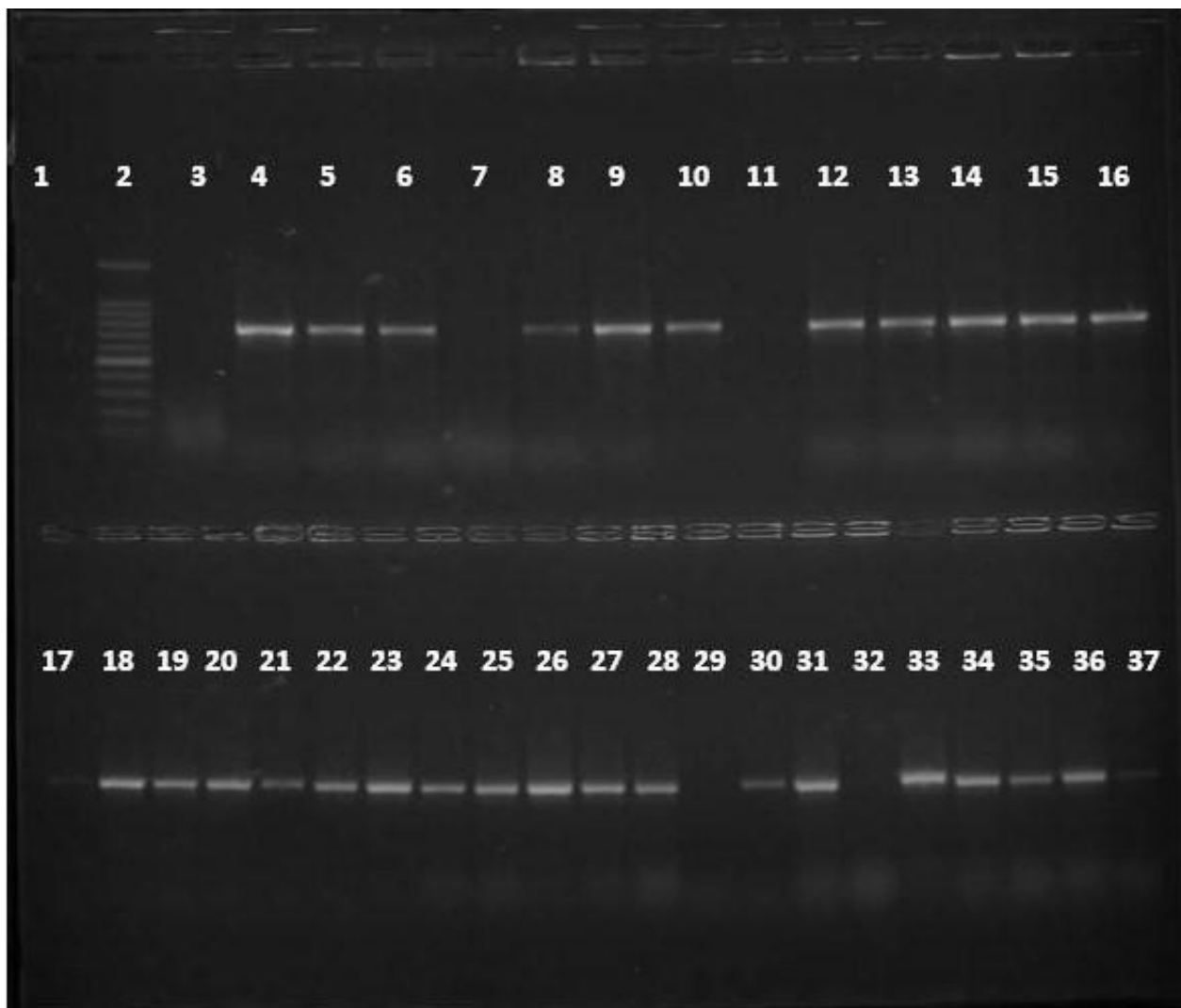


Figura 1. Fotografia do gel de agarose a 2% da PCR para gene *iss* das amostras de *Escherichia coli* isoladas de lesões de celulite de frangos. Tamanho do fragmento 760pb, 1 Controle negativo, 2 Peso Molecular 100pb, 3 Controle positivo, 7-11-29-32 Amostras negativas.

DISCUSSÃO

Os resultados da alta prevalência de *Escherichia coli* em lesões de celulite corroboram com os achados de Messier et al. (1993), que isolaram a bactéria em 88,1% das amostras, sendo que em 62,5% destas, foi a única bactéria isolada, e com Gomis et al. (1997) que isolaram *Escherichia coli* em 75% das lesões de aves, no qual a doença foi experimentalmente reproduzida. Em outro estudo, Onderka et al. (1997) constataram a presença de *Escherichia coli* em 83,3% das lesões de celulite. Em suas pesquisas, Gomis et al. (2000) isolaram *E. coli* em 92% das lesões de celulite (n=51), resultado similar aos estudos de Derakhshanfar & Ghanbarpour (2002) que isolaram *E. coli* em 91,8% das lesões de celulite (n=98), sendo que foi o único microrganismo isolado em 83,7% das amostras (n=82). Desta forma, fica evidenciado que o manejo sanitário e cultural nesses aviários não estão sendo eficazes para evitar o surgimento das lesões e para evitar a incidência de *Escherichia coli* nesses ambientes.

Quanto ao elevado percentual da presença do gene *iss*, para o diagnóstico molecular da APEC, os resultados são semelhantes aos encontrados por Rocha et al. (2008), que detectaram *iss* em 73,8% dos isolados (n=61), assim como 81,5% encontrado por Rodriguez-Siek et al. (2005a), 82,7% diagnosticado por Ewers et al. (2004) e 77% reportado por Pfaff-McDonough et al. (2000). Mcpeake et al. (2005) identificaram *iss* em 72,8% das amostras de *E. coli* isoladas de aves com septicemia. Barnes et al. (2008) ressaltaram que a APEC representa um sério

problema para a avicultura, devido aos grandes prejuízos econômicos causados no mundo por pneumonia, peritonite, colisepticemia, celulite, pleuropneumonia, peri-hepatite, pericardite, salpingite, panofalmitis, osteomielite/sinovite, onfalite, coligranuloma, síndrome de cabeça inchada e doença crônica respiratória.

Concordando com Rodriguez-Siek et al. (2005b) que detectaram o gene *iss* em 82,7% das aves com colibacilose, neste estudo os autores relataram que o gene *iss* esteve mais associado a infecções sistêmicas, incluindo o isolamento em amostras de fígado, coração, baço ou sangue (86,5%). Os autores encontraram maior prevalência desse gene em frangos (84,9%), seguido de perus (76,2%), estando relacionado com o sorogrupo O78 (95,5%), O2 (86%) e O1 (66,7%).

Brito et al. (2003) relatam que 63% das *Escherichia coli* isoladas de lesões de celulite apresentaram genes *iss*. Em seus estudos Rocha et al. (2002) encontraram a presença do gene *iss* em 80,6% nas amostras de celulite coletadas e em 53,8% das amostras provenientes de fezes oriundas de um universo de 238 amostras de *Escherichia coli*, isoladas de amostras de lesões de celulites e de cama de aviário.

Jeffrey et al. (2002), em seus estudos, sugeriram que cepas de *Escherichia coli* associadas com casos de celulites em aves, possuem mecanismos de virulência semelhantes aos observados em cepas associadas a colisepticemia, pois o gene *iss* foi encontrado por eles em isolados bacterianos de aves com colibacilose ou celulite.

Salienta-se que, segundo Kaper (2005), a APEC é uma zoonose, estando associada a infecções intra-abdominais em humanos. Johnson et al. (2007) em suas comparações de genomas de APEC com muitas ExPEC humanas confirmaram suas fortes similaridades e mantém a possibilidade da APEC estar envolvida com doenças em humanos.

De acordo com Barnes et al. (2008), similares à APEC, as ExPECs humanas são responsáveis por significativa morbidade e mortalidade, resultando em milhares de mortes e milhões de dias de perda de produtividade laboral anualmente. Segundo Barnes et al. (2008), apesar da dificuldade em aferir o impacto econômico das enfermidades causadas por esses microrganismos, é aceitável assumir perdas substanciais relacionadas com mortalidade, condenação de carcaças e perda de produtividade. Por outro lado, Russo e Johnson (2003) afirmam que todos os anos, somente nos Estados Unidos, é estimado que doenças causadas por ExPEC resultem em mais de 4 bilhões de dólares em custos diretos no sistema de saúde.

Vale salientar que Johnson et al. (2005a e 2005b) indicaram que a carne, especialmente a carne de frango, pode ser uma importante fonte de cepas resistentes de ExPEC. Johnson et al. (2009) afirmam que seus achados significam que não podemos descartar a possibilidade que a carne de frango contaminada com APEC é uma fonte de ExPEC capaz de provocar patologias em humanos. Sendo assim, é provável que seja insuficiente, em muitos matadouros, o número de profissionais inspecionando a qualidade da carne de aves, visto que as lesões de celulite podem ser de difícil detecção. O potencial zoonótico da APEC deve ser objeto de novos estudos, haja vista a probabilidade desse microrganismo estar causando patologias em humanos.

As quatro amostras de *Escherichia coli* isoladas pelo método rápido de contagem que não apresentaram o gene *iss* podem pertencer a outro sorotipo, ser do sorotipo e não possuir o gene pesquisado ou ter sofrido mutação.

CONCLUSÕES

O manejo nos aviários deve seguir regras higiênicas e sanitárias rígidas, que priorizem a qualidade total do produto final. É necessário que conceitos como lotação máxima, utilização de cama e de promotores de crescimento sejam revistos, para evitar, dentre outras patologias, a celulite aviária.

O volume de aves abatido diariamente demanda dos serviços de inspeção maior número de profissionais atuando na linha de produção, já que mesmo com toda a automatização dos processos industriais modernos, algumas tarefas ainda são exclusivamente humanas e a detecção das lesões de celulite é uma destas.

A presença da *Escherichia coli* em lesões de celulite é, neste estudo, notadamente superior a de outros microrganismos assim como a das APEC em relação a outros sorotipos.

Diante dos resultados obtidos, torna-se necessário a continuidade dos estudos, especialmente quanto o potencial zoonótico da APEC e sua presença nos alimentos prontos para consumo

Agradecimentos.- Ao Professor Luiz Antônio Favero Filho, do Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), ao Professor Jorge Teodoro de Souza e Adailson de Jesus Feitosa Santos do Laboratório de Genética de Microrganismos do Centro de Ciências Agrárias Ambientais e Biológicas (CCAAB) da UFRB e à Dra. Marília Lima Costa, da Agência de Defesa Agropecuária da Bahia (ADAB) e matadouro avícola pela disponibilidade das instalações.

REFERÊNCIAS

- Allan B. 2010. 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).
- Antão E.- M., Glodde S., Li G. , Sharifi R., Homeier T., Laturus C., Diehl I., Bethe A., Philipp H.- C, Preisinger R., Wieler L. H & Ewers C. 2008. The chicken as a natural model for extraintestinal infections caused by avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC), Microbial Pathogenesis, Elsevier 30:1-9.
- Barnes H.J., Vaillancourt J.P. & Gross W.B. 2008. Colibacillosis. In: SAIF, Y.M. (Ed.) Diseases of poultry, 12 ed. Ames, Iowa: Iowa State University Press: 631-656.
- Binns M.M., Davies D.L. & Hardy K.G. 1979. Cloned fragments of the plasmid CoIV-I-K94 specifying virulence and serum resistance. Nature 279:778-781.
- Brito G. B., Gaziri L. C. J. & Vidotto M. C. 2003. Virulence factors and clonal relationships among *Escherichia coli* strains isolated from broilers chickens with cellulitis, Infection and Immunity, 71, 7:4175-4177.
- Campos T. A., Nakazato G., Stehling E. G, Brocchi M. & Silveira E. W. D. 2008. Estudo clonal de *Escherichia coli* aviário por análise de seqüências de DNA conservadas do gene fliC, Pesquisa Veterinária Brasileira 28, 10:508 -514.
- Derakhshanfar A. & Ghanbarpour R. 2002. A study of avian cellulitis in broiler chickens, Veterinary Archives, 72, 5:277-284.
- Dho-Moulin M. & Fairbrother J.M. 1999. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC), Veterinary Research, 30: 299-316.
- Elfadil A.A., Vaillancourt J.P. & Meek A. 1996. Farm management risk factors associated with cellulitis in broiler chickens in southern Ontario. Avian Diseases, Kennett Square: 40:699-706.
- Ewers C., Janben T., Kiebling S., Philipp, H. & Wieler L.H. 2004. Molecular epidemiology of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from colisepticemia in poultry. Veterinary microbiology 104: 91-101.
- Ewers C, Li G., Wilking H., Kiebling S., Alt K., Antão E.-M, Laturus C., Diehl I., Glodde S., Homeier T., Böhnke U., Steinrück H., Philipp H. & Wieler, L.H. 2007. Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: How closely related are they? International Journal of Medical Microbiology 297: 163-176.
- Ferreira A.J.P. & Knobl T. 2000. Colibacilose aviária, p. 197-207. In: Berchieri Junior, A., Macari M. Doença das Aves. Campinas: FACTA.
- Foley S.L., Horne S.M., Giddings C.W. Gustad T. R., Handegard E. D., Robinson M. & Nolan L.K. 2003. Monoclonal antibodies to avian *Escherichia coli* Iss. Avian Diseases 47:79-86.
- Garcia P.M., Arcuri E.F., Brito M.A.V.P., Lange C.C., Brito , J.R.F. & Cerqueira M.M.O.P. 2008. Detecção de *Escherichia coli* O157:H7 inoculada experimentalmente em amostras de leite cru por método convencional e PCR multiplex. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia 60: 1241-1249.
- Gomis S. M., Watts T., Riddell C., Potter A.A. & Allan B.J. 1997. Experimental reproduction of *Escherichia coli* cellulitis and septicemia in broiler chickens. Avian Diseases 41: 234-240.
- Gomis S.M., Gomis A. I. U., Horadagoda N. U., Wijewardene T.G., Allan B.J. & Potter A.A. 2000. Studies on Cellulitis and Other Disease Syndromes Caused by *Escherichia coli* in Broilers in Sri Lanka Tropical Animal Health and Production, Kluwer Academic Publishers 32: 341-351.
- Jeffrey J.S., Chin R.P. & Singer R.S. 1999. Assessing cellulitis pathogenicity of *Escherichia coli* isolates in broiler chickens assessed by an in vivo inoculation model. Avian Diseases 43: 491-496.
- Jeffrey J.S., Nolan L. K., Tonooka K. H., Wolfe S., Giddings C. W., Horne S. M., Foley S. L., Lynne, A. M., Ebert J. O., Elijah L. M., Bjorklund G., Pfaff-McDonough S. J. & Singer R. S., Doetkott C.

2002. Virulence factors of *Escherichia coli* from cellulitis or colisepticemia lesions in chickens, *Avian Diseases*, v. 46, p. 48-52.
- Johnson T.J., Wannemuehler Y.M. & Nolan, L.K. 2008. Evolution of the *iss* gene in *Escherichia coli*. *Applied Environmental Microbiology* 74: 2360-2369.
- Johnson J. R., Delavari P. O'bryan T. T., Smith K. E. & Tatini S. 2005a. Contamination of retail foods, particularly turkey, from community markets (Minnesota, 1999–2000) with antimicrobial resistant and extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* *Foodborne Pathology Diseases* 2: 38–49.
- Johnson J. R., Kuskowski M. A., Smith K., O'bryan T. T. & Tatini S. 2005b. Antimicrobial-resistant and extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in retail foods, *Journal of Infection Diseases* 191:1040–1049.
- Johnson T. J., Kariyawasam S., Wannemuehler Y., Mangiamele P., Johnson S.J. Doetkott C., Skyberg J. A., Lynne A. M., Johnson J. R. & Nolan L. K. 2007. The genome sequence of avian pathogenic *Escherichia coli* strain O1:K1:H7 shares strong similarities with human extraintestinal pathogenic *E. coli* genomes. *Journal of Bacteriology* 189: 3228–3236.
- Johnson T. J., Logue C. M., Wannemuehler Y., Kariyawasam S., Doetkott C., Debroy C., White D. G. & Nolan L. K. 2009. Examination of the Source and Extended Virulence Genotypes of *Escherichia coli* Contaminating Retail Poultry Meat, Mary Ann Liebert, Inc.: *Foodborne Pathogens and Disease* 6: 657-667.
- Kaper J.B. 2005. Pathogenic *Escherichia coli*. *International Journal of Medical Microbiology* 295:355-356.
- Mcpeake S.J.W., Smith J.A. & Ball, H.J. 2005. Characterization of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) associated with colisepticaemia compared to faecal isolates from healthy birds. *Veterinary Microbiology* 110: 245-253.
- Messier S., Quessy S., Robinson Y., Devriese L.A., Hommez J. & Fairbrther J.M. 1993. Focal Dermatitis and Cellulites in Broiler Chickens *Bacteriological and Pathological Findings. Avian Diseases*.37: 839-844.
- Nakazato G., Campos T. A., Stehling E. G., Brocchi M. & Silveira W. D. 2009. Fatores de virulência de *Escherichia coli* aviária patogênica (APEC). *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 29: 479-486.
- Norton R.A., Bilgili S.F. & McMurtrey, B.C. 1997. A Reproducible Model for the Induction of Avian Cellulites in Broiler Chickens. *Avian Diseases* 41: 422-428.
- Oderkirk A. 1997. Broiler Cellulitis. Poultry Fact Sheet. Nova Escócia, Canada: Poultry Service industry.
- Olkowski A. A., Wojnarowicz C., Chirino-Trejo M., Wurtz B. M. & Kumor L. 2005. 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* 52: 517–524.
- Peighambari S. M., Vaillancourt J.P., Wilson R.A. & Gyles C.L. 1995. Characteristics of *Escherichia coli* isolates from avian cellulitis. *Avian Diseases* 39: 116-124.
- Pfaff-McDonough S. J., Home S.M., Giddings C.W., Ebert J.O., Doetkott C., Smith M.H. & Nolan L.K. 2000. Complement resistance-related traits among *Escherichia coli* isolates from apparently health birds and birds with colibacillosis. *Avian Diseases* 44: 23-33.
- Randall C. J., Meakins, P. A., Harris M. P. & Watt D. J. 1984. A new skin diseases in broilres? *The Veterinary Record* 114: 246.
- Rocha A. C., Da Silva A. B., Brito A. B., Moraes H. L., Pontes A. P., e M. C., Do Nascimento V. & Salle C. T. 2002. Virulence factors of avian pathogenic *Escherichia coli* isolated from broilers from the South of Brazil. *Avian Diseases*.46: 749-753.
- 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. 2008. Genes associated with patogenicity of avian *Escherichia coli* (APEC) isolated from respiratory cases of poultry. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 28:183-186.
- Rodriguez-Siek K.E., Giddings C.W., Doetkott C., Johnson T.J., Fakhr, M.K. & Nolan L.K. 2005a. Comparison of *Escherichia coli* isolates implicated in human urinary tract infection and avian colibacillosis. *Microbiology* 151: 2097-2110.
- Rodriguez-Siek K.E., Giddings C.W., Doetkott, C., Johnson T.J. & Nolan L.K. 2005b. Characterizing the APEC pathotype. *Veterinary Research* 36: 241-256.
- Ron E.Z. 2006. Host specificity of septicemic *Escherichia coli*: human and avian pathogens. *Current Opinion in Microbiology* 9: 28-32.
- Russo T. A. & Johnson J. R. 2000. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli* ExPEC. *Journal of Infectious Diseases* 181:1753–1754.

- Russo T.A. & Johnson, J. R. 2003. Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: focus on an increasingly important endemic problem. *Microbes Infection* 5: 449-456.
- Santana A.P., Murata L.S., Freitas C.G., Delphino M.K. & Pimentel C.M. 2008. Causes of condemnation of carcasses from poultry in slaughterhouses located in state of Goiás Brazil. *Ciência Rural*. 38: 2587-2592.
- 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: Varela.
- Smith J. L., Fratamico P. M. & Gunther N. W. 2007. Review Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*, *Foodborne pathogens and disease* 4: 134-163.
- Tortora G.J., Funke B.R. & Case, C.L. 2006. *Microbiologia*. 8.ed. São Paulo: Artmed.
- Vaillancourt J. P. & Barnes H. J. 2003. Coliform cellulitis (inflammatory process), p. 652-656. In: *Diseases of poultry*. Saif, Y. M. Barnes, H. J., Glisson J. R., Fadly A. M. McDougald L. R. Swayne D. E. eds. Iowa State University Press, Ames, IA.
- Zavalla G. 2000. Manejo de problemas locomotores em reprodutoras pesadas. *Prevent News* .3:1-3.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A grande importância da indústria avícola para o mundo, e em especial para o Brasil, fica evidenciada com as citações dos autores neste estudo. O fornecimento de fontes protéicas de qualidade e a preços acessíveis, além da grande demanda por mão de obra e o valor ambiental desta cultura, pois utiliza insumos que, em sua maioria, são subprodutos resultantes da produção de alimentos humanos, são os principais motivos que levam e levarão pesquisadores, em várias partes do mundo, a tentar elucidar as dúvidas e solucionar os problemas relativos à avicultura.

O manejo nos aviários deve seguir regras higiênicas e sanitárias rígidas, que priorizem a qualidade total do produto final. É necessário que conceitos como lotação máxima, utilização de cama e de promotores de crescimento sejam revistos, pois estes devem ser efetuados prioritariamente em função da saúde do consumidor final, acima de todos os outros parâmetros de avaliação.

O volume de aves abatido diariamente demanda dos serviços de inspeção maior número de profissionais atuando na linha de produção, já que mesmo com toda a automatização dos processos industriais modernos, algumas tarefas ainda são exclusivamente humanas e a detecção das lesões de celulite é uma destas.

Diante dos resultados obtidos torna-se necessário a continuidade dos estudos, especialmente quanto o potencial zoonótico da APEC e sua presença nos alimentos prontos para consumo.

Vale salientar que o controle da sanidade avícola deve ser intensificado em todas as etapas do processo produtivo. Esse segmento agroindustrial, muito bem sucedido até hoje, demanda processos e controles que o mantenha nos patamares de liderança mercadológica atuais. Novas exigências surgirão e é decisivo antecipar-se a elas para a permanência das benesses conseguidas com esforço e dedicação dos profissionais envolvidos para a garantia do alimento seguro.

NORMAS PARA SUBMISSÃO À REVISTA PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA

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

Apesar de não serem aceitas comunicações (*Short communications*) sob forma de “Notas Científicas”, não há limite mínimo do número de páginas do trabalho enviado, que deve, porém, conter pormenores suficientes sobre os experimentos ou a metodologia empregada no estudo. Trabalhos sobre Anestesiologia e Cirurgia somente os da área de Animais Selvagens serão recebidos para submissão.

Embora sejam de responsabilidade dos autores as opiniões e conceitos emitidos nos trabalhos, o Conselho Editorial, com a assistência da Assessoria Científica, reserva-se o direito de sugerir ou solicitar modificações aconselháveis ou necessárias. Os trabalhos submetidos são aceitos através da aprovação pelos pares (*peer review*).

1. Os trabalhos devem ser organizados, sempre que possível, em Título, ABSTRACT, RESUMO, INTRODUÇÃO, MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS, DISCUSSÃO, CONCLUSÕES (ou combinação destes dois últimos), Agradecimentos e REFERÊNCIAS:

a) o **Título** do artigo deve ser conciso e indicar o conteúdo do trabalho; pormenores

de identificação científica devem ser colocados em MATERIAL E MÉTODOS.

b) O(s) **Autor(es)** deve(m) sistematicamente encurtar os nomes, tanto para facilitar sua identificação científica, como para as citações bibliográficas. Em muitos casos isto significa manter o primeiro nome e o último sobrenome e abreviar os demais sobrenomes:

Paulo Fernando de Vargas Peixoto escreve Paulo V. Peixoto ou Peixoto P.V.; Franklin Riet-Correa Amaral escreve Franklin Riet-Correa ou Riet-Correa F.; Silvana Maria Medeiros de Sousa Silva poderia usar Silvana M.M.S. Silva, inverso Silva S.M.M.S., ou Silvana M.M. Sousa-Silva, inverso, Sousa-Silva

S.M.M., ou mais curto, Silvana M. Medeiros-Silva, e inverso, Medeiros-Silva S.M.; para facilitar, inclusive, a moderna indexação, recomenda-se que os trabalhos tenham o máximo de 8 autores;

c) o **ABSTRACT** deverá ser apresentado com os elementos constituintes do RESUMO em português, podendo ser mais explicativos para estrangeiros. Ambos

devem ser seguidos de “INDEX TERMS” ou “TERMOS DE INDEXAÇÃO”, respectivamente;

d) o **RESUMO** deve apresentar, de forma direta e no passado, o que foi feito e estudado, indicando a metodologia e dando os mais importantes resultados e conclusões.

Nos trabalhos em inglês, o título em português deve constar em negrito e entre colchetes, logo após a palavra RESUMO;

e) a **INTRODUÇÃO** deve ser breve, com citação bibliográfica específica sem que a mesma assuma importância principal, e finalizar com a indicação do objetivo do trabalho;

f) em **MATERIAL E MÉTODOS** devem ser reunidos os dados que permitam a repetição do trabalho por outros pesquisadores. Na experimentação com animais, deve constar a aprovação do projeto pela Comissão de Ética local;

g) em **RESULTADOS** deve ser feita a apresentação concisa dos dados obtidos. Quadros devem ser preparados sem dados supérfluos, apresentando, sempre que indicado, médias de várias repetições. É conveniente, às vezes, expressar dados complexos por gráficos (Figuras), ao invés de apresentá-los em Quadros extensos;

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

i) as **CONCLUSÕES** devem basear-se somente nos resultados apresentados no trabalho;

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

k) a Lista de **REFERÊNCIAS**, que só incluirá a bibliografia citada no trabalho e a que tenha servido como fonte para consulta indireta, deverá ser ordenada alfabeticamente pelo sobrenome do primeiro autor, registrando-se os nomes de

todos os autores, em caixa alta e baixa (colocando as referências em ordem cronológica quando houver mais de dois autores), o título de cada publicação e, abreviado ou por extenso (se tiver dúvida), o nome da revista ou obra, usando as instruções do “Style Manual for Biological Journals” (American Institute for Biological Sciences), o “Bibliographic Guide for Editors and Authors” (American Chemical Society, Washington, DC) e exemplos de fascículos já publicados (www.pvb.com.br).

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

a) os trabalhos devem ser submetidos **segundo o exemplo de apresentação de fascículos recentes da revista e do modelo constante do site sob “Instruções**

aos Autores” (www.pvb.com.br). A digitalização deve ser na fonte **Helvética, corpo 11, entrelinha simples**; a **página** deve ser **no formato A4, com 2cm de**

margens (superior, inferior, esquerda e direita), o texto deve ser corrido e não deve

ser formatado em duas colunas, com as legendas das figuras e os Quadros no final

(logo após as REFERÊNCIAS). As Figuras (inclusive gráficos) devem ter seus arquivos fornecidos separados do texto. Quando incluídos no texto do trabalho, devem ser introduzidos através da ferramenta “Inserir” do Word; pois imagens copiadas e coladas perdem as informações do programa onde foram geradas, resultando, sempre, em má qualidade;

b) a redação dos trabalhos deve ser concisa, com a linguagem, tanto quanto possível, no passado e impessoal; no texto, os sinais de chamada para notas de rodapé serão números arábicos colocados em sobrescrito após a palavra ou frase que motivou a nota. Essa numeração será contínua por todo o trabalho; as notas serão lançadas ao pé da página em que estiver o respectivo sinal de chamada. Todos os Quadros e todas as Figuras serão mencionados no texto. Estas remissões

serão feitas pelos respectivos números e, sempre que possível, na ordem crescente

destes. ABSTRACT e RESUMO serão escritos corridamente em um só parágrafo e não deverão conter citações bibliográficas.

c) **no rodapé da primeira página deverá constar endereço profissional completo de todos os autores e o e-mail do autor para correspondência, bem como e-mails de outros autores;**

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

e) citações bibliográficas serão feitas pelo sistema “autor e ano”; trabalhos de até três autores serão citados pelos nomes dos três, e com mais de três, pelo nome do primeiro, seguido de “et al.”, mais o ano; se dois trabalhos não se distinguirem por esses elementos, a diferenciação será feita através do acréscimo de letras minúsculas ao ano, em ambos. **Trabalhos não consultados na íntegra pelo(s) autor(es), devem ser diferenciados, colocando-se no final da respectiva referência, “(Resumo)” ou “(Apud Fulano e o ano.)”;** a referência do trabalho que serviu de fonte, será **incluída na lista uma só vez.** A menção de comunicação pessoal e de dados não publicados é feita no texto somente com citação de Nome e Ano, colocando-se na lista das Referências dados adicionais, como a Instituição de origem do(s) autor(es). Nas citações de trabalhos colocados entre parênteses, **não se usará vírgula entre o nome do autor e o ano, nem ponto-e-vírgula após cada ano;** a separação entre trabalhos, nesse caso, se fará apenas por vírgulas, exemplo: (Christian & Tryphonas 1971, Priester & Haves 1974, Lemos et al. 2004, Krametter-Froetcher et. al. 2007);

f) a Lista das **REFERÊNCIAS** deverá ser apresentada **isenta do uso de caixa alta**, com os nomes científicos em itálico (grifo), **e sempre em conformidade com o padrão adotado nos últimos fascículos da revista**, inclusive quanto à ordenação de seus vários elementos.

3. As Figuras (gráficos, desenhos, mapas ou fotografias) **originais devem ser preferencialmente enviadas por via eletrônica.** Quando as fotos forem obtidas através de câmeras digitais (com extensão “jpg”), os arquivos deverão ser enviados como obtidos (sem tratamento ou alterações). Quando obtidas em papel ou outro suporte, deverão ser anexadas ao trabalho, mesmo se escaneadas pelo autor. Nesse caso, cada Figura será identificada na margem ou no verso, a traço leve de lápis, pelo respectivo número e o nome do autor; havendo possibilidade de dúvida, deve ser indicada a parte inferior da figura

pela palavra “pé”. A chave das convenções adotadas será incluída preferentemente, na área da Figura; evitar-se-á o uso de título ao alto da figura. Fotografias deverão ser apresentadas preferentemente em preto e branco, em papel brilhante, ou em diapositivos (“slides”). Para evitar danos por grampos, desenhos e fotografias deverão ser colocados em envelope.

Na versão online, fotos e gráficos poderão ser publicados em cores; na versão impressa, somente quando a cor for elemento primordial a impressão das figuras poderá ser em cores.

4. As legendas explicativas das Figuras conterão informações suficientes para que estas sejam compreensíveis, (até certo ponto autoexplicativas, com independência do texto) e **serão apresentadas no final do trabalho.**

5. Os Quadros deverão ser explicativos por si mesmos e **colocados no final do texto.** Cada um terá seu título completo e será caracterizado por dois traços longos, um acima e outro abaixo do cabeçalho das colunas; entre esses dois traços poderá haver outros mais curtos, para grupamento de colunas. **Não há traços verticais. Os sinais de chamada serão alfabéticos, começando, se possível, com “a” em cada Quadro;** as notas serão lançadas logo abaixo do Quadro respectivo, do qual serão separadas por um traço curto à esquerda.