

PATRICIA MARIA ROCHA GONÇALVES

Escherichia coli COM DETECÇÃO DO GENE *iss* POR PCR,
MICOPLASMAS E SALMONELAS NA QUALIDADE SANITÁRIA
DE FRANGOS DE CORTE AO ABATE

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para a obtenção do Grau de Doutor. Área de Concentração: Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Antônio Trindade de Oliveira

Co-orientador: Prof. Dr. Elmiro Rosendo do Nascimento

Niterói-RJ
2005

PATRICIA MARIA ROCHA GONÇALVES

Escherichia coli COM DETECÇÃO DO GENE *iss* POR PCR,
MICOPLASMAS E SALMONELAS NA QUALIDADE SANITÁRIA
DE FRANGOS DE CORTE AO ABATE

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para a obtenção do Grau de Doutor. Área de Concentração: Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Luiz Antônio Trindade de Oliveira
Universidade Federal Fluminense

Prof. Dr. Elmiro Rosendo do Nascimento
Universidade Federal Fluminense

Prof. Dra. Maristela Lovato Flores
Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. Gilberto Brasil Lignon
Embrapa Agrobiologia

Profa. Dra. Maria da Graça Fichel do Nascimento
Embrapa Agroindústria de Alimentos

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Elmiro Rosendo do Nascimento pela oportunidade, pelo seu respeito e profissionalismo, por mostrar que é possível trabalhar em equipe de forma séria e digna, pela confiança, paciência, orientação e por todos os seus ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Luiz Antônio Trindade de Oliveira pelo estímulo, amizade e orientação, mesmo nos momentos mais difíceis. Obrigada por “não ter abandonado o barco”.

À Profa. Dra. Virginia Léo de Almeida Pereira por ter dividido seu trabalho comigo, por sua ajuda, sua amizade, seu apoio e seu incentivo constantes, sem os quais não teria sido possível a realização deste trabalho.

À Rita de Cássia Figueira Silva da PESAGRO-RIO por sua colaboração nas necropsias e pelo constante incentivo.

À doutoranda Juliana Ferreira de Almeida pelo treinamento e auxílio prestado no Laboratório de Epidemiologia Molecular da Faculdade de Veterinária da UFF.

À Profa. Maria Lúcia Barreto pelas atividades realizadas no Núcleo de Diagnóstico de Micoplasmoses da UFF.

Às empresas avícolas em São José do Vale do Rio Preto, em especial ao Sr. José Bravo Scistowicz, pelo fornecimento dos frangos para o estudo.

Ao Prof. Dr. Sérgio Carmona de São Clemente, ex-coordenador do curso de pós-graduação, por ter se empenhado na aquisição de parte do material utilizado neste estudo, bem como por ter sempre acreditado e confiado em mim.

Às professoras Maria Helena Cosendey de Aquino e Valéria de Moura Abreu pelo fornecimento do material para a realização dos antibiogramas.

Ao José Wilson Miguel Albuquerque da Gerência de Imunobiológicos e à Lilian Ribeiro Seródio do Departamento de Vacinas e Vírus, ambos do Instituto Vital Brazil, pela liofilização das amostras de *E. coli*.

Ao Drausio de Paiva Ferreira, secretário da Coordenação de Pós-graduação, pela ajuda prestada sempre que necessária.

À CAPES pelo auxílio financeiro.

SUMÁRIO

RESUMO, p. 9

ABSTRACT, p. 10

1 INTRODUÇÃO, p. 11

2 REVISÃO DE LITERATURA, p. 14

2.1 PRODUÇÃO, COMERCIALIZAÇÃO E CONSUMO DE CARNE DE FRANGO, p. 14

2.2 HIGIENE E QUALIDADE DA CARNE DE FRANGO, p. 18

2.3 IMPORTÂNCIA DOS PROBLEMAS RESPIRATÓRIOS EM FRANGOS DE CORTE, p. 20

2.4 *ESCHERICHIA COLI*, p. 23

2.4.1 Fatores de virulência de *Escherichia coli*, p. 25

2.4.1.1 Gene *iss*, p. 26

2.4.2 Resistência aos antimicrobianos e suas implicações em saúde pública, p. 28

2.5 MICOPLASMA, p. 30

2.5.1 *Mycoplasma gallisepticum* e *M. synoviae*, p. 31

2.5.2 Sinais, sintomas e lesões, p. 31

2.5.3 Transmissão e hospedeiros, p. 32

2.5.4 Importância econômica, p. 32

2.5.5 Diagnóstico, p. 33

2.5.6 Controle da Micoplasmose, p. 34

2.6 OUTRAS DOENÇAS RESPIRATÓRIAS DE IMPORTÂNCIA NA AVICULTURA INDUSTRIAL, p. 34

2.7 GÊNERO *SALMONELLA*, p. 37

2.7.1 Salmonelose aviária, p. 39

2.7.2 Salmonelose em seres humanos, p. 41

2.7.3 *Salmonella* na indústria avícola, p. 42

3 MATERIAL E MÉTODOS, p. 45

3.1 OBTENÇÃO DOS FRANGOS DE CORTE, p. 45

3.2 Coleta de material, p. 46

3.2.1 Coleta de sangue dos frangos, p. 46

3.2.2 Necropsia e pesagem dos frangos, p. 46

3.3	SOROLOGIA PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA MICOPLASMAS,	p. 47
3.4	EXAME BACTERIOLÓGICO,	p. 47
3.4.1	Isolamento de <i>Mycoplasma gallisepticum</i> e <i>M. synoviae</i> ,	p. 47
3.4.2	Isolamento e identificação de <i>Escherichia coli</i> ,	p. 48
3.4.2.1	Enriquecimento e Plaqueamento,	p. 48
3.4.2.2	Identificação bioquímica,	p. 48
3.4	REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE,	p. 50
3.4.1	Extração de DNA,	p. 50
3.4.1.1	Protocolo 1,	p. 50
3.4.1.2	Protocolo 2,	p. 51
3.4.1.3	Protocolo 3,	p. 51
3.4.2	Amplificação do DNA,	p. 52
3.4.3	Eletroforese em gel de agarose,	p. 53
3.5	TESTE DE ANTIBIOGRAMA,	p. 53
3.6	PESQUISA DE <i>SALMONELLA</i> SPP.,	p. 54
3.6.1	Enriquecimento,	p. 54
3.6.2	Isolamento,	p. 54
3.6.3	Identificação bioquímica preliminar,	p. 54
3.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA,	p. 57

4 RESULTADOS, p. 58

5 DISCUSSÃO, p. 65

6 CONCLUSÕES, p. 69

7 OBRAS CITADAS, p. 70

8 ANEXOS, p. 82

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1. Fotografia do gel de agarose da PCR para gene *iss* das amostras de *E. coli* isoladas de sacos aéreos, p. 59

FIGURA 2. Fotografia do gel de agarose da PCR para gene *iss* das amostras de *E. coli* isoladas de traquéia, p. 60

LISTA DE QUADROS E TABELAS

- QUADRO 1.** Esquema de Kauffmann-White: espécies, subespécies e sorotipos de *Salmonella* e seu habitat comum, p. 38
- QUADRO 2.** Data da coleta e idade em dias dos frangos de corte retirados do caminhão de transporte na saída para o abate, p. 45
- QUADRO 3.** Identificação bioquímica presuntiva de *Salmonella* spp., p. 55
- QUADRO 4.** Diferenciação de *Salmonella* spp., p. 56
- TABELA 1.** Problemas respiratórios e isolamento de *E. coli* em frangos de corte estudados na saída para o abate, p. 58
- TABELA 2.** Valores de Regressão para peso de frangos de corte na saída para o abate como variável dependente frente a dois fatores independentes (ECS e ECT), p. 60
- TABELA 3.** Valores de Regressão para problemas respiratórios em frangos de corte na saída para o abate como variável dependente frente a dois fatores independentes (ECS e ECT), p. 61
- TABELA 4.** Presença de problemas respiratórios em relação a faixa de peso corporal em frangos de corte na saída para o abate com isolamento positivo para *E. coli*, p. 62
- TABELA 5.** Número de frangos de corte positivos ao isolamento de *E. coli* e presença de lesões simples ou associadas, p. 62
- TABELA 6.** Resistência e sensibilidade das cepas de *E. coli* iss positivas para antimicrobianos utilizados no antibiograma, p.63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABEF	Associação Brasileira de Produtores e Exportadores de Frangos
APEC	<i>Escherichia coli</i> patogênica para aves
APPCC	Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle
ECS	Isolamento de <i>E. coli</i> de sacos aéreos
ECT	Isolamento de <i>E. coli</i> de traquéia
ELISA	"Enzyme –linked immunosorbent assay"
EUA	Estados Unidos da América
HI	Inibição da hemaglutinação
iss	"increased serum survival"
LIA	Ágar lisina ferro
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil
MG	<i>Mycoplasma gallisepticum</i>
MS	<i>Mycoplasma synoviae</i>
OIE	Organização Mundial de Saúde Animal
ORT	<i>Ornithobacterium rhinotracheale</i>
pb	pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PESAGRO-RIO	Empresa de Pesquisa Agropecuária do Rio de Janeiro
PESO	Peso dos frangos
PIB	Produto interno bruto
PNSA	Programa Nacional de Sanidade Avícola
PPHO	Procedimento Padrão de Higiene Operacional
PPLO	"Pleuropneumonia-like-organisms"
PR	Problemas respiratórios
SAR	Soroaglutinação rápida
SCI	Síndrome da cabeça inchada
SIF	Serviço de Inspeção Federal
SIM	Ágar sulfeto indol motilidade
TE	Tris-EDTA
TSI	Ágar tríplice açúcar ferro
UBA	União Brasileira de Avicultura
UFF	Universidade Federal Fluminense

RESUMO

A indústria avícola representa, atualmente, um dos mais importantes setores do agronegócio no Brasil tornando-o líder mundial na exportação de carne de frango. A segurança alimentar e a saúde animal têm acompanhado e favorecido essa condição. Entretanto, a intensificação da produção aumenta o risco de disseminação de doenças infecciosas de grande impacto econômico, especialmente as que afetam o sistema respiratório das aves. O objetivo do presente estudo epidemiológico transversal foi relacionar problemas respiratórios com a presença de *Escherichia coli*, *Mycoplasma gallisepticum* (MG) e *M. synoviae* (MS) em frangos de corte na saída para o abate, bem como verificar a virulência dos isolados de *E. coli*, pela detecção do gene *iss* pela reação em cadeia da polimerase (PCR). A resistência das *E. coli iss* positivas a antimicrobianos e a presença de salmonelas também foram verificadas, nos mesmos frangos, pela sua importância em saúde pública. Foram utilizados 120 frangos de corte, aparentemente saudáveis, obtidos em São José do Vale do Rio Preto no estado do Rio de Janeiro, Brasil. Os frangos foram obtidos na saída para o abate, examinados, pesados e com amostra de sangue colhida. O soro obtido foi utilizado na soroprecipitação rápida para MG e MS. Foram coletados suabes e fragmentos de sacos aéreos e traquéias para o isolamento e identificação de *E. coli* e micoplasmas, e suabe de cloaca para cultivo de salmonelas. As cepas de *E. coli* aviárias patogênicas foram identificadas por PCR (gene *iss*) e submetidas ao teste do antibiograma. A interferência de *E. coli* no peso, nas manifestações respiratórias e nas lesões (aerossaculite, pericardite, traqueíte) encontradas à necropsia dos frangos foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$). A presença de aerossaculite e/ou pericardite, na maioria dos frangos, depreciou a qualidade sanitária dos mesmos na saída para o abate. A detecção do gene *iss* ocorreu em 10,2% (12/118) das aves positivas para *E. coli*. Os isolados de *E. coli iss* positivos exibiram resistência a pelo menos 10 dos 20 antimicrobianos testados, sendo todos sensíveis à amicacina e ao aztreonam e resistentes a ampicilina, clindamicina, eritromicina, penicilina, teicoplanina, tetraciclina e vancomicina. Todos os frangos foram negativos à SAR para MG e MS e não houve isolamento de *Mycoplasma* nem de *Salmonella* spp. nos mesmos.

Palavras-chave: frango de corte, aerossaculite, *E. coli*, gene *iss*

ABSTRACT

The poultry industry represents, currently, one of the most important segments of the agrobusiness in Brazil, rendering our country a world leader in broiler meat exportation. Food safety and animal health has greatly favored that with the ultimate growing of poultry raising. However, that production improvement has enhanced the risk of infectious disease spreading, mainly those that affect bird respiratory system. The present cross-sectional epidemiologic study was designed to relate respiratory problems with *Escherichia coli*, *Mycoplasma gallisepticum* (MG) and *M. synoviae* (MS) in broilers, as well as to investigate the virulence of the *E.coli* isolates by the PCR detection of the *iss* gene. Additionally, the antimicrobial resistance of *iss E.coli* isolates and salmonellas were searched in the studied birds, due to their public health implications. Hundred-twenty, apparently healthy broilers, at slaughter time, and coming from a broiler premise in São José do Vale do Rio Preto municipality, Rio de Janeiro State, Brazil were used. The birds were examined, weighted, and subjected to blood collection for serum agglutination reaction (SAR) to MG and MS and necropsied. During necropsy, swabs and fragments of air sacs and trachea were obtained for isolation of *E. coli* and mycoplasmas, besides cloacal swabs for detection of *Salmonella* spp. Pathogenic *E. coli* isolates were accessed by PCR to the *iss* gene and subjected to antimicrobial sensitivity test. The interference of *E. coli* on broiler weight, respiratory manifestations and lesions (tracheitis, airsacculitis and pericarditis) at gross examination, was verified and found to be statistically significant ($p < 0,05$). Airsacculitis and/or pericarditis, present in most of the broilers, affected carcass sanitary quality. The *iss* gene was detected in 10.2% (12/118) of the *E. coli* positive broilers. These 12 *iss* pathogenic *E. coli* were resistant to at least 10 of the 20 antimicrobials tested, being sensitive to ampicillin and aztreonam, and resistant to ampicillin, clindamycin, erythromycin, penicillin, teycoplanin, tetracycline and vancomycin. All broilers were negative by SAR to MG and MS, and there was no isolation for *Mycoplasma* and *Salmonella* spp.

Key words: broiler, airsacculitis, *E. coli*, *iss* gene

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos maiores produtores mundiais e líder em exportações de carne de frango. O setor avícola no país cresce, ocasionando avanços na economia, gerando empregos no país e movimentando bilhões de reais. A boa qualidade dos produtos, o esforço do setor para ampliar os mercados consumidores, a disponibilidade da produção de grãos, além do aumento a cada ano da produção brasileira demonstram que o país possui um potencial muito grande para a produção de carne de frango (SCHORR, 2002; ABEF, 2005).

Por tais razões, a sanidade da avicultura brasileira merece especial atenção para que o seu padrão de qualidade não seja prejudicado. A intensificação da produção contribui para a produtividade e eficiência da indústria avícola, porém como consequência aumenta o risco de disseminação das doenças infecciosas e a necessidade de um maior controle da qualidade dos produtos. Dentre as doenças importantes em avicultura destacam-se, especialmente, as que afetam o sistema respiratório das aves, por causarem um impacto sobre o custo de produção de frangos (GAMA, 2004).

Nos Estados Unidos da América (EUA), as doenças respiratórias são as principais responsáveis pela mortalidade e pelas condenações na indústria avícola. Os produtores e os especialistas em sanidade avícola consideram as doenças respiratórias, como as de maior significado econômico. Quase a totalidade das condenações nos matadouros nos EUA é devida a aerossaculite e septicemia que, na sua maioria, são alterações decorrentes de doenças respiratórias ocasionadas por infecção pela bactéria *Escherichia coli* (ROSALES, 1991; NCRA, 2005). No Brasil, também existem relatos do aumento das condenações de aves em matadouros pela presença de lesões nos sacos aéreos, com a *E. coli* como principal agente bacteriano isolado dessas lesões, em infecções simples ou associadas a

outros microrganismos, como o *Mycoplasma gallisepticum* (MG) e/ou *M. synoviae* (MS) (MINHARRO et al., 2001).

A *E. coli*, normalmente encontrada no trato intestinal de aves, apresenta cepas patogênicas por possuírem fatores de virulência. Os mecanismos de virulência identificados em cepas de *E. coli* patogênica para aves (APEC), ainda pouco conhecidos, necessitam de maiores estudos, pois um maior conhecimento dos fatores de virulência auxilia no desenvolvimento de métodos de diagnóstico, controle, prevenção e tratamento das doenças ocasionadas ou agravadas por essa bactéria. Dentre os genes de virulência encontrados em APEC, o gene "increased serum survival" (*iss*), é importante por conferir à bactéria resistência aos efeitos bactericidas do soro do hospedeiro (DHO-MOULIN e FAIRBROTHER, 1999). Os sorotipos de *E. coli* relacionados à colibacilose aviária não provocam doenças nos seres humanos, porém, com o uso inadequado de antimicrobianos nos plantéis avícolas, podem tornar-se resistentes e esta resistência ser transferida para outras enterobactérias patogênicas para o homem (BREMNER, 1981).

O controle e a prevenção sanitária são requisitos fundamentais para garantir à avicultura brasileira o mercado internacional para seus produtos (QUEVEDO, 2005). A presença de bactérias, que estão constantemente envolvidas em problemas respiratórios nas produções, como a *E. coli* e os micoplasmas, pode representar barreira sanitária ao comércio de produtos avícolas. O estudo desses microrganismos se faz, então, fundamental na contribuição para o melhor conhecimento dos aspectos sanitários da indústria avícola.

A presença de salmonelas é um outro problema que compromete a sanidade avícola e a saúde pública. A *Salmonella* é considerada o mais comum patógeno bacteriano responsável por doenças transmitidas por alimentos de origem avícola para os seres humanos. O seu controle em aves é primordial, principalmente a sua detecção precoce e emprego de programas de monitoramento, pois as salmonelas estão associadas a perdas econômicas severas (HAFEZ, 2005).

A segurança e a qualidade dos alimentos são questões de grande preocupação em produtos avícolas, pois a carne de aves pode conter diversos patógenos alimentares. As alterações nos padrões de qualidade sanitária dos alimentos significam barreiras não tarifárias que ocasionam milhares de prejuízos, aduzindo-se a isto os gastos no diagnóstico de doenças e o desperdício de proteína de origem animal. Atualmente, os esforços do setor avícola em garantir produtos de

alta qualidade contribuem para a manutenção do produto nacional num patamar aceitável nas negociações internacionais, inclusive por mercados consumidores extremamente exigentes (DELAZARI, 2003; QUEVEDO, 2005).

O objetivo do presente estudo foi relacionar problemas respiratórios com a presença de *E. coli*, MG e MS em frangos de corte na saída para o abate, bem como verificar a virulência dos isolados de *E. coli*, pela detecção do gene *iss*, por PCR. A resistência das *E. coli iss* positivas a antimicrobianos e a presença de *Salmonella* spp. também foram verificadas, nos mesmos frangos, pela sua importância em saúde pública.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PRODUÇÃO, COMERCIALIZAÇÃO E CONSUMO DE CARNE DE FRANGO

A moderna indústria de frangos de corte surgiu somente por volta de 1940 e a carne de frango passou, então, a ser produzida em grandes quantidades. A carne de frango serve como matéria-prima para a produção de diversos alimentos devido ao seu baixo custo e sua excelente qualidade nutricional, entre outros aspectos. Os produtos de carne de frango podem ser encontrados em pedaços, como ingredientes de outros alimentos, na forma de patês, carcaças resfriadas ou congeladas, demonstrando a versatilidade desse alimento que vem por tanto tempo fazendo parte da alimentação humana (CHARLES, 2005).

As vantagens do consumo de carne de frango são muitas. Além de ser uma excelente fonte de proteínas de fácil digestão e alta qualidade biológica, apresenta baixo teor de gorduras compostas por ácidos graxos assimiláveis, é rica em vitaminas, é um produto de fácil aquisição e aceitável por todas as camadas sociais (BOTTEZINI et al., 2005; FIGUEIREDO, 2005).

A demanda mundial de carne de frango aumentou e a produção brasileira acompanhou o crescimento. O crescimento do setor avícola também demonstra mudanças nos hábitos alimentares da população. Este aumento do mercado de carne de aves é significativo desde 1990. De acordo com a Associação Brasileira de Produtores e Exportadores de Frangos (ABEF), em 1993, o consumo brasileiro de carne de frango foi de 17,87 kg/habitante (ABEF, 2005). Já em 2003, este consumo foi de 33,34 kg/habitante demonstrando o aumento da opção pela carne de frango por parte dos brasileiros. O aumento desse consumo pode ser explicado pelo fato da carne de frango apresentar preços mais baixos do que as demais, pelos seus diversos produtos derivados, pelas suas boas características nutricionais, por não

haver restrições religiosas ao seu consumo, bem como pela sua forma de produção flexível e relativamente fácil devido ao ciclo curto e intensificado da sua produção (ABEF, 2005; SILVA, 2005b).

Nos EUA, o consumo de carne de frango também é crescente, conforme demonstram as pesquisas do Departamento de Agricultura deste país. Acredita-se que a expansão do consumo continuará em 2005 com a expectativa de atingir 39,2 kg "per capita". Entretanto, a produção interna de carne de frango dos EUA manter-se-á em índices inferiores, favorecendo o Brasil que é um país exportador (ANÔNIMO, 2005a).

No Brasil, a cadeia produtiva de carne de frango é uma das mais importantes da agropecuária. Nesta cadeia, pode-se incluir todos os itens do sistema de produção, processamento, mercado atacadista e varejista, ou seja, além das granjas, a genética, a nutrição, a sanidade, os equipamentos, a assistência técnica, os laboratórios de diagnóstico, as cooperativas de crédito, as plantas de abate e processamento, os sistemas de transporte e comercialização, demonstrando que a avicultura de corte de porte empresarial é importante para a geração de renda, emprego e divisas no país (FIGUEIREDO, 2005).

Em 1998, a avicultura brasileira começava a se destacar, dentro das cadeias agro-alimentares, como a de maior eficiência no mundo (SILVA e DUARTE, 2002). Neste ano, o valor do produto interno bruto (PIB) da avicultura de corte no varejo foi de R\$ 3,12 bilhões com ração, R\$ 1,08 bilhões com salários, R\$ 339 milhões com impostos indiretos e R\$ 100 milhões com pesquisa e desenvolvimento superando o PIB da avicultura de postura (FIGUEIREDO, 2005).

A tecnologia existente no Brasil é bastante avançada e capaz de melhorar sobremaneira a produção avícola nacional. Há espaço para produção de carne em quase todas as regiões do país e o produto apresenta-se competitivo em qualquer mercado. A indústria de frango supriu o aumento da demanda interna e das exportações, por meio do aprimoramento tecnológico da produção, evidenciado pela adoção de algumas medidas, como a constante seleção genética das aves, o que ocasionou o rápido crescimento e uma melhor conversão alimentar das mesmas, além do controle profilático de doenças, responsáveis pelos principais problemas econômicos (DEKICH, 1998; UBA, 2004).

A cadeia de produção de carne de frango remunera relativamente bem o trabalho e a produção, contribuindo para o desenvolvimento econômico e social do

país. A dimensão e a organização da cadeia de carne de frango do Brasil fizeram com que no ano de 1998, o país se tornasse o terceiro produtor e exportador mundial de carne de frango atingindo 4,7 milhões de toneladas, inferior apenas aos EUA e à China (ABEF, 2005; FIGUEIREDO, 2005).

Em 1999, a produção mundial de aves elevou-se em quase 3%, continuando a expandir-se de forma mais rápida do que qualquer outro tipo de carne. O aumento foi de aproximadamente 10% no Brasil que, juntamente com os EUA e a China, respondia por mais da metade da produção mundial de aves (BROWN, 2005).

De acordo com a Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação, de 1991 a 2001, o plantel mundial de aves cresceu, aproximadamente, 36%, enquanto que o de bovinos e o de suínos apresentaram um crescimento bem inferior, de 3% e 5%, respectivamente. A produção de carne de aves existe em todos os continentes desde as criações nas granjas até o processamento nas indústrias, sendo que a carne de frango representa mais de 90% do comércio de carne de aves no mundo. O Brasil, os EUA, a China e a União Européia são os principais exportadores de carne de frango. A China, a Rússia, o Japão, a Arábia Saudita e o México encontram-se como os maiores compradores. A produção brasileira de frangos de corte é um dos maiores sucessos do competitivo setor do agronegócio, tornando o Brasil um dos principais países no comércio internacional de carne de frango devido aos investimentos para a obtenção de alta qualidade nos seus produtos. O produto brasileiro possui uma qualidade capaz de atender aos exigentes mercados japonês e europeu, que compram desde cortes até os produtos industrializados. Além disto, o Brasil vende frango inteiro para o Oriente Médio, atendendo também as exigências de procedimentos Islâmicos como o abate Halal (SILVA, 2004b; SILVA, 2005b).

Os últimos dados da ABEF demonstram que, em 2003, o consumo de carne de frango no mercado interno alcançou a 5,9 milhões de toneladas ficando em torno de 33 kg/habitante e que o volume de exportação alcançou a 1,9 milhões de toneladas (ANÔNIMO, 2004). O Brasil, em 2003, atingiu uma produção de 7,8 milhões de toneladas, o setor avícola apresentou um crescimento de 4,34% e foram abatidos no país 3,71 bilhões de frangos. O número de países compradores da carne de frango brasileira neste ano já era de 122, sendo que 1,92 milhões de toneladas de frangos inteiros e cortes e 37,7 mil toneladas de produtos processados foram exportados neste mesmo ano (UBA, 2004; ABEF, 2005).

Segundo a União Brasileira de Avicultura (UBA), o setor avícola é o terceiro maior exportador de alimentos do Brasil (UBA, 2004). As estimativas de produção para 2004 foram de 8,4 milhões de toneladas de carne de frango superando em 10,5% a produção de 2003. As exportações brasileiras de frango, em 2004, apresentaram um aumento de aproximadamente 46%, totalizando 2,49 milhões de toneladas. Nesse mesmo ano, a produção avícola cresceu principalmente devido ao aumento do volume de alojamento de matrizes, o que criou condições para o aumento da produção. A projeção para 2005 é de 8,8 milhões de toneladas, 5% a mais do que a produção de carne de frango prevista para 2004 (UBA, 2004; ANÔNIMO, 2005b; ROCHA, 2005).

A qualidade e a competitividade do produto brasileiro são confirmadas pelo aumento no consumo interno e no volume de carne exportada (ANÔNIMO, 2000). O otimismo do setor que confia no contínuo crescimento do Brasil prevê que o consumo no mercado interno, em 2005, também será favorecido (ROCHA, 2005).

Países como a Tailândia, um dos principais afetados pela influenza aviária ou gripe das aves, estão se voltando aos seus mercados internos devido ao embargo de vários países aos seus produtos. Como a Ásia ainda se recupera dos problemas ocasionados pela gripe das aves, o Brasil deve beneficiar-se disso em 2005, por ser livre dessa doença, e o crescimento da produção do país será sustentado pela contínua demanda internacional (ROCHA, 2005). Alguns estudos relatam que o índice de crescimento demográfico será maior em países que possuem um baixo consumo de carne de aves, por sua vez aumentando a demanda por estas carnes, o que é de grande valor para países exportadores como o Brasil (SILVA, 2005b).

A disponibilidade da produção de grãos condiciona a produção de proteínas de origem animal. Nas próximas duas décadas, estima-se um aumento de 30% da demanda mundial de carne. Pelo seu potencial, o Brasil é o país com maior possibilidade de ser o provedor das necessidades mundiais de produtos avícolas no futuro (SCHORR, 2002). A boa qualidade da avicultura brasileira é o resultado do processo de integração bem estruturado entre a indústria e os produtores avícolas (SILVA, 2004b).

A globalização da economia é responsável pela necessidade de melhorar as tecnologias utilizadas nas atividades avícolas, pois a competitividade no setor é muito grande e o consumidor, cada vez mais exigente, requer a presença de produtos de alta qualidade. Ao mesmo tempo, com a globalização, a qualidade dos

alimentos passou a ser uma questão estratégica primordial nas negociações entre os países, pois constitui razão direta dos lucros ou prejuízos no comércio internacional de alimentos. Isto pode ser observado no nosso dia-a-dia, quando vemos nos jornais notícias da suspensão da compra de determinado alimento por um país, devido à não satisfação de pré-requisitos qualitativos à entrada do mesmo em outros mercados. Não há dúvidas: a qualidade dos produtos alimentícios se tornou instrumento poderoso da guerra comercial entre países que entram em disputa por maior acesso de seus produtos à economia global. Nesse sentido, as disputas do Brasil, como um dos maiores produtores de alimentos em termos mundiais, na Organização Mundial do Comércio, com economias da dimensão da norte-americana e da chinesa não deixa margem a dúvidas (QUEVEDO, 2005; SILVA, 2005b).

2.2 HIGIENE E QUALIDADE DA CARNE DE FRANGO

A qualidade geral da carne de frango depende de vários fatores, entre eles o efeito das doenças infecciosas que podem afetá-la em diferentes graus. Em função do grande desenvolvimento no setor avícola, a preocupação com os aspectos higiênico-sanitários dos produtos é fundamental (SILVA, 2004b).

A aparência, a higiene, o sabor e a saúde são os principais fatores considerados pelos consumidores na hora de comprar a carne de frango e seus derivados. A regulamentação que normatiza a produção de carnes de aves, ovos e derivados demonstra essa preocupação e tem buscado atingir os índices de qualidade exigidos pelos mercados nacional e internacional. Tanto o governo quanto as empresas investem na implantação de programas que garantam a qualidade desses produtos de origem animal (OLIVEIRA, 1995; MENDES, 2001; SILVA, 2004b).

Os investimentos em tecnologias avançadas nas áreas de nutrição, genética, manejo e sanidade são cada vez mais necessários, assim como se fazem mais e mais presentes. A área de sanidade tem sido alvo de programas contínuos de pesquisas para diminuir as perdas dos produtores e da indústria, bem como para adequar-se às exigências do mercado internacional (MENDES, 1992).

A garantia da qualidade e da segurança dos alimentos para a manutenção da saúde pública é reconhecida internacionalmente. Muitos avanços ocorridos na área

da tecnologia de alimentos apresentavam como objetivo maior a garantia da qualidade e da inocuidade dos alimentos. Isto ocorre, porque as doenças veiculadas por alimentos representam um dos problemas de saúde mais disseminados e uma importante causa de redução da produtividade econômica (DELAZARI, 2001).

A preocupação com a qualidade e a sanidade de um produto tem como ponto de início a matéria-prima. Nas etapas seguintes do processamento da matéria-prima esta preocupação também é relevante. Entretanto, sem uma matéria-prima de boa qualidade provavelmente não haverá um produto final próprio para o consumo ou que não seja rejeitado pelo consumidor devido ao seu aspecto (OLIVEIRA, 1995).

O cuidado e a adoção de corretas práticas de higiene em todas as etapas do processo produtivo, passando pelas de criação, transporte, processamento industrial, distribuição, armazenamento, até atingir o consumidor final do alimento, influenciam a qualidade e a segurança do produto final oferecido ao consumidor. É importante destacar que a presença de patógenos nas carcaças de aves é originária, fundamentalmente, da ave viva e não do ambiente industrial (LEITÃO, 2001).

Atualmente, a qualidade dos alimentos é uma condição ou fator de compra, principalmente porque as normas e as exigências de controle do comércio de alimentos estão impostas internacionalmente (DELAZARI, 2003). No Brasil, todos os processos de abate e industrialização de aves, sob o Serviço de Inspeção Federal (SIF), devem ser baseados nos planos de Procedimento Padrão de Higiene Operacional (PPHO) e nos planos de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) (DELAZARI, 2001). O Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal estabelece os procedimentos higiênico-sanitários e as especificações de localização, detalhes construtivos e operacionais dos matadouros avícolas (SILVA, 2005a). A Portaria 210 de 1998 estabelece os critérios técnicos da inspeção tecnológica e higiênico-sanitária de carne de aves, determinando as lesões que causam condenação das aves durante o abate, incluindo a aerossaculite (BRASIL, 1998b).

Na indústria avícola mundial, as doenças respiratórias continuam sendo as principais causas de perdas econômicas. Elas são freqüentes em frangos de corte e variam na sua severidade (ROSALES, 1991). A doença respiratória, normalmente, apresenta-se no campo como uma doença de etiologia complexa em que vários agentes atuam de forma sinérgica agravando o quadro clínico das aves. A desordem

no sistema respiratório é intensa e provoca perdas irrecuperáveis no desempenho do lote. Os prejuízos incluem também o aumento dos índices de condenação de carcaças, dos gastos com medicamentos, dos índices de mortalidade e da queda na produção de ovos (GAMA, 2004; SILVA, 2004a).

2.3 IMPORTÂNCIA DOS PROBLEMAS RESPIRATÓRIOS EM FRANGOS DE CORTE

A principal função do sistema respiratório das aves é a troca gasosa entre o ar atmosférico e a corrente sangüínea. Este sistema também está envolvido com a regulação da temperatura corporal e possui características em comum com o sistema respiratório dos mamíferos, entretanto difere em sua anatomia e fisiologia, principalmente, em relação aos sacos aéreos. Os frangos possuem nove sacos aéreos de paredes finas que não participam da troca gasosa com o sangue, mas que conduzem o ar para os pulmões e ocupam todos os espaços vazios da cavidade celomática. Eles participam da inalação, da manutenção do ar e seu direcionamento através dos pulmões, o que os torna mais vulneráveis às partículas inaladas, inclusive bactérias, que se depositam na sua superfície (FEDDE, 1998; WEEBADDA et al., 2001).

Quando os sacos aéreos sofrem danos, eles tornam-se espessos, esbranquiçados, com infiltrados de células inflamatórias e exsudato caseoso. Essas lesões de sacos aéreos, responsáveis por uma série de prejuízos financeiros no setor avícola, podem ocasionar a condenação parcial ou total das carcaças pelo SIF durante o abate (FICKEN, 1996; BRASIL, 1998b).

A produção intensiva no setor avícola cria condições que permitem a ocorrência e a disseminação de doenças infecciosas no trato respiratório (MINHARRO et al., 2001). Atualmente, a indústria avícola é viável apenas por meio da criação em alta densidade. Como consequência, a qualidade do ar respirado piora causando lesão do trato respiratório e criam-se condições ideais para a instalação e a multiplicação de agentes infecciosos respiratórios (GAMA, 2004).

As doenças respiratórias que afetam as criações comerciais de aves são influenciadas por agentes infecciosos, além dos fatores ambientais. Estas doenças são as principais responsáveis por números expressivos de condenações de carcaças por aerossaculite e septicemia, em torno de 90% nos EUA. A maior parte

dos casos de septicemia em frangos corresponde a uma seqüela de enfermidades respiratórias (NCRA, 2005).

No Brasil, alguns autores também já demonstraram a contribuição das enfermidades respiratórias no aumento do índice de condenações de carcaças em matadouros, além de afetarem as criações avícolas comprometendo os aspectos relacionados ao crescimento, a conversão alimentar e a uniformidade dos lotes (MINHARRO et al., 2001; ASSIS et al., 2003).

As indústrias avícolas também se apresentam preocupadas com a prevenção das doenças das aves, pois este é um aspecto de caráter econômico que se constitui em ameaça às indústrias modernas. Em especial, as doenças respiratórias e entéricas são reconhecidamente as principais responsáveis por grandes prejuízos financeiros (DEKICH, 1998). A diminuição do ganho de peso, o custo do tratamento, os efeitos na conversão alimentar, a mortalidade e as condenações durante o processamento influenciam o impacto econômico das infecções respiratórias e, conseqüentemente, o custo de produção de frangos de corte (ROSALES, 1991; MENDES e PATRÍCIO, 2004).

Os fatores ambientais como a temperatura, a umidade, a poeira e os gases, a presença de patógenos no trato respiratório, as infecções por microrganismos oportunistas e a imunossupressão, associados às características genéticas da ave, influenciam na sua susceptibilidade ou resistência às doenças. As doenças respiratórias são resultados das combinações que ocorrem entre estes fatores (NCRA, 2005). As bactérias patogênicas possuem um papel fundamental nas doenças respiratórias das aves domésticas, pois atuam como invasoras secundárias ou podem ser o fator primário responsável pela doença respiratória (GLISSON, 1998).

Uma série de doenças nas aves pode ser induzida pela *E. coli* patogênica para aves (APEC) como a aerossaculite, a pericardite e a salpingite. A infecção mais comum é a do trato respiratório seguida por septicemia (JANSEN et al., 2001). A etiologia das doenças respiratórias das aves é complexa, porém é válido salientar que a *E. coli* participa desta constantemente. A *E. coli* foi reconhecida como o agente etiológico das principais infecções responsáveis por condenações durante o abate, devido às lesões nos sacos aéreos e quadros de septicemia (ROSALES, 1991).

A doença mais importante associada à APEC tem início como uma infecção respiratória citada como uma aerossaculite ou doença dos sacos aéreos. Esta infecção pode evoluir para uma bacteremia e uma infecção generalizada, ocasionar taxas de mortalidade acima de 20%, reduzir o crescimento das aves e a sua eficiência alimentar, além de aumentar as taxas de condenação de carcaças nos matadouros (DHO-MOULIN e FAIRBROTHER, 1999).

A aerossaculite é uma lesão freqüentemente associada à micoplasmose e à colibacilose, embora possa estar presente em outras doenças respiratórias (ALENCAR et al., 1998; NASCIMENTO, 2000). A *E. coli* é considerada um dos principais agentes bacterianos da aerossaculite e de quadros septicêmicos nas aves (MINHARRO et al., 2001).

A perda de peso pelas aves, causada pela aerossaculite, pode ocasionar uma série de falhas tecnológicas durante o abate, como cortes no trato digestivo, pois os equipamentos na linha de abate não se ajustam ao tamanho menor das carcaças. Este erro tecnológico leva a um aumento no percentual de contaminação fecal das carcaças e, portanto, há um maior risco de contaminação das mesmas por bactérias patogênicas. Vários estudos têm demonstrado a associação entre a presença de aerossaculite e o aumento da microbiota bacteriana patogênica em lotes de frangos. Dentre essas bactérias patogênicas estariam a *E. coli*, o *Campylobacter jejuni* e a *Salmonella* spp. (RUSSEL, 2003).

A aerossaculite é uma das principais lesões responsável por condenação total e parcial durante o abate encontrada na linha de inspeção *post-mortem* (BRANCO, 2004). Assis et al. (2003), ao avaliarem as lesões encontradas com maior freqüência e destinadas às condenações parciais, em uma indústria avícola no estado de Santa Catarina, observaram que a aerossaculite apresentou percentual de 7%, 11,5% e 16,8% do total das condenações parciais de frangos com peso médio de 2,110kg, 2,300kg e 2,458kg, respectivamente. A aerossaculite, juntamente com a colibacilose, as fraturas e os hematomas estão entre as principais causas de condenações de carcaças no abate (MENDES, 2004).

Na maior parte dos casos, os problemas respiratórios diagnosticados em frangos de corte não envolvem apenas um agente. Diversos patógenos podem estar implicados com as enfermidades respiratórias em frangos, porém a *E. coli* participa com freqüência de tais enfermidades em associação ou não com outras bactérias, como os micoplasmas. Os vírus respiratórios, os imunossupressores, os fungos e as

bactérias como a *E. coli* se inter-relacionam de modo complexo. Até mesmo as reações pós-vacinais contra a Doença de Newcastle e a Bronquite Infecciosa tornam os pintos mais susceptíveis às infecções secundárias respiratórias, principalmente pela *E. coli*, devido à redução da atividade mucociliar. Os agentes imunossupressores, como o vírus da Doença Infecciosa da Bolsa e as micotoxinas também facilitam a invasão do trato respiratório pela *E. coli* e outros patógenos (MARTINS, 1991; NASCIMENTO, 2000; MINHARRO et al., 2001).

2.4 *ESCHERICHIA COLI*

No gênero *Escherichia* são classificadas cinco espécies: *E. coli*, *E. blattae*, *E. fergusonii*, *E. hermannii* e *E. vulneris*, porém a espécie *E. coli* é considerada a espécie de importância do gênero (HOLT et al., 1994; CAMPOS e TRABULSI, 1999).

A *E. coli* é considerada uma das bactérias de grande interesse da família Enterobacteriaceae. Os organismos da espécie *E. coli* são Gram negativos, possuem a forma de bastonetes, não formam esporos, geralmente são móveis pela presença de flagelos peritríquios, existindo também cepas imóveis, algumas possuem cápsula e são considerados como parte da microbiota normal do trato intestinal do homem e da maioria dos animais de sangue quente (DOYLE e CLIVER, 1990a).

Esta espécie apresenta pelo menos seis categorias conhecidas, com relação às infecções intestinais: *E. coli* enteroinvasora, *E. coli* enterotoxigênica, *E. coli* enteropatogênica, *E. coli* entero-hemorrágica, *E. coli* enteroagregativa e *E. coli* que adere difusamente (CAMPOS e TRABULSI, 1999).

A *E. coli* patogênica para aves, a APEC, pertence ao grupo das *E. coli* patogênicas extra-intestinais. Estas bactérias, nas aves, causam doenças extra-intestinais que podem ocasionar aerossaculite, pericardite, perihepatite, salpingite, onfalite, peritonite e até a morte (MELLATA et al., 2003). A maior parte dos sorotipos de *E. coli* isolados de galinhas é patogênica somente para aves, não causando infecção no homem, nem em outros mamíferos (MENÃO et al., 2002).

Alguns sorovares de *E. coli* patogênica estão envolvidos em doenças respiratórias de frangos e perus devido à presença de polissacarídeos de superfície. A participação dos polissacarídeos na patogênese da doença ainda não é

plenamente conhecida, porém vários fatores de virulência são reconhecidamente responsáveis pela invasão e colonização bacteriana. Além disso, também existem alguns estudos sugerindo que algumas aves são capazes de inalar *E. coli* patogênica e eliminá-la de seu organismo evitando que a bactéria cause alguma enfermidade. O mecanismo de eliminação envolve a presença de fagócitos, entretanto é um mecanismo ainda não bem esclarecido (WEEBADDA et al., 2001).

As cepas pertencentes aos sorogrupos O1, O2 e O78 são as principais responsáveis por doenças respiratórias e pela celulite aviária. A distribuição e a frequência dos sorogrupos podem variar devido aos fatores geográficos e temporais (PEIGHAMBARI et al., 1995; DHO-MOULIN e FAIRBROTHER, 1999; YANG et al., 2004).

As aves, durante o seu ciclo de vida, adquirem diferentes cepas de *E. coli* por contaminação vertical ou horizontal. A contaminação vertical pode ocorrer como consequência de uma salpingite ou durante a postura pela contaminação da casca do ovo. A contaminação horizontal ocorre por meio do contato com outras aves, com fezes, com água ou ração contaminados e, freqüentemente, por via inalatória (DHO-MOULIN e FAIRBROTHER, 1999).

A *E. coli* também pode ser o patógeno primário, embora seja com maior frequência um agente infeccioso secundário em frangos (JEFFREY et al., 2002). Por ser uma bactéria encontrada, normalmente, na microbiota de aves saudáveis, a diferenciação das amostras patogênicas das não patogênicas deve ser feita. A identificação dos fatores de virulência das APEC colabora para o conhecimento dos seus mecanismos de patogenicidade (DHO-MOULIN e FAIRBROTHER, 1999).

As cepas de APEC possuem fatores de virulência específicos e são capazes de causar a colibacilose aviária. Esta doença representa um sério problema na indústria avícola por causar prejuízos econômicos. A mais severa manifestação de colibacilose aviária é a septicemia, caracterizada por aerossaculite, pericardite, perihepatite e salpingite. Estes problemas são responsáveis por alterações indesejáveis nas carcaças e, por isso, ocasionam grandes perdas por condenação no processamento da carne de frangos (CARDOSO et al., 2002; DELICATO et al., 2003).

A APEC causa infecções extra-intestinais, principalmente infecções respiratórias, sendo considerada um patógeno relevante na indústria avícola por contribuir para o agravamento de doenças respiratórias. A maioria das enfermidades

associadas com APEC é secundária a fatores predisponentes do hospedeiro e a fatores ambientais, como, por exemplo, a perda dos cílios das células epiteliais do trato respiratório superior, seguida de exposição das aves à amônia e à poeira pelas aves (DHO-MOULIN e FAIRBROTHER, 1999; FERREIRA e KNÖBL, 2000; TIVENDALE et al., 2004).

A adaptação ao hospedeiro e a virulência de alguns patotipos de *E. coli* são atribuídos à aquisição horizontal de genes específicos por cepas não patogênicas que, então, tornam-se patogênicas (DOZOIS et al., 2003). Ginns et al. (2000) isolaram a cepa de *E. coli* E3 de um surto de doença respiratória em frangos de corte. Ao inocularem suspensões desta bactéria por via respiratória, as aves desenvolveram uma doença semelhante a que ocorreu em campo. No caso da cepa E3, a infecção em frangos pela via respiratória dependeu da presença de plasmídios conjugativos virulentos que conferiram à bactéria a capacidade de colonizar, especificamente, o trato respiratório.

Vários fatores de virulência já foram identificados na APEC, e as propriedades bacterianas associadas a essa virulência incluem a resistência às defesas imunológicas, aderência ao trato respiratório e efeitos citotóxicos (DHO-MOULIN e FAIRBROTHER, 1999; DELICATO et al., 2003).

2.4.1 Fatores de virulência de *Escherichia coli*

A espécie *E. coli* apresenta várias cepas patogênicas para o homem e os animais por possuir fatores específicos que são responsáveis por sua patogenicidade. As cepas patogênicas são divididas em cepas intestinais e cepas extra-intestinais. As cepas extra-intestinais, principalmente de animais, ainda não apresentam os fatores específicos de virulência bem caracterizados. Dentre os fatores de virulência das cepas extra-intestinais pode-se citar: as adesinas e os fatores de colonização, a presença de fímbrias e cápsula, a produção de hemolisina e aerobactina, as propriedades tóxicas, a resistência aos efeitos bactericidas do soro e os efeitos citotóxicos (JANßEN et al., 2001; MAINIL, 2003).

A identificação dos fatores de virulência, que pode ser realizada por métodos de biologia molecular, como a PCR, auxilia a compreensão dos mecanismos de patogenicidade da *E. coli*. Estes mecanismos ainda não foram completamente

esclarecidos, por isso o seu estudo é primordial para o melhor entendimento de como a bactéria causa a doença (DHO-MOULIN e FAIRBROTHER, 1999).

Dentre os mecanismos de virulência encontrados em APEC, a resistência aos efeitos bactericidas do soro, mediada pelo gene *iss*, apresenta-se como um relevante mecanismo, apesar de não ser o único mecanismo utilizado por essas bactérias para alcançar os órgãos internos das aves e causar uma infecção (MELLATA et al., 2003). Tivendale et al. (2004) ao estudarem cepas de APEC observaram que o gene *iss* estava associado com altos níveis de virulência.

2.4.1.1 Gene *iss*

O gene *iss* foi descrito pela primeira vez pelo seu papel na resistência ao soro associado com o plasmídio CoIV em um isolado de *E. coli* humana, aumentando em 100 vezes a virulência de *E. coli* em pintos de um dia de idade. A eliminação deste plasmídio de cepas aviárias reduz a sua patogenicidade e a sua reintrodução na cepa por conjugação restabelece a mesma (BINNS et al., 1979).

Este gene é responsável pelo bloqueio do complexo terminal do sistema do complemento que atua na membrana celular causando a lise da célula. Portanto, ele confere à bactéria resistência ao complemento, que é um mecanismo de defesa do hospedeiro e que atua contra infecções, especialmente infecções bacterianas, pois é capaz de promover a opsonização e lise do agente infeccioso (BINNS et al., 1982).

O gene *iss* é um determinante genético que pode mediar a resistência da bactéria aos efeitos bactericidas do soro do hospedeiro. A expressão deste gene já foi observada aumentando em 20 vezes esta capacidade de resistência das células bacterianas aos efeitos do soro (CHUBA et al., 1986). Estudos genéticos sugerem que o gene *iss* obtido de *E. coli* isolada de humanos é derivado do gene de bacteriófago lambda chamado *bor* (CHUBA et al., 1989; BARONDESS e BECKWITH, 1990).

A contribuição do gene *iss* para a virulência de *E. coli* já foi comprovada. Estudos demonstraram que a associação dele em aves com colibacilose é maior do que em aves aparentemente saudáveis, sugerindo que a sua presença sirva como um marcador da virulência da *E. coli* aviária. A presença do gene *iss* em uma cepa de *E. coli* aviária é uma boa indicação da capacidade bacteriana de causar a

doença. Porém, a ausência do gene *iss* não assegura falta de virulência da *E. coli* (FOLEY et al., 2000; PFAFF-MCDONOUGH et al., 2000).

O gene *iss* codifica a proteína Iss, uma lipoproteína de 10-11 kDa da membrana externa bacteriana, resistente à hidrólise ácida e que contém 102 aminoácidos. Esta proteína, purificada, pode ser utilizada para estimular a produção de anticorpos monoclonais específicos para uso nos estudos e testes de detecção de cepas virulentas de *E. coli* (HORNE et al., 2000; FOLEY et al., 2003).

Ao comparar as seqüências do gene *iss* com o gene *iss* de uma cepa de *E. coli* isolada de humanos, Horne et al. (2000) observaram que o gene *iss* aviário apresentava uma identificação de 96,8% com a cepa humana demonstrando que o gene aviário é muito semelhante ao gene da cepa humana. Entretanto, alguns estudos sugerem que este gene tem maior relevância para a virulência e a resistência da *E. coli* aviária quando comparada com isolados de *E. coli* de humanos (PFAFF-MCDONOUGH et al., 2000).

O gene *iss* está localizado em um plasmídio conjugativo R, com um tamanho aproximado de 100 kilobases, juntamente com outros genes de virulência e de resistência a antimicrobianos. Este plasmídio pode ser transferido, por conjugação, para outras bactérias avirulentas, inclusive outras *E. coli*. Quando isto ocorre, a bactéria que o recebeu adquire a capacidade de produzir colicina, aerobactina, resistência à ampicilina, à tetraciclina e ao complemento (JOHNSON et al., 2002; JOHNSON et al., 2004).

Nolan et al (2002) demonstraram que a resistência de uma cepa à ação do complemento está associada com sua ação letal em embriões de frangos. Em seu trabalho, os isolados que possuíam o gene *iss* foram mais significativamente virulentos e resistentes ao complemento do que aqueles que não o possuíam. Desse modo, os seus ensaios de susceptibilidade ao complemento sugeriram que existe uma relação entre o gene *iss*, a virulência e a resistência ao complemento.

Jeffrey et al. (2002), em seus estudos, sugeriram que cepas de *E. coli*, associadas com casos de celulite 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 e com celulite.

Mellata et al. (2003) observaram a existência de uma correlação entre a resistência ao soro e a capacidade da bactéria em permanecer nos fluidos corporais

e órgãos, sendo que a resistência ao soro foi apenas um dos mecanismos bacterianos de patogenicidade de cepas de APEC.

O gene *iss* foi encontrado como um dos mais freqüentes em isolados de *E. coli* de aves com colibacilose, apesar de vários genes de virulência estarem envolvidos na sua patogênese. Entretanto, a freqüência de gene *iss* é menor em isolados de *E. coli* de aves saudáveis (DELICATO et al., 2003).

Tivendale et al. (2004) demonstraram que o gene *iss* estava associado com a virulência da APEC, após exposição pela via natural, respiratória, da infecção. Esta virulência comumente é demonstrada por meio de experimentos que utilizam a inoculação pela via parenteral, que não é a via normal de infecção.

O uso da reação em cadeia da polimerase (PCR) na rotina de diagnósticos vem recebendo uma grande atenção, pois é uma ferramenta de rápida detecção de organismos infecciosos, que tem sido utilizada para a detecção de vários patógenos a partir de amostras clínicas. Os fatores de virulência, como o gene *iss*, de isolados de *E. coli* aviária podem ser identificados por meio da PCR (STONE et al., 1995; YANG et al., 2004).

2.4.2 Resistência aos antimicrobianos e suas implicações em saúde pública

Um dos grandes interesses na área de saúde pública é a existência de bactérias que colonizam os animais domésticos e que são resistentes a antimicrobianos. A utilização incorreta de antibióticos na medicina humana, o seu uso na alimentação animal com objetivos terapêuticos, profiláticos e de promoção de crescimento são os principais responsáveis pela presença da resistência aos antibióticos em bactérias patogênicas para o homem. Por sua vez, estas bactérias resistentes podem ser transferidas de animais para seres humanos, especialmente nos indivíduos que trabalham diretamente com animais ou em indústrias de processamento tecnológico de produtos de origem animal (PARSONNET e KASS, 1987; BARTON, 2000).

No setor avícola, um dos objetivos do uso dos antimicrobianos seria a redução das perdas ocasionadas pela infecção por *E. coli* nas aves, as colibaciloses. Cepas de *E. coli* isoladas de aves com colibacilose resistentes à tetraciclina, à neomicina, à kanamicina, à cefalotina, à estreptomicina e à eritromicina já foram observadas. Por isto, a utilização dos antimicrobianos em aves deve ser adequada,

pois é possível a ocorrência da resistência cruzada com patógenos entéricos dos seres humanos (ALLAN et al., 1993; BLANCO et al., 1997).

Cloud et al. (1985), Erganis et al. (1989), Wooley et al. (1992), Blanco et al. (1997), Cardoso et al. (2002) e Yang et al. (2004) encontraram, em seus estudos, isolados de *E. coli* aviária resistentes a vários antimicrobianos. Estes autores recomendam o uso controlado de antimicrobianos em Medicina Veterinária, se possível precedido de teste de susceptibilidade, para evitar-se a resistência cruzada com patógenos entéricos de seres humanos.

Os sorotipos de *E. coli* associados a doenças nas aves não afetam o homem, porém o problema está no fato da *E. coli* poder tornar-se resistente a antimicrobianos utilizados na terapêutica de algumas doenças. Esta resistência pode ser transferida para outros membros da família Enterobacteriaceae dificultando o tratamento das enfermidades causadas por estas bactérias, tanto no homem como nos animais (BREMNER, 1981).

O uso inadequado de antimicrobianos é considerado o fator mais importante para a seleção e disseminação de bactérias resistentes aos mesmos. Em criações de frangos de corte, quando utilizados como promotores de crescimento, os antimicrobianos selecionam bactérias resistentes na microbiota intestinal das aves e estas apresentam nas fezes proporções elevadas destas bactérias. Ao abate das aves, cepas resistentes do trato intestinal podem contaminar as carcaças e a carne de frango pode ser contaminada por *E. coli* multiresistentes. A *E. coli* aviária resistente pode infectar pessoas diretamente ou por meio de alimentos, colonizar o trato intestinal e contribuir com genes de resistência para a microbiota endógena humana (PARSONNET e KASS, 1987; BARTON, 2000; VAN DEN BOGAARD et al., 2001).

A legislação brasileira preconiza algumas medidas em relação ao uso dos antimicrobianos que são consideradas todas as substâncias utilizadas para combater os microrganismos "in vivo" ou "in vitro". O período de carência ou de retirada dos antimicrobianos deve ser em conformidade com a forma, a fórmula e a via de administração do produto, devendo constar na bula, sempre que o antimicrobiano seja indicado para animais cujos derivados e subprodutos sejam destinados ao consumo humano (BRASIL, 1997). A Portaria nº 193 de 1998 considera a importância do uso adequado dos agentes antimicrobianos em medicina veterinária, no tratamento e na prevenção de doenças, visando à segurança para a

saúde pública. Os antimicrobianos utilizados em terapêutica devem ser evitados na indicação de aditivos alimentares, promotores de crescimento ou como conservantes de alimentos para animais, sendo vedado o uso de cloranfenicol, penicilinas, tetraciclina e sulfonamidas sistêmicas (BRASIL, 1998a).

2.5 MICOPLASMA

Os micoplasmas pertencem à classe Mollicutes, à ordem Mycoplasmatales, à família Mycoplasmataceae e ao gênero *Mycoplasma* (KLEVEN, 1997). Estas bactérias foram identificadas pela primeira vez, em 1898, como agentes etiológicos da pleuropneumonia contagiosa bovina. Conseqüentemente, os micoplasmas foram denominados de "pleuropneumonia-like-organisms" (PPLO), ou seja, organismos semelhantes àqueles causadores da pleuropneumonia (DAVIS et al., 1973).

Os micoplasmas são mais susceptíveis a mutações do que outras bactérias (WOESE et al., 1985). Eles freqüentemente mudam seus antígenos de superfície, o que lhes permite evitar o sistema imunológico do hospedeiro, facilitando sua sobrevivência quando aderidos ao trato respiratório do mesmo (MARKHAN et al., 1998). Não possuem parede celular e, por tal motivo, são resistentes aos antibióticos que atuam na síntese da mesma. A ausência de parede celular influencia na morfologia da colônia que apresenta a forma de "ovo frito" (KLEVEN, 1997).

Os micoplasmas têm predileção pelas membranas mucosas e serosas dos tratos respiratório e reprodutivo das aves, estando, portanto, envolvidos em problemas respiratórios, articulares e urogenitais. As micoplasmoses aviárias são reconhecidas pelas formas clássicas das enfermidades que os micoplasmas causam: doença respiratória crônica (DRC) das galinhas, sinusite infecciosa dos perus, sinovite infecciosa e aerossaculite das aves (NASCIMENTO, 2000; MONTEIRO e ROSSINI, 2004).

A micoplasmose aviária foi relatada pela primeira vez, no Brasil, em casos de aerossaculite em galinhas. A doença ocorre primariamente em galinhas e perus, mas também tem sido relatada em muitas espécies de aves silvestres. Sua distribuição é mundial, todas as idades são suscetíveis e geralmente a doença é mais severa no inverno. O período de incubação é de 6 a 21 dias e a incubação pode ocorrer durante o período embrionário (FÓSCOLO, 2005). A micoplasmose é favorecida por situações de estresse, alterações de temperatura ambiental, pelo

transporte e superpopulações nos galpões (MONTEIRO e ROSSINI, 2004). A grande concentração de aves em pequenas áreas leva a riscos maiores de exposição aos micoplasmas patogênicos (KLEVEN, 2004).

2.5.1 *Mycoplasma gallisepticum* e *M. synoviae*

Na avicultura, há duas espécies de maior relevância, devido a sua patogenicidade: o MG e o MS. O MG é considerado a espécie mais virulenta, porém ambas estão relacionadas à infecção dos tratos respiratório e reprodutivo (MONTEIRO e ROSSINI, 2004).

O MG e o MS são capazes de fermentar glicose e maltose, com produção de ácido sem produzir gás, porém não são capazes de fermentar lactose, dulcitol e salicina. O MG e o MS não hidrolisam arginina e apresentam um crescimento ótimo a temperatura de 37°C (KLEVEN, 1997; LEY e YODER JR., 1997)

O MG e o MS são considerados responsáveis por importantes doenças respiratórias em frangos de corte. Estas bactérias ocasionam lesões de extensão variada em sacos aéreos e, como consequência, podem levar a índices significantes de condenações de carcaças em matadouros. Após a infecção por MG e/ou MS, as aves tornam-se mais susceptíveis às infecções secundárias por outros agentes como vírus e/ou a *E. coli* (ALENCAR et al., 1998; FERREIRA e KNÖBL, 2000). As infecções causadas pelo MG sozinho ou em associação com vírus vacinais e *E. coli* podem causar infecções severas e de difícil controle. O MS também pode causar problemas de aerossaculite em frangos (ROSALES, 1991).

2.5.2 Sinais, sintomas e lesões

Os sinais, os sintomas e as lesões das infecções por micoplasma em aves ocorrem primeiramente no trato respiratório, seguido do sistema articular e, com menor frequência, em outras regiões. Dentre as alterações anatomopatológicas macroscópicas encontradas destacam-se sacos aéreos opacos e espessados, inflamações catarrais nas fossas e seios nasais, faringe, traquéia e brônquios. Os sacos aéreos são os locais mais afetados, devido ao processo respiratório das aves, onde o ar inspirado passa primeiro pelos grandes brônquios e sacos aéreos para depois ser liberado aos pulmões (NASCIMENTO, 2000).

Os micoplasmas no hospedeiro aderem-se às superfícies da traquéia e dos sacos aéreos, ocorrendo a colonização. Segue-se uma irritação local, com reação inflamatória e produção de muco. Os micoplasmas podem infectar os sacos aéreos e o aparelho reprodutor causando inflamações crônicas e queda na produção de ovos. As lesões observadas na necropsia são: exsudato catarral em passagens nasais, traquéia, brônquios e sacos aéreos, sinusite, sacos aéreos com exsudato caseoso, pneumonia, salpingite. Em casos crônicos: perihepatite, pericardite e aerossaculite maciça (FÓSCOLO, 2005).

2.5.3 Transmissão e hospedeiros

A infecção por MG e MS ocorre principalmente em galinhas e perus, apesar desses microrganismos já terem sido isolados de várias espécies de aves (STIPKOVITIS e KEMPF, 1996; LOBÃO et al., 2003). As membranas mucosas do trato respiratório superior e, com menor frequência, do trato genital das galinhas e dos perus, são reservatórios naturais do MG e do MS (NASCIMENTO, 2000).

O MG e o MS são capazes de sobreviver fora do hospedeiro por várias horas e podem ser transmitidos por via horizontal e vertical (MONTEIRO e ROSSINI, 2004). A transmissão horizontal pode ocorrer por meio de aerossóis, ração e água contaminados ou por contato direto com outras aves. A transmissão vertical ocorre pela via transovariana (CHARLTON et al., 1996). O MS dissemina-se, horizontalmente, mais rápido do que o MG (ROSALES, 1991).

A transmissão dos micoplasmas normalmente ocorre dentre as espécies e/ou entre as espécies de hospedeiros estreitamente relacionados. A maioria dos micoplasmas possui especificidade quanto ao hospedeiro, podendo ser patogênicos para uma espécie e colonizar outras sem expressar patogenicidade (ROSENBUSCH, 1994; NASCIMENTO, 2000).

2.5.4 Importância econômica

O significado econômico e de saúde pública da infecção por MG traduz-se por condenações, nos matadouros, das aves com aerossaculite, além das perdas ocasionadas pela diminuição na produção de ovos, na conversão alimentar e o gasto alto com medicamentos (LEY e YODER JR., 1997). A infecção por MG é

considerada uma das doenças que causa um maior número de perdas na indústria avícola (YODER JR., 1991; CHARLTON et al., 1996). Os prejuízos causados pela infecção por MG em granjas comerciais também estão relacionados com o aumento na refugagem, o efeito potencializador de outras infecções secundárias e o aumento da mortalidade (FÓSCOLO, 2005).

A infecção por MG é responsável direta ou indiretamente pela maior parte das perdas, principalmente as ocasionadas por condenações de carcaças. Isto ocorre pela severa aerossaculite causada por MG em frangos, que pode ser complicada por infecções virais respiratórias e, comumente, pela *E. coli* (ALENCAR et al., 1998; LEY e YODER JR., 1997). Linzitto e Menéndez (1996) observaram que, em explorações avícolas intensivas na Argentina, 66,6% das lesões de traquéia, seios nasais e pulmões dos frangos apresentavam como agente etiológico *Mycoplasma* spp. e 33,3% a *E. coli*, demonstrando a importância econômica e sanitária destas bactérias.

No Brasil, a prevalência de MS em frangos tem aumentado desde os anos 80 e, em 1990, já havia ultrapassado a de MG em lotes de reprodutoras (BALEN e FIORENTIN, 1990). Nos EUA, MS causa perdas por provocar alta taxa de mortalidade na fase final do lote, quando comparado com lotes livres de MS (NASCIMENTO, 2000).

2.5.5 Diagnóstico

No diagnóstico da micoplasmose aviária deve-se considerar o histórico da granja (diminuição do consumo de alimento, baixo ganho de peso ou queda na produção de ovos) juntamente com os exames sorológicos. O material de envio ao laboratório é o soro sanguíneo. Os métodos mais utilizados são a soroaglutinação rápida (SAR) e o ELISA. O diagnóstico laboratorial é fundamental, pois outras doenças podem ser confundidas como: Bronquite Infecciosa, Síndrome da Cabeça Inchada, Doença de Newcastle, Coriza Infecciosa, Cólera Aviária, Aspergilose, entre outras (FÓSCOLO, 2005).

A SAR e o ELISA são os métodos sorológicos de triagem e a inibição da hemaglutinação (HI) é empregada como método confirmatório, e podem ser seguidos pelo cultivo. A SAR detecta principalmente anticorpos do tipo IgM, que aparecem de três a cinco dias após a infecção. A HI detecta os anticorpos do tipo IgG, que aparecem de sete a dez dias após o início da infecção. Fragmentos de

tecidos, suabes da traquéia, dos sacos aéreos, exsudato dos seios nasais, entre outros são espécimes clínicos utilizados em cultivo e/ou PCR para auxiliar os testes de SAR e HI. O meio de cultura utilizado é o meio de Frey modificado. O micoplasma isolado é submetido às provas bioquímicas e depois às seguintes provas de tipificação: imunofluorescência direta ou indireta de colônias, imunoperoxidase e inibição de crescimento (NASCIMENTO, 2000).

2.5.6 Controle da Micoplasmose

As práticas adotadas em muitos países na produção industrial de aves fazem com que a maioria da produção de frangos, de perus e de ovos seja livre de infecção por micoplasmas. Todavia, as áreas com indústrias avícolas menos desenvolvidas tendem a apresentar níveis elevados de contaminação com MG e MS (KLEVEN, 2004).

No Brasil, o Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA) apresenta nos seus objetivos específicos o controle e/ou erradicação da micoplasmose aviária por ser esta uma das enfermidades que representam barreira sanitária na comercialização dos produtos avícolas. O PNSA define medidas de monitoramento da micoplasmose em estabelecimento avícolas, de controles permanentes e eventuais, que realizam o comércio ou a transferência nacional e internacional de seus produtos destinados à reprodução e produção de aves e ovos férteis. No caso do comércio internacional, os estabelecimentos avícolas devem estar certificados como livres de micoplasmose aviária (BRASIL, 1994; UBA, 2005).

2.6 OUTRAS DOENÇAS RESPIRATÓRIAS DE IMPORTÂNCIA NA AVICULTURA INDUSTRIAL

Dentre as outras enfermidades do trato respiratório de importância em avicultura industrial, as principais são: Doença de Newcastle, Bronquite Infecciosa, Laringotraqueíte Infecciosa, Influenza Aviária, Síndrome da Cabeça Inchada (SCI), Coriza Infecciosa, infecção pela *Ornithobacterium rhinotracheale*, Cólera Aviária, Aspergiloses e Criptosporidiose Aviária (CASTRO, 2000; LEÃO et al., 2002).

A Doença de Newcastle, também conhecida como pseudo-pestes aviária ou pneumoencefalite aviária, faz parte da lista de comunicação obrigatória da Organização Mundial de Saúde Animal (OIE). A Doença de Newcastle tem como

agente etiológico o Paramyxovírus aviário tipo um, com índice de patogenicidade intracerebral maior do que 0,7 em pintos de um dia de idade. Este vírus é um vírus RNA envelopado, de fita simples, inativado pela ação da luz solar e pela maioria dos agentes químicos (PAULILLO e DORETTO JR., 2000). O PNSA define o controle e/ou erradicação da Doença de Newcastle como prioritários para a vigilância epidemiológica e sanitária do Brasil (BRASIL, 1994).

A Bronquite Infeciosa das galinhas também é uma doença viral, sendo altamente infecciosa. Ela acomete os tratos respiratório e genito-urinário das aves. O agente etiológico pertence ao gênero *Coronavirus*, possui cadeia de RNA de fita simples, sendo envelopado e com simetria helicoidal. O vírus é sensível à maioria dos desinfetantes e à radiação ultravioleta, porém resistente ao pH 2,0 por uma hora a temperatura de 37°C. Este vírus dissemina-se rapidamente entre as aves por contato direto ou indireto. O local primário da sua replicação é o trato respiratório superior (FÁBIO e ROSSINI, 2000).

A Laringotraqueíte Infecciosa é uma doença respiratória aguda de galinhas, de etiologia viral (Galli Herpesvírus tipo I), com sinais clínicos que incluem: dispnéia grave, tosse, depressão, descarga nasal e conjuntivite. As epidemias graves da doença tendem a ocorrer em áreas de concentração de produção de frangos. Os surtos podem ocasionar taxas de mortalidade de até 70%, diminuição do desempenho do lote, gerando grandes prejuízos econômicos. A doença também pertence a lista de comunicação obrigatória da OIE, sendo obrigatória sua notificação ao serviço oficial local e o isolamento do agente em casos de suspeita da doença (GARCIA, 2003; GAMA, 2004).

A Influenza Aviária é uma doença caracterizada por uma marcada variação em morbidade, mortalidade, sinais e lesões. Esta doença acomete vários tipos de aves, e é causada pelo vírus influenza A, que pertence à família Orthomyxoviridae. O influenza A é um vírus RNA, envelopado, de fita simples, sensível a éter, clorofórmio e a diversos desinfetantes químicos. O vírus é dividido em subtipos com base nas relações antigênicas das glicoproteínas hemaglutinina e neuraminidase de superfície (HAFEZ, 2005). Na avicultura industrial, a influenza aviária tem causado consideráveis perdas econômicas. As amostras do vírus de alta patogenicidade podem ocasionar uma mortalidade de até 100% das aves. A influenza aviária está na lista de doenças de comunicação obrigatória da OIE, com controle previsto pelo

PNSA, sendo o Brasil um país livre desta enfermidade (BRASIL, 1994; MORAES e SALLE, 2000).

O Pneumovírus Aviário é responsável pela Rinotraqueíte dos perus e está associado a SCI que acomete criações de galinhas e frangos de corte. A SCI está disseminada por todo o mundo e no Brasil há relatos da sua ocorrência nos principais estados produtores. Os sinais observados são: secreção nasal, aumento dos seios infraorbitários e edema subcutâneo na cabeça, com início ao redor dos olhos. Os quadros da SCI normalmente se agravam pelas infecções secundárias, especialmente pela *E. coli*. Os pneumovírus são vírus RNA de fita simples que infectam principalmente perus, frangos de corte e matrizes. A transmissão ocorre de forma horizontal, por via aérea, por meio do contato de aves doentes com sadias (ARNS et al., 2000; ZAUNAZE, 2005).

A Coriza Infecciosa aviária é uma doença respiratória altamente contagiosa e afeta, principalmente, o trato respiratório superior das galinhas. Pode também acometer, embora raramente, faisões, galinhas d'Angola e codornas. A bactéria *Haemophilus paragallinarum* é o agente etiológico. A galinha é a espécie mais suscetível, sendo as aves infectadas de forma crônica e as portadoras assintomáticas importantes fontes de infecção. A transmissão é por via horizontal. Dependendo da virulência do agente, a morbidade é alta e a difusão rápida (GAMA e NASCIMENTO, 2000).

A bactéria *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT) está associada com doença respiratória, retardo no crescimento, mortalidade e queda de postura em galinhas e perus. Ela causa uma infecção que se caracteriza por pneumonia uni ou bilateral, pleurite e aerossaculite. A ORT pode ser um agente etiológico primário ou secundário de doença respiratória, de acordo com a sua virulência, com os fatores ambientais, o estado imune do plantel e a presença de outros agentes infecciosos. A sua forma de transmissão mais amplamente documentada é a horizontal (LEÃO et al., 2002).

A Cólera Aviária é causada pela bactéria *Pasteurella multocida*. Esta doença ocorre esporadicamente, na maioria dos países, algumas vezes ocasionando alta mortalidade e grandes prejuízos econômicos. De uma forma geral, *P. multocida* é um habitante normal do trato respiratório superior dos animais e quando o equilíbrio do hospedeiro/parasita é alterado, a bactéria pode manifestar sua patogenicidade (GAMA e NASCIMENTO, 2000).

A Aspergilose pulmonar é a forma clássica da Aspergilose. Ela é caracterizada pela dificuldade respiratória, com índices de mortalidade que podem ser superiores a 50% em aves jovens, se o grau de exposição ao agente for alto. A Aspergilose é uma doença respiratória determinada por qualquer espécie de fungo do gênero *Aspergillus*. As espécies *A. fumigatus* e *A. flavus* são as principais envolvidas na maior parte dos surtos. A infecção ocorre pela inalação dos esporos produzidos pelos fungos ou por contaminação dos ovos durante a incubação. O sistema respiratório é o foco primário, porém pode-se encontrar o fungo afetando o sistema nervoso central, o sistema digestivo e os olhos das aves (FILHO, 2000).

A Criptosporidiose em galinhas ocorre como doença respiratória, intestinal ou renal, pois o protozoário *Cryptosporidium baileyi* tem sido observado no epitélio do trato respiratório, entérico e renal. A forma observada com maior frequência é a respiratória com sinais clínicos que incluem tosse, espirros e dispnéia. As aves gravemente afetadas podem ficar até incapazes de se locomover (KAWAZOE, 2000).

Os agentes respiratórios acima citados são de grande importância em criações avícolas industriais, pois são responsáveis por diversas enfermidades de impacto econômico sobre o custo da produção de frangos e poedeiras (GAMA, 2004).

2.7 GÊNERO *SALMONELLA*

O gênero *Salmonella* foi caracterizado em 1885, sendo a sua denominação uma homenagem ao patologista Daniel Salmon (RODRIGUES, 2005). Este gênero compreende bastonetes Gram negativos que pertencem à família Enterobacteriaceae. As salmonelas são bactérias anaeróbias facultativas, usualmente móveis com flagelos peritríquios, porém existem os sorovares *S. Pullorum* e *S. Gallinarum* que são imóveis. As salmonelas apresentam como temperatura ótima para crescimento 37°C, são oxidase, indol, urease e Voges Proskauer negativas, porém catalase, vermelho de metila e citrato positivas e reduzem o nitrato a nitrito (LE MINOR, 1984; HOLT et al., 1994).

O esquema de Kauffmann-White para a classificação de *Salmonella* relaciona as salmonelas mais frequentemente associadas à infecção humana, ou seja, as de importância clínica. Este esquema divide o gênero em sorovares ou sorotipos pela

composição antigênica das salmonelas, com relação aos seus antígenos somático (O), capsular (Vi) e flagelar (H) (CAMPOS, 1999).

O gênero *Salmonella* já foi classificado apenas com a espécie *S. enterica*. Esta espécie era classificada possuindo sete subespécies: *S. enterica* subsp. *arizonae*, *S. enterica* subsp. *bongori*, *S. enterica* subsp. *diarizonae*, *S. enterica* subsp. *enterica*, *S. enterica* subsp. *houtenae*, *S. enterica* subsp. *indica* e *S. enterica* subsp. *salamae*. As espécies *S. choleraesuis*, *S. enteritidis*, *S. typhi* e *S. typhimurium* seriam sinônimos de *S. enterica* subsp. *enterica*. As sete subespécies eram citadas por números romanos, ou seja, subespécie I, II, IIIa, IIIb, IV, V e VI (EUZÉBY, 1999).

O "Centers for Disease Control and Prevention" dos EUA adota o esquema proposto por Kauffmann-White (QUADRO 1), no qual o gênero *Salmonella* possui duas espécies com vários sorovares. A espécie *S. enterica*, dividida em seis subespécies, e a espécie *S. bongori* que era a subespécie V. Os sorovares não são espécies separadas, por isso não são escritos em itálico e a primeira letra é maiúscula, como, por exemplo, *Salmonella* Typhimurium ou *S. Typhimurium* (BRENNER et al., 2000).

QUADRO 1. Esquema de Kauffmann-White: espécies, subespécies e sorotipos de *Salmonella* e seu habitat comum

Espécies e subespécies de <i>Salmonella</i>	Número de sorovares das subespécies	Habitat comum
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> (I)	1.454	Animais de sangue quente
<i>S. enterica</i> subsp. <i>salamae</i> (II)	489	Animais de sangue frio e meio ambiente ¹
<i>S. enterica</i> subsp. <i>arizonae</i> (IIIa)	94	Animais de sangue frio e meio ambiente
<i>S. enterica</i> subsp. <i>diarizonae</i> (IIIb)	324	Animais de sangue frio e meio ambiente
<i>S. enterica</i> subsp. <i>houtenae</i> (IV)	70	Animais de sangue frio e meio ambiente
<i>S. enterica</i> subsp. <i>indica</i> (VI)	12	Animais de sangue frio e meio ambiente
<i>S. bongori</i> (V)	20	Animais de sangue frio e meio ambiente
Total	2.463	

1- Isolados de todas as espécies e subespécies, já ocorreram em seres humanos

Fonte: Brenner et al. (2000)

A virulência das salmonelas é multifatorial e inclui a mobilidade, a habilidade de penetrar e replicar nas células epiteliais, a resistência à ação do complemento e a produção de entero, cito e endotoxina (RODRIGUES, 2005).

As salmonelas estão amplamente distribuídas na natureza, sendo o trato intestinal dos seres humanos e dos animais o principal reservatório natural. As aves são consideradas o reservatório mais importante entre os animais (DOYLE e CLIVER, 1990b). Essas bactérias são eliminadas em grande número nas fezes, contaminando o solo e a água. Elas podem permanecer viáveis no material fecal por longo período, particularmente em fezes secas, podendo resistir por mais de 28 meses nas fezes de aves (RODRIGUES, 2005).

2.7.1 Salmonelose aviária

A doença causada por bactérias do gênero *Salmonella* é genericamente chamada salmonelose. A salmonelose é a principal causa de doença intestinal bacteriana nos animais e nos seres humanos (DOYLE e CLIVER, 1990b; BRENNER et al., 2000).

Existem três tipos de salmonelose aviária: a pulorose, o tifo aviário e o paratifo aviário. A pulorose e o tifo aviário são causados por *S. Pullorum* e *S. Gallinarum*, respectivamente, que são os sorotipos imóveis. O paratifo aviário pode ser causado por qualquer salmonela, exceto pelos sorotipos *S. Pullorum* e *S. Gallinarum*. A pulorose é uma doença mais comum em aves jovens, nas quais provoca quadros de diarreia branca, alta mortalidade e tem como principal via de transmissão a via vertical. O tifo aviário é uma enfermidade que acomete mais as aves adultas, cuja transmissão pode ocorrer por diversas vias, as aves apresentam diarreia esverdeada e a taxa de mortalidade pode ser superior a 80%. Já o paratifo aviário acomete aves e mamíferos, jovens ou adultos. As salmonelas paratíficas causam infecção principalmente em aves jovens que se tornarão adultas assintomáticas. Estas salmonelas são responsáveis por doenças transmitidas por alimentos nos seres humanos devido à ingestão de produtos de origem avícola (BERCHIERI JR., 2000; DICKEL, 2004).

As salmonelas podem colonizar os ovários das aves e estar presentes nos ovos, ocasionando o nascimento de pintos infectados. Os ovos também podem se contaminar com material fecal, principalmente os ovos trincados que são mais

susceptíveis à contaminação. A ração contaminada, os roedores, os insetos e o meio ambiente também são fontes de contaminação por salmonelas (DOYLE e CLIVER, 1990b). Os ratos podem albergar salmonelas por mais de 10 meses e excretá-las em número elevado nas fezes. O cascudinho (*Alphitobius diaperinus*), freqüentemente encontrado em granjas, também pode ser um reservatório de salmonelas e outros enteropatógenos (SILVA, 2005a).

A colonização das aves por salmonelas é influenciada pela capacidade da bactéria em sobreviver a passagem pelo trato intestinal, pela competição microbiana, pelo uso de medicamentos, pelo estresse dos animais e pelo estado fisiológico, genética e idade das aves. A colonização é máxima entre a segunda e a terceira semana de vida. As salmonelas localizam-se, principalmente, no ceco das aves e podem ser excretadas por um longo período sem que a ave apresente sintomas. As aves com a infecção inaparente, ao excretarem salmonelas pelas fezes a disseminam no plantel. Estas aves também podem ocasionar contaminações cruzadas nos matadouros avícolas (FRANCO e LANDGRAF, 1996; DELAZARI, 2001; LEITÃO, 2001).

Há aproximadamente 15 anos atrás, a salmonelose das aves domésticas tornou-se prioridade como a doença de maior risco para a indústria avícola nacional. Alguns sorovares, como *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*, são comuns nas aves domésticas e de relevância em saúde pública, por provocarem doenças gastrointestinais em humanos, o que explica o crescente interesse pelo estudo das salmoneloses aviárias (SESTI, 2001).

Na década de 90, a *S. Enteritidis* tornou-se um grande problema da avicultura e de saúde pública brasileira. Acredita-se que a sua entrada no Brasil ocorreu por meio da compra de material genético avícola, dos EUA e da União Européia, que estava contaminado com a bactéria. A taxa de crescimento da avicultura brasileira na época permitiu a proliferação da bactéria e a manutenção de lotes positivos. O uso incorreto de antibióticos em aves favoreceu ainda mais a manutenção de *S. Enteritidis* nos plantéis avícolas, aumentando a resistência aos antimicrobianos, inclusive em cepas de origem humana (SILVA e DUARTE, 2002). A *S. Enteritidis*, além de colonizar o intestino das aves, também é capaz de invadir órgãos como o fígado, o baço, o pâncreas, o oviduto, entre outros (NAVARRO, 1995).

O controle da salmonela é essencial, pois sua infecção pode ocasionar restrições ao comércio dos produtos avícolas pelas implicações em saúde pública, e

grandes prejuízos financeiros devido à alta mortalidade que pode ocorrer durante as quatro primeiras semanas de idade das aves, ao alto custo com medicação, a queda na produção de ovos, a baixa qualidade dos pintos e ao custo elevado das medidas de erradicação e controle (HAFEZ, 2005).

2.7.2 Salmonelose em seres humanos

Em humanos existem três síndromes clínicas causadas por salmonelas. A primeira é ocasionada por salmonelas altamente adaptadas ao homem e inclui os sorovares *S. Typhi* e *S. Paratyphi A, B e C*, agentes da febre entérica (febre tifóide e paratifóide). A febre entérica mais severa é a febre tifóide ocasionada por *S. Typhi*, onde o homem é o único reservatório desta bactéria. Os sintomas da febre tifóide incluem septicemia, febre alta, diarreia, dor de cabeça, vômito e constipação. A segunda síndrome seria a septicemia que pode ser determinada pelos sorovares *S. Dublin* e *S. Choleraesuis*, altamente adaptados aos animais. Estes sorovares, em determinadas situações (jovens, pacientes com doença crônica, idosos e imunocomprometidos), podem determinar um quadro septicêmico nos seres humanos, mais grave do que o causado por *S. Typhi*. A terceira síndrome é a gastroenterite (enterocolite), uma doença de transmissão alimentar, cujos sintomas são diarreia, dor abdominal, febre, vômito, desidratação, calafrios e dor de cabeça. O período de incubação varia, normalmente, entre 12 a 36 horas e a doença pode ser fatal para idosos e indivíduos muito jovens. Esta síndrome é ocasionada pelas salmonelas zoonóticas, que incluem a maioria dos sorovares e atingem indiferentemente os seres humanos e os animais (DOYLE e CLIVER, 1990b; RODRIGUES, 2005).

As aves são consideradas fontes de salmonelas para os seres humanos. Os casos de salmonelose de origem alimentar aumentaram a partir dos anos 80 devido ao consumo de ovos e subprodutos contaminados (SANTOS et al., 2000).

No Brasil, as infecções humanas por salmonelas constituem a mais importante das doenças transmitidas por alimentos, ocasionando um custo social que é avaliado pela perda de produtividade, faltas ao trabalho, custos com medicações, internações e até casos fatais (SILVA, 2005a).

A maioria das infecções em humanos e em animais de sangue quente é ocasionada pela *S. enterica* subsp. I (BRENNER et al., 2000). As carcaças de frangos, os ovos e seus derivados são relatados como os principais responsáveis por surtos de salmonelose no homem por se apresentarem como grandes fontes de contaminação (SILVA e DUARTE, 2002).

As salmoneloses são, geralmente, decorrentes do consumo de carnes contaminadas, insuficientemente cozidas ou por contaminação de pratos já preparados por meio do seu manuseio inadequado ou por contato com equipamentos e utensílios contaminados (LEITÃO, 2001).

2.7.3 *Salmonella* na indústria avícola

A salmonelose é um grande problema na avicultura industrial e necessita de um cuidadoso programa de prevenção e controle. A introdução de um lote contaminado, o ambiente e a ração contaminados são considerados as três maiores fontes de salmonelas de interesse comercial (TESSARI et al., 2003).

A indústria avícola brasileira tem adotado vários critérios para o controle de salmonelas que incluem ações no pré-abate e no matadouro. As ações prévias ao abate objetivam o controle de salmonelas nos plantéis de frangos, pois tem como intuito a redução do número de frangos portadores de salmonela entrando no matadouro (SILVA, 2005a). As aves portadoras assintomáticas de salmonelas são, freqüentemente, a fonte inicial de contaminação no abate, onde os equipamentos e o manuseio inadequado das carcaças permitem a disseminação de microrganismos entre as carcaças (LEITÃO, 2001).

Normalmente, o percentual de frangos positivos para salmonelas, que chegam aos matadouros, é baixo. Porém, mesmo um pequeno número de aves infectadas pode contaminar toda a linha de abate devido às falhas tecnológicas durante o processamento que levam à contaminação cruzada. As carcaças contaminadas representam um risco para a saúde pública, pois o seu consumo ou de alimentos preparados com carne de frango contaminada pode transferir salmonelas para a cadeia alimentar humana (NASCIMENTO et al., 1996).

Na carne de frango, as operações durante o abate são as principais fontes de contaminação por salmonelas. Estas bactérias possuem relativa resistência à dessecação, ao congelamento, a salmoura e a processos de defumação. Isto explica

porque as salmonelas sobrevivem em muitos tipos de alimentos, sendo os produtos avícolas os principais responsáveis por surtos de salmonelose de origem alimentar. Entretanto, qualquer alimento que contenha salmonelas torna-se um risco em potencial para o consumidor (RODRIGUES, 2005).

Para a indústria de alimentos, a presença de salmonelas está intimamente ligada à imagem de qualidade da empresa e de seus produtos. Em razão das exigências de segurança dos alimentos, as ações empregadas pelas indústrias brasileiras, no abate, incluem a realização de um sistema de inspeção em conjunto com as práticas de garantia de qualidade, baseado nos princípios de Boas Práticas de Fabricação, no PPHO e na APPCC (SILVA, 2005a).

A qualidade dos programas de higiene das granjas, dos incubatórios e dos matadouros influencia de forma bastante acentuada a presença ou ausência de salmonelas no produto final (SANTOS et al., 2000). A transmissão vertical de salmonelas em frangos de corte pode ocorrer e evitá-la é o primeiro passo para prevenir a introdução de salmonelas em granjas. A saúde dos pintos de corte é um reflexo direto da saúde das matrizes, por isso requer um controle rígido e eficiente para garantir que as aves fiquem livres de contaminação (ROCHA et al., 2003; TESSARI et al., 2003).

O resfriamento não inviabiliza a presença de salmonelas, enquanto que no congelamento pode ocorrer a redução ou a ausência de bactérias viáveis. Entretanto, as salmonelas já foram isoladas de carcaças congeladas de frango, obtidas no comércio varejista brasileiro, demonstrando que este alimento participa como veiculador destas bactérias (SANTOS et al., 2000).

A pesquisa de salmonelas em aves serve como instrumento de avaliação do grau de contaminação destas bactérias permitindo o uso de medidas eficientes objetivando o seu controle (PEREIRA et al., 1999). A presença de salmonela é uma barreira sanitária que restringe o comércio de aves e seus produtos (GAMBIRAGI et al., 2003).

Estando ciente dos problemas ocasionados pela presença de salmonelas nos produtos avícolas, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) criou o PNSA que tem como ações prioritárias, a vigilância, o controle e a erradicação das principais doenças aviárias de importância para a saúde animal e a saúde pública, como a salmonelose. Por meio de medidas de controle sanitário e de desenvolvimento técnico e científico pretende-se reduzir a presença de

microrganismos patogênicos na carne de frango e nas criações, com o intuito de fornecer produtos avícolas de qualidade, tanto no mercado nacional como no internacional (BRASIL, 1994).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO DOS FRANGOS DE CORTE

Um total de 120 frangos de corte, aparentemente sadios e em idade de abate, foi utilizado. Os frangos foram obtidos de unidades de criação de um mesmo estabelecimento avícola localizado na região de São José do Vale do Rio Preto no Estado do Rio de Janeiro. As coletas foram realizadas com intervalos de uma a duas semanas, no período de julho a outubro de 2003, de acordo com a capacidade de análise laboratorial de 10 aves por semana.

As aves foram obtidas no dia da saída dos lotes para o abate e apresentavam entre 40 e 49 dias de idade. Na coleta, uma caixa de 10 frangos do mesmo lote era retirada do caminhão de transporte das aves ao matadouro, tendo sido efetuado um total de 12 coletas (QUADRO 2). Todos os frangos eram da linhagem comercial Cobb e foram submetidos, na sua criação, a programas de manejo, nutricional e sanitário idênticos.

QUADRO 2. Data da coleta e idade em dias dos frangos de corte retirados do caminhão de transporte na saída para o abate

Caminhão	Data da coleta	Número de aves	Idade das aves (dias)
1	08/07/2003	10	40
2	23/07/2003	10	40
3	05/08/2003	10	49
4	19/08/2003	10	45
5	02/09/2003	10	45
6	09/09/2003	10	42
7	16/09/2003	10	42
8	23/09/2003	10	47
9	30/09/2003	10	42
10	07/10/2003	10	41
11	14/10/2003	10	49
12	21/10/2003	10	47

3.2 COLETA DE MATERIAL

Na Área de Anatomia Patológica, no Laboratório de Biologia Animal da PESAGRO-RIO, os frangos foram examinados para a observação do seu aspecto geral, cujos dados foram registrados em uma ficha de coleta. Após as anotações, foram obtidos dois suabes de cloaca de cada frango para pesquisa de *Salmonella* spp.

3.2.1 Coleta de sangue dos frangos

As amostras de sangue dos frangos foram coletadas com agulhas e seringas descartáveis, por punção na veia braquial, em volumes de 3mL. As amostras de sangue foram acondicionadas em frascos estéreis de vidro para dessorar e, posteriormente, foram submetidas à SAR.

3.2.2 Necropsia e pesagem dos frangos

As aves foram pesadas, individualmente, em balança suspensa de uso doméstico graduada com 250g de intervalo. Os pesos foram registrados e as aves classificadas em duas faixas de peso estabelecidas a partir do peso médio. A faixa de peso mais baixa foi de 1000g até 2000g e a faixa mais pesada de 2250g até 3000g.

Em seguida, os frangos foram sacrificados, por meio do deslocamento da articulação atlanto-occipital. A necropsia foi realizada pela técnica usual, com a ave em decúbito dorsal, corte da pele sobre o esterno e rebatimento da pele sobre o peito, seguido de corte da pele sobre a articulação coxofemoral e desarticulação das patas neste ponto. Após a abertura da cavidade celomática, os órgãos foram observados e as informações sobre alterações e/ou lesões macroscópicas foram registradas nas fichas de coleta. Suabes de sacos aéreos e traquéia foram obtidos, fragmentos de traquéia, de aproximadamente quatro centímetros, e de sacos aéreos foram coletados, acondicionados em frascos com meios específicos e mantidos em gelo para posterior cultivo de *E. coli* e micoplasmas. As alterações observadas durante a necropsia como aerossaculite, pericardite e traqueíte também foram anotadas.

3.3 SOROLOGIA PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA MICOPLASMAS

Os soros obtidos foram inativados a 56°C por 30 minutos. Com os soros foi realizada a SAR para MG e MS. Uma gota (0,03mL) de cada antígeno (Laboratório Biovet S.A., SP e Intervet Co., SP) e uma gota (0,03 mL) do soro a ser testado foram colocadas no centro dos quadrados de uma placa de vidro. O soro e o antígeno foram misturados com movimentos circulares por cinco segundos. Após um minuto, a operação foi repetida e a leitura foi realizada no segundo minuto após a mistura inicial. A prova foi realizada com os antígenos de dois fabricantes diferentes para a confirmação dos resultados. Os soros obtidos foram armazenados em freezer a -70°C.

3.4 EXAME BACTERIOLÓGICO

3.4.1 Isolamento de *Mycoplasma gallisepticum* e *M. synoviae*

No laboratório do Núcleo de Diagnóstico de Micoplasmose da UFF, os fragmentos de traquéia e sacos aéreos de cada ave foram processados em fluxo laminar. As traquéias foram abertas com lâminas de bisturi estéreis, e feito um raspado. Os sacos aéreos foram macerados com pistilo em gral, previamente esterilizados. Ambos os espécimes foram inoculados em tubos contendo 3mL de Caldo de Frey modificado (Anexo 8.1) nas diluições de 10^{-1} a 10^{-5} . Os tubos contendo os caldos foram incubados em microaerofilia a 37°C. Os caldos foram observados, diariamente, para verificação de crescimento notado pela mudança de cor do meio de vermelho para amarelo, indicando a fermentação da glicose, contida no meio de cultura, pela bactéria. Esta observação foi realizada até o 21º dia. Os tubos foram descartados como negativos quando não havia turvação ou variação de cor do meio. Uma gota da diluição 10^{-5} foi escorrida na placa de Petri contendo Meio de Frey modificado sólido (Caldo de Frey modificado com 1,2% de Noble agar), incubada a 37°C e também observada até o 21º dia para a verificação do crescimento de colônias em forma de “ovo frito” (NASCIMENTO, 2000).

3.4.2 Isolamento e identificação de *Escherichia coli*

A detecção de *Escherichia coli* a partir de suabes oriundos da traquéia e de sacos aéreos foi baseada na metodologia descrita por Ferreira e Knöbl (2000). Este procedimento foi realizado no Laboratório de Controle Microbiológico de Produtos de Origem Animal da Faculdade de Veterinária da UFF. O procedimento incluiu as etapas de enriquecimento, plaqueamento e identificação bioquímica.

3.4.2.1 Enriquecimento e Plaqueamento

Os suabes oriundos da traquéia e dos sacos aéreos foram cultivados em tubos contendo 10mL de Caldo Infusão Cérebro Coração (BHI-Merck) e incubados a 35-37°C por 24 horas.

Do crescimento no Caldo BHI, denotado pela turvação do meio de cultura, uma alíquota do mesmo foi semeada em Ágar Mac Conkey (Biobrás) que é um meio seletivo indicado para o isolamento de *E. coli*. O período de incubação foi de 24 horas na temperatura de 35-37°C. No Ágar Mac Conkey, a *E. coli* apresenta colônias não mucóides, podendo ser rodeadas por precipitado opaco, rosadas ou vermelhas, que são colônias lactose positivas.

Do crescimento no Ágar Mac Conkey foi selecionada uma colônia característica que foi transferida para Caldo BHI incubado a 35-37°C por 24 horas. Após o período de incubação, uma parte deste cultivo também foi transferida para "ependorf" com glicerol (50%v/v) e estocada em freezer a -20°C para a posterior realização da identificação bioquímica e PCR, conforme já utilizado satisfatoriamente para a pesquisa de micoplasmas (NASCIMENTO, 2000).

3.4.2.2 Identificação bioquímica

Os cultivos estocados em Caldo BHI com glicerol (50%v/v) foram reativados em Ágar BHI a 35-37°C por 24 horas para a realização da identificação bioquímica e confecção de esfregaços corados pelo método de Gram para observação das suas características morfotintoriais.

Todos os isolados provenientes de traquéias foram identificados bioquimicamente por meio do teste do IMViC. O teste do IMViC consiste nas

seguintes provas bioquímicas: teste do Indol, do Vermelho de Metila, de Voges-Proskauer e do Citrato (Kornacki e Johnson, 2001).

Para o teste do Indol, o cultivo puro foi inoculado em tubo contendo Água Triptonada (Merck) e este material foi incubado a temperatura de 35°C por 24 horas. Após a incubação foram adicionadas, no interior do tubo, três a cinco gotas do Reativo de Kovac's (Anexo 8.4). O aparecimento de um anel vermelho na superfície caracterizou resultado positivo e a presença de anel amarelo caracterizou resultado negativo.

No teste do Vermelho de Metila, o meio de cultura utilizado foi o Caldo MR-VP (Merck) em tubos que foram semeados e incubados a 35°C durante 96 horas. Após esse período de incubação foram adicionadas três a cinco gotas da solução de Vermelho de Metila (Anexo 8.5) e o aparecimento de uma coloração vermelha caracterizou a prova como positiva.

Para o teste Voges-Proskauer foi retirada uma alíquota de 1,0mL do cultivo de 48 horas do Caldo MR-VP, que foi transferida para tubo de ensaio esterilizado. Neste tubo, 0,2mL da solução de hidróxido de potássio a 40% e 0,6mL da solução de alfa-naftol a 5% (Anexo 8.6) foram adicionados. A produção de coloração vermelha para caracterizar como positiva a prova foi verificada após 30 minutos. A permanência do meio na cor do reagente, amarela ou ligeiramente verde, indicou teste negativo.

No teste do Citrato, como meio de cultura foi utilizado o Ágar Citrato de Simmons (Merck) inclinado em tubo. Um inóculo do cultivo foi transferido para a superfície inclinada do meio e incubado a 35°C por 24-48 horas. O crescimento foi indicativo de teste positivo com a viragem da cor do indicador azul de bromotimol de verde para azul e o não crescimento e a não alteração da cor do meio foi indicativa de teste negativo.

Foram considerados como *E. coli* os cultivos que apresentaram as seguintes características: bastonetes Gram negativos, Indol (+ ou -), Vermelho de Metila (+), Voges-Proskauer (-) e Citrato (-).

Dos sacos aéreos foram obtidos isolados indicativos de *E. coli*. Uma parte desses isolados foi identificada bioquimicamente por meio do teste do IMViC e outra parte por meio do sistema API 20E (BioMérieux), para identificação de enterobactérias. O sistema API 20E apresenta as seguintes provas bioquímicas: β -galactosidase (orto-nitrofenil- β D-galactopiranosidase), dihidrolisação da arginina,

descarboxilação da lisina e ornitina, teste de utilização do citrato, produção de H₂S, urease, triptofanodesaminase, produção de indol, gelatinase, acetoina (Voges Proskauer), redução dos nitratos em nitritos, fermentação e oxidação de: glicose, manitol, inositol, sorbitol, ramnose, sacarose, melibiose, amigdalina e arabinose.

3.4 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

A PCR foi realizada no Laboratório de Epidemiologia Molecular da Faculdade de Veterinária da UFF, com a infra-estrutura do Departamento de Saúde Coletiva e Saúde Pública Veterinária.

3.4.1 Extração de DNA

Os procedimentos de extração de DNA foram realizados com o uso de luvas descartáveis e em capela de exaustão (PERMUTIO-CE0701). Nos ensaios preliminares foram testados três métodos de extração de DNA, conforme os protocolos que estão descritos a seguir. Os Protocolos 1 e 2 são métodos de extração térmica e o Protocolo 3 é um método de extração pelo fenol-clorofórmio. O método que apresentou um melhor resultado e que, portanto, foi utilizado neste estudo foi o descrito no Protocolo 1.

Em todos os protocolos de extração, foi testado o uso do cultivo puro de *E. coli* em Caldo BHI e cultivo puro de *E. coli* em Caldo BHI com glicerol (50%v/v). O uso do Caldo BHI sem glicerol mostrou-se mais eficiente nos ensaios preliminares. Portanto, os cultivos estocados em freezer, em Caldo BHI com glicerol, foram reativados em Caldo BHI sem glicerol e este foi utilizado nos procedimentos da extração do DNA.

3.4.1.1 Protocolo 1

Em tubos de "eppendorf" esterilizados foi adicionado 1,0mL do cultivo em Caldo BHI e centrifugado a 20.000Xg por quatro minutos a 10°C (Centrífuga refrigerada ALC-PK 121R – Annita IIR-Processing e Control Interface). O sobrenadante foi descartado e foi adicionado 1,0mL de solução salina 0,85 % (Anexo 8.2.6). Este material foi homogeneizado em agitador de tubos (Quimis) e

centrifugado novamente. Após esta etapa, o sobrenadante foi descartado e foi adicionado ao tubo 20µL de Água Milli-Q. Os tubos foram levados para bloco térmico (Quimis-Q331) a 95°C durante 10 minutos. Após este período, o material foi mais uma vez centrifugado e estocado em freezer a temperatura de – 20°C (CARLI et al., 2001).

3.4.1.2 Protocolo 2

Para esta extração seguiu-se a metodologia proposta por Santos (2001).

Em tubos de "eppendorf" esterilizados foi adicionado 1,0mL do cultivo em Caldo BHI e centrifugado a 20.000Xg por quatro minutos a 10°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado. Em cada tubo foi adicionado 1,0mL de tampão Tris-EDTA (TE) (Anexo 8.2.1), e este material foi homogeneizado em agitador de tubos. O processo de centrifugação foi repetido duas vezes. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e foi acrescentado ao tubo um volume de 100µL de TE. Este material foi guardado no freezer na temperatura de –20°C "overnight". Posteriormente, o material foi retirado do freezer e transferido para bloco térmico a 95°C por 10 minutos. Após esta etapa, os tubos foram centrifugados por um minuto. O sobrenadante foi transferido para outro tubo de "eppendorf" esterilizado e congelado no freezer a temperatura de –20°C.

3.4.1.3 Protocolo 3

Neste protocolo de extração de DNA foi utilizado o método do fenol-clorofórmio adaptado de Sambrook et al. (1989).

Um volume de 1,0mL do cultivo em Caldo BHI foi transferido para tubo de "eppendorf" esterilizado de 1,5mL e centrifugado por 20 minutos a 20.000Xg a 10°C. O sobrenadante foi descartado e utilizado o sedimento de aproximadamente 40µL. Neste tubo foram acrescentados 400µL de TE dextrose (Anexo 8.2.7), 30µL de Proteinase K (240µg/mL) e 30µL de solução de sulfato dodecil sódico a 10%. Este material foi colocado no bloco térmico a 50°C por 30 minutos e depois em banho de gelo por cinco minutos. Um volume de 500µL de fenol foi adicionado e o material foi homogeneizado, suavemente, por inversão durante 10 minutos. Após a homogeneização, o material foi centrifugado a 20.000Xg por 20 minutos a 10°C. A

fase superior foi retirada para novo "eppendorf", onde foi acrescentado igual volume de fenol à amostra e homogeneizado por inversão suave durante 10 minutos.

Uma nova centrifugação foi realizada por cinco minutos e a etapa de descarte do fenol foi repetida. Um volume igual de clorofórmio foi acrescentado, o tubo foi homogeneizado por três minutos por inversão suave e centrifugado durante cinco minutos. A fase superior foi transferida para novo "eppendorf" e acrescentado o dobro de volume de álcool etílico. O material foi mantido em freezer "overnight" a temperatura de -20°C .

Após este período no freezer, os tubos foram centrifugados durante 20 minutos. O álcool foi descartado escorrendo por capilaridade no papel absorvente, deixando o "pellet" no fundo do "eppendorf", que ficou secando aberto a temperatura ambiente. Após completa secagem, foram acrescentados 100 μL de TE e o material foi armazenado no freezer a temperatura de -20°C .

3.4.2 Amplificação do DNA

Na PCR foram utilizados "primers" (Gene Link – USA) para a seqüência do gene *iss* de cepas virulentas de *E. coli* aviária (HORNE et al., 2000; PFAFF-MCDONOUGH et al., 2000):

5'- GTG GCG AAA ACT AGT AAA ACA GC 3' (51,2nmol);

5'- CGC CTC GGG GTG GAT AA 3' (64,4nmol)

A PCR foi realizada em tubos de "eppendorf" de 600 μL , com um volume final de 50 μL : 21 μL de Água Milli-Q, 10 μL de tampão 10X (Cenbiot), 5 μL de MgCl_2 (50mM - Cenbiot), 5 μL de dNTP mix (0,25mM de cada – Ludwig Biotecnologia Ltda), 1 μL de cada "primer" (100pmol), 2 μL de Taq DNA polimerase (2U - Cenbiot), 5 μL de DNA em Água Milli-Q e duas gotas de óleo mineral estéril.

A reação de amplificação do DNA foi feita em termociclador Programmable Thermal Controller - PTC-100 (MJ Research, Inc.). As condições de amplificação foram: 30 ciclos de $94^{\circ}\text{C}/1$ minuto (desnaturação), $61^{\circ}\text{C}/1$ minuto (pareamento) e $72^{\circ}\text{C}/2$ minutos (extensão), baseadas em Delicato et al. (2003).

3.4.3 Eletroforese em gel de agarose

Um volume de 15µL dos produtos amplificados ("amplicons") foi transferido para outro tubo "eppendorf", onde foram adicionados 3µL de tampão de arrasto (Anexo 8.2.2). Em seguida, os "amplicons" foram revelados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% (Anexo 8.3) a 94V (Cuba de eletroforese – Loccus Biotecnologia). Posteriormente, eles foram corados com brometo de etídio (Anexo 8.2.4) com suave agitação durante 15 minutos em agitador (Kline). O gel foi lavado em água destilada por 15 minutos, também com suave agitação, e visualizado em transiluminador com luz ultravioleta (EB-20-E-Ultra-Lum, Inc. Carson, Califórnia).

Para auxiliar a visualização dos "amplicons" de 760 pares de base (pb) foi utilizado o marcador Ladder 100pb (PB-L Productos Bio-Lógicos).

3.5 TESTE DE ANTIBIOGRAMA

As cepas de *E. coli* positivas para o gene *iss* foram submetidas ao teste de antibiograma pelo método de difusão em discos, conforme Bauer et al. (1966). Os seguintes antibióticos foram testados: amicacina, ampicilina, aztreonam, ceftadizima, ciprofloxacina, clindamicina, cloranfenicol, cefotaxima, eritromicina, ácido nalidíxico, nitrofurantoína, norfloxacina, oxacilina, pefloxacina, penicilina, ácido pipemídico, sulfametoxazol/trimetoprim, teicoplanina, tetraciclina e vancomicina.

Quatro a cinco colônias isoladas foram transferidas para tubos contendo 5mL de Caldo Müller Hinton (Merck) formando-se uma suspensão de acordo com a turbidez padrão correspondente a 0,5 da escala de Mac Farland (Anexo 8.7). Um suabe estéril foi mergulhado no tubo e inoculado, por estriamento, na superfície total da placa de Petri, contendo Ágar Müller Hinton (Merck). Os discos de papel dos antimicrobianos foram colocados sobre a superfície do ágar e as placas incubadas a 35-37°C por 24 horas. Após o tempo de incubação, a leitura das placas foi realizada medindo-se, em milímetros, o diâmetro dos halos de inibição do crescimento das colônias.

3.6 PESQUISA DE *SALMONELLA* SPP.

Para a pesquisa de *Salmonella* spp. foi utilizado o método bacteriológico para diagnóstico das Salmoneloses Aviárias baseado na metodologia indicada pelo PNSA do MAPA (BRASIL, 1994). As etapas de enriquecimento, isolamento e identificação bioquímica preliminar foram as realizadas neste estudo e são descritas a seguir.

3.6.1 Enriquecimento

Na etapa de enriquecimento foram efetuados o enriquecimento não seletivo e o seletivo. Os suabes de cloaca foram colocados em tubos contendo 10mL de Caldo Tetrionato (Merck), para o enriquecimento seletivo, e 10mL de Caldo BHI, para o enriquecimento não seletivo. Os tubos de Caldo Tetrionato foram incubados a 43°C por 24 horas e os de Caldo BHI a 35°C por 24 horas.

3.6.2. Isolamento

O crescimento dos caldos de enriquecimento seletivo e não seletivo foram semeados em placas de Petri descartáveis contendo os meios Ágar Hektoen (Merck) e Ágar Verde Brilhante (Merck). As placas foram incubadas a 35-37°C por 24 horas.

Os aspectos das colônias desenvolvidas nas placas foram verificados. As colônias de *Salmonella* spp. no Ágar Verde Brilhante são rosadas, branco pérola transparentes com halo vermelho ou rosa pálida transparentes, enquanto que no Ágar Hektoen as colônias são verde-azuladas, com ou sem centro negro.

3.6.3 Identificação bioquímica preliminar

A partir do isolamento em Ágar Hektoen e Ágar Verde Brilhante, com duas a três colônias, de cada placa, com características típicas de *Salmonella* spp. foram feitos esfregaços corados pelo método de Gram para observação das suas características morfotintoriais.

As colônias de bastonetes Gram negativos foram repicadas no Ágar tríplice açúcar ferro (TSI-Merck), Ágar lisina ferro (LIA-Merck), Ágar sulfeto indol motilidade

(SIM-Merck) e Caldo Uréia (Merck). Este material foi incubado a 35°C por 24 horas. A leitura das provas bioquímicas foi realizada de acordo com o QUADRO 3.

QUADRO 3. Identificação bioquímica presuntiva de *Salmonella* spp.

Comportamento bioquímico		S. Pullorum	S. Gallinarum	<i>Salmonella</i> sp sub-espécie I	<i>Salmonella</i> sp sub-espécies IIIa e IIIb
TSI 24 horas	Base	A gás +/-	A gás -	A gás +	A gás +
	Bisel	V	V	V	V ou A
	H ₂ S	+/-	+	+	+
LIA 24 horas	Base	P	P	P	P
	H ₂ S	+/-	+	+	+
Urease		-	-	-	-
Motilidade		-	-	+	+

Salmonella sp sub espécie I – *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis* (entre outras)

Salmonella sp sub espécie IIIa e IIIb – Antigo grupo *Arizona*

A - amarelo (ácido); V – vermelho (alcalino); P – púrpura (alcalino)

Fonte: Brasil, 1994 (adaptado)

As cepas que apresentam resultados característicos na identificação bioquímica preliminar devem ser submetidas a testes bioquímicos complementares (QUADRO 4). As cepas que apresentaram perfil bioquímico compatível com *Salmonella* spp. devem ser caracterizadas antígenicamente por meio do teste de aglutinação rápida com soro anti-somático “O” polivalente de *Salmonella*.

QUADRO 4. Diferenciação de *Salmonella* spp.

Comportamento bioquímico	<i>Salmonella</i> sp sub-espécie I	<i>S. Pullorum</i>	<i>S. Gallinarum</i>	<i>Salmonella</i> sp sub-espécies IIIa e IIIb
Indol	-	-	-	-
VM	+	+	+	+
VP	-	-	-	-
Citrato	+	-	-	+
H ₂ S no TSI	+	d	+	+
Urease	-	-	-	-
Fenilalanina desaminase	-	-	-	-
Lisina descarboxilase	+	+	+	+
Arginina desidrolase	d	d	-	d
Ornitina descarboxilase	+	+	-	+
Motilidade	+	-	-	+
Malonato	-	-	-	+
D-Glicose produção de ácido	+	+	+	+
D-Glicose produção de gás	+	d	-	+
Lactose	-	-	-	d
Sacarose	-	-	-	-
D-Manitol	+	+	+	+
Dulcitol	+	-	+	-
Maltose	+	- (**)	+	+

Salmonella sp sub espécie I – *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis* (entre outras)

Salmonella sp sub espécie IIIa e IIIb – Antigo grupo *Arizona*

+ : 90-100% de cepas são positivas

- : 90-100% de cepas são negativas

d- diferentes tipos

(*) – ocasionalmente negativa

(**) – ou tardiamente positiva

Fonte: Brasil, 1994 (adaptado)

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O presente estudo foi realizado por meio de um estudo epidemiológico transversal, onde o total de frangos (n) da amostragem foi calculado com base numa prevalência (p) de 10%, usando um intervalo de confiança de 95% (z), um erro amostral (e) de 5%, utilizando-se a seguinte fórmula, segundo Thrusfield (1995):

$$n = \frac{z^2 \cdot p(1-p)}{e^2}$$

A análise de Regressão foi utilizada para avaliar a variável dependente peso dos frangos (PESO) frente aos seguintes fatores preditivos ou explicativos: isolamento de *E. coli* de sacos aéreos (ECS) e isolamento de *E. coli* de traquéia (ECT). A Regressão também foi utilizada para avaliar os problemas respiratórios (PR) dos frangos (aerossaculite, traqueíte, corrimento nasal) frente aos fatores preditivos ECS e ECT. Para tanto no registro das análises ficou convencionado que os frangos sem isolamento de *E. coli* seriam representados pelo número 1 (um) e os frangos com isolamento de *E. coli* pelo número 2 (dois). Do mesmo modo, o número 1 representou ausência de problemas respiratórios nas aves e o número 2 a sua presença.

O teste paramétrico t-Student foi usado para avaliar a influência dos PR sobre o PESO em duas classes (1000-2000g e 2250-3000g) como fator explicativo. O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis foi usado para analisar a relação entre as lesões encontradas na necropsia e a presença de *E. coli* em sacos aéreos e/ou traquéia das aves estudadas.

4 RESULTADOS

Dos 120 frangos estudados, em apenas dois não houve isolamento de *E. coli* de sacos aéreos ou traquéias. Dos 118 frangos positivos para *E. coli*, 18,6% (22/118) dos isolados foram dos sacos aéreos, 15,3 % (18/118) das traquéias e 66,1% (78/118) dos sacos aéreos e traquéias das mesmas aves. Portanto, um total de 100 isolados de *E. coli* foi obtido dos sacos aéreos, sendo que 57 foram identificados como *E. coli* pelas provas bioquímicas do IMViC e 43 pelo sistema API 20E. Das traquéias, um total de 96 isolados de *E. coli* foram identificados pelas provas bioquímicas do IMViC. A presença de problemas respiratórios (aerossaculite, traqueíte e corrimento nasal) foi observada nestes frangos positivos para *E. coli* (TABELA 1).

TABELA 1. Problemas respiratórios e isolamento de *E. coli* nos frangos de corte estudados na saída para o abate

	Isolamentos de <i>E. coli</i> (n)								Total Geral
	Positivo				Negativo				
Problemas Respiratórios	S	T	ST	Total	S	T	ST	Total	
Positivo	8	6	48	62	0	0	0	0	62
Negativo	14	12	30	56	0	0	2	2	58
Total	22	18	78	118*	0	0	2	2	120

* Dos 118 frangos positivos para *E. coli*, 12 apresentaram isolados com gene *iss* positivo na PCR

n = número de frangos; S = sacos aéreos; T = traquéia; ST = sacos aéreos e traquéia

Nos ensaios preliminares, em 10 cultivos estocados em Caldo BHI com glicerol (50% v/v), extraídos por meio de três protocolos de extração de DNA, não foram observados resultados positivos na PCR, após três repetições. Os 10 cultivos estocados em Caldo BHI com glicerol, repicados em Caldo BHI sem glicerol e

submetidos à extração de DNA por meio dos mesmos protocolos apresentaram um resultado positivo na PCR com o uso dos protocolos de extração térmica propostos por Carli et al. (2001) e por Santos (2001), em três repetições realizadas. Os “amplicons” de 760 pb foram melhor visualizados em gel de agarose com o uso da metodologia proposta por Carli et al. (2001).

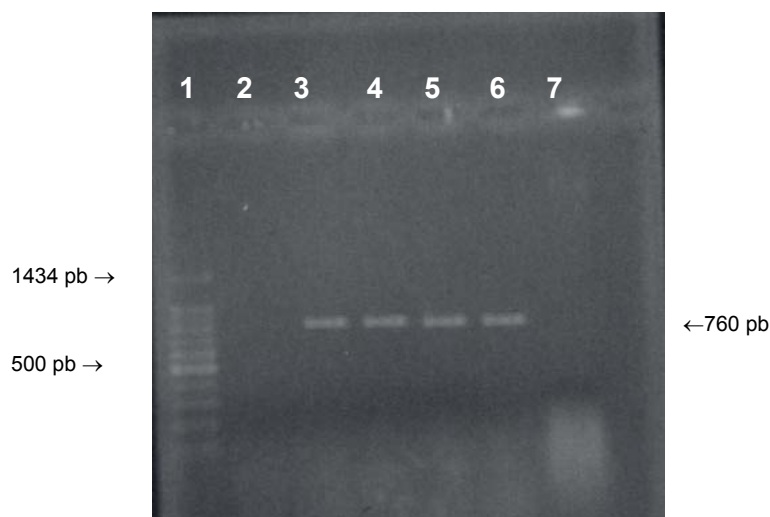
A detecção do gene *iss* ocorreu em 10,2% (12/118) das aves aparentemente saudáveis estudadas e positivas para *E. coli*. O gene *iss* foi detectado em nove isolados de *E. coli* provenientes de espécimes de sacos aéreos e em três de traquéia. Das nove *E. coli iss* positivas isoladas de sacos aéreos, cinco foram de frangos com problemas respiratórios e quatro de frangos sem problemas respiratórios. As três amostras *E. coli iss* positivas isoladas de traquéias foram obtidas de frangos sem problemas respiratórios (TABELA 1, FIGURAS 1 e 2).

FIGURA 1. Fotografia do gel de agarose da PCR para gene *iss* das amostras de *E. coli* isoladas de sacos aéreos.



1. Controle negativo; 2. a 10: amostras positivas (760pb); 11. Marcador Ladder 100pb

FIGURA 2. Fotografia do gel de agarose da PCR para gene *iss* das amostras de *E. coli* isoladas de traquéia.



1. Marcador Ladder 100 pb; 2. Controle negativo; 3,4,5,6 amostras positivas (760pb); 7. amostra negativa

Na análise de Regressão da relação peso dos frangos e isolamento de *E. coli* em sacos aéreos e traquéia, a seguinte equação foi obtida:

$$\text{PESO} = 2714,87 + (-231,32)(X1) + (-136,07)(X2)$$

O peso foi explicado por ECS e ECT em 4,5% (R^2) de forma significativa ($p < 0,05$). Estes resultados predizem que quanto maior a presença de *E. coli* menor o peso dos frangos. De acordo com a equação, o peso das aves foi inversamente relacionado à presença de *E. coli* em sacos aéreos e traquéia (TABELA 2).

TABELA 2. Valores de Regressão para peso de frangos de corte na saída para o abate como variável dependente frente a dois fatores independentes (ECS e ECT)

Fatores preditivos	Coefficiente	Erro padrão
Constante	2714,87	294,57
ECS (X1)	-231,32	111,35
ECT (X2)	-136,07	103,74

Número de casos: 120; ECS: isolamento de *E. coli* de sacos aéreos; ECT: isolamento de *E. coli* de traquéia. ($p < 0,05$) R^2 : 0,0448

Em outra análise de Regressão (TABELA 3), a análise da relação entre problemas respiratórios e ECS e ECT, a seguinte equação foi obtida:

$$PR = 0,5158 + (0,2911)(X1) + (0,2594)(X2)$$

TABELA 3. Valores de Regressão para problemas respiratórios em frangos de corte na saída para o abate como variável dependente frente a dois fatores independentes (ECS e ECT)

Fatores preditivos	Coefficiente	Erro padrão
Constante	0,5158	0,3165
ECS (X1)	0,2911	0,1196
ECT (X2)	0,2594	0,1114

Número de casos: 120; ECS: isolamento de *E. coli* de sacos aéreos; ECT: isolamento de *E. coli* de traquéia. ($p < 0,05$) R^2 : 0,0802

Os problemas respiratórios foram explicados pelo isolamento de *E. coli* em sacos aéreos e traquéia em 8,0% (R^2) de forma significativa ($p < 0,05$). Estes resultados predizem que os problemas respiratórios nos frangos estudados foram agravados pela presença de *E. coli*.

O peso médio dos 120 frangos estudados foi 2045,8g, com desvio padrão de 458,3g. Dos 118 frangos com isolamento positivo para *E. coli*, foram encontrados 55,9% (66/118) dos frangos na faixa de peso abaixo da média, entre 1000 a 2000g. Na faixa mais pesada, acima da média, entre 2250 a 3000g foram encontrados 44,21% (52/118) dos frangos. A presença de problemas respiratórios nestes frangos foi observada e avaliou-se a interferência dos problemas respiratórios dos frangos no peso. Pelo teste t-Student as diferenças observadas não foram estatisticamente significativas (TABELA 4).

TABELA 4. Presença de problemas respiratórios em relação a faixa de peso corporal em frangos de corte na saída para o abate com isolamento positivo para *E. coli*

Peso (g)	Problemas respiratórios		Total (n)
	Positivo (n)	Negativo (n)	
1000/2000	31	35	66
2250/3000	30	22	52
Total (n)	61	57	118

Teste t-Student

n = número de frangos

O percentual de 60,2% (71/118) dos frangos com isolamento de *E. coli* apresentou lesões de aerossaculite, pericardite e traqueíte simples ou combinadas. Destas 71 aves, 45,1% (32/71) apresentaram aerossaculite, 31,0% (22/71) com aerossaculite e pericardite, 14,1% (10/71) com pericardite, 7,0% (5/71) com aerossaculite e traqueíte, 1,4% (1/71) com traqueíte e 1,4% (1/71) com aerossaculite, pericardite e traqueíte. Pela análise de Kruskal-Wallis houve diferença significativa entre as lesões e a detecção de *E. coli* em sacos aéreos e traquéia, onde o maior percentual de isolamentos ocorreu quando foram combinadas espécimes de sacos aéreos e de traquéia de frangos com a observação de aerossaculite (28/71) ou de aerossaculite associada à pericardite (15/71) (TABELA 5).

TABELA 5. Número de frangos de corte positivos ao isolamento de *E. coli* e presença de lesões simples ou associadas

<i>E. coli</i>	Frangos de corte positivos para <i>E. coli</i> com lesões (n)						Total (n)
	A	AP	P	AT	T	APT	
ST	28	15	6	2	1	1	53
S	2	4	1	2	0	0	9
T	2	3	3	1	0	0	9
Total (n)	32	22	10	5	1	1	71

Teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$)

A: aerossaculite; P: pericardite; T: traqueíte; AP: aerossaculite e pericardite; AT: aerossaculite e traqueíte; APT: aerossaculite, pericardite e traqueíte; ST: sacos aéreos e traquéia; S: sacos aéreos; T: traquéia; n: número de frangos

As cepas submetidas ao antibiograma exibiram resistência a pelo menos 10 dos 20 antimicrobianos testados, sendo todas as amostras sensíveis à amicacina e ao aztreonam e resistentes aos seguintes antimicrobianos: ampicilina, clindamicina, eritromicina, penicilina, teicoplanina, tetraciclina e vancomicina. O comportamento em relação aos 20 antimicrobianos testados pode ser observado na TABELA 6.

TABELA 6. Resistência e sensibilidade das cepas de *E. coli* iss positivas para antimicrobianos utilizados no antibiograma

Antimicrobianos	Número de cepas (%)		
	Resistente	Sensível	Intermediário
Amicacina	0 (0)	12 (100)	0 (0)
Aztreonam	0 (0)	12 (100)	0 (0)
Ampicilina	12 (100)	0 (0)	0 (0)
Clindamicina	12 (100)	0 (0)	0 (0)
Eritromicina	12 (100)	0 (0)	0 (0)
Penicilina	12 (100)	0 (0)	0 (0)
Tetraciclina	12 (100)	0 (0)	0 (0)
Vancomicina	12 (100)	0 (0)	0 (0)
Teicoplanina	12 (100)	0 (0)	0 (0)
Ceftadizima	3 (25)	3 (25)	6 (50)
Ciprofloxacina	10 (83,3)	1 (8,3)	1 (8,3)
Cloranfenicol	3 (25)	6 (50)	3 (25)
Cefotaxima	0 (0)	10 (83,3)	2 (16,7)
Ácido nalidíxico	11 (91,7)	1 (8,3)	0 (0)
Nitrofurantoína	7 (58,3)	3 (25)	2 (16,7)
Norfloxacina	10 (83,3)	2 (16,7)	0 (0)
Oxacilina	10 (83,3)	2 (16,7)	0 (0)
Pefloxacina	11 (91,7)	0 (0)	1 (8,3)
Ácido pipemídico	11 (91,7)	0 (0)	1 (8,3)
Sulfametoxazol/trimetoprim	5 (41,7)	6 (50)	1 (8,3)

Os 120 soros submetidos à SAR apresentaram resultado negativo na detecção de anticorpos contra *M. gallisepticum* e *M. synoviae*.

Dos 120 espécimes de traquéias e dos 120 espécimes de sacos aéreos utilizados para o cultivo de *Mycoplasma* spp., não houve resultado positivo no meio líquido, nem no meio sólido.

Dos 120 suabes de cloaca utilizados no enriquecimento seletivo e dos 120 suabes de cloaca utilizados no enriquecimento não seletivo, não houve isolamento positivo para *Salmonella* spp.

As colônias suspeitas, obtidas nos meios de plaqueamento, não apresentaram comportamento bioquímico de *Salmonella* spp. na identificação bioquímica preliminar, tanto na metodologia com enriquecimento seletivo como na metodologia com enriquecimento não seletivo.

5 DISCUSSÃO

A pesquisa de *E. coli* e micoplasmas, em sacos aéreos e traquéias de frangos de corte em idade de abate, é importante por fornecer informações sobre a qualidade sanitária das aves. Além disto, a investigação da presença de *Salmonella* spp. também contribui para o estabelecimento da condição sanitária das aves estudadas.

O gene de virulência *iss* foi detectado em *E. coli* isoladas dos frangos aparentemente saudáveis, embora muitos deles apresentassem lesões respiratórias à necropsia. Este resultado vem de encontro aos observados por outros autores em que este gene, apesar de ser encontrado com maior frequência em *E. coli* provenientes de aves doentes, também está presente em isolados de *E. coli* de aves aparentemente saudáveis (HORNE et al., 2000; PFAFF-MCDONOUGH et al., 2000; FOLEY et al. 2003), o que é bastante preocupante, pois o gene *iss* contribui para a virulência de *E. coli* aviária, participando da patogênese da colibacilose e pode ser transferido para cepas virulentas que adquirem a capacidade de resistir aos efeitos bactericidas do soro do hospedeiro, resistência a antimicrobianos, bem como outros mecanismos de virulência. No presente estudo, o percentual de gene *iss* detectado nas aves com isolados de *E. coli* foi de 10,2%, porém os espécimes utilizados foram provenientes de sacos aéreos e traquéia, enquanto Pfaff-McDonough et al. (2000) e Delicato et al. (2003) detectaram o gene *iss* em 18,7% e 16,0%, respectivamente, das cepas de *E. coli* isoladas de fezes de aves saudáveis por eles estudadas.

Na relação entre o peso das aves e o isolamento de *E. coli* demonstrou-se que a diminuição do peso foi mais acentuada quando a *E. coli* estava presente nos sacos aéreos. Esta análise foi conduzida porque, segundo Mendes e Patrício (2004), um dos índices diretos de maior influência no custo de produção de frangos de corte é o peso médio. A presença de *E. coli*, em sacos aéreos e traquéias de frangos de

corde, observada neste trabalho com conseqüente diminuição do peso das aves é relevante, pois esta perda de peso dos frangos ocasiona prejuízos econômicos, como a diminuição do ganho dos avicultores. Por isso, a prevenção das enfermidades ocasionadas pela *E. coli* é importante para evitar perdas econômicas no setor avícola, bem como perda de um alimento de origem animal de boa qualidade nutricional.

Russel (2003), em seus estudos, sugeriu que a presença de aerossaculite diminui o peso dos lotes de frangos, resultando em falhas durante o processamento pelo menor tamanho das carcaças das aves afetadas dentre aquelas normais. Entretanto, neste trabalho, a interferência dos problemas respiratórios (aerossaculite, traqueíte e corrimento nasal) no peso dos frangos estudados não foi significativa, embora um aumento na amostra talvez evidenciasse esta interferência. Contudo, a relação entre a presença de *E. coli* com peso e problemas respiratórios foi estatisticamente significativa. Os problemas respiratórios são agravados pela presença de *E. coli*, o que foi observado neste estudo e está de acordo com outros trabalhos (DHO-MOULIN e FAIRBROTHER, 1999; MINHARRO et al., 2001; TIVENDALE et al., 2004).

As lesões mais encontradas, durante a necropsia, nos 118 frangos positivos para *E. coli* foram a aerossaculite e a pericardite. Essas lesões estão associadas às condenações de carcaças em matadouros (BRASIL, 1998b; MENDES, 2004). A frequência de aerossaculite de 45,1% encontrada neste estudo está de acordo com os estudos anteriores de Assis et al. (2003) e Branco (2004), que apontam a aerossaculite como uma das principais causas de condenações de carcaças em matadouros brasileiros. A segunda lesão mais encontrada foi a aerossaculite associada à pericardite, o que pode ser explicado pela continuidade dos sacos aéreos com o pericárdio.

A observação da *E. coli* como o principal agente bacteriano isolado de lesões de sacos aéreos em frangos, está de acordo com as conclusões de Rosales (1991) e Minharro et al. (2001) que consideraram esta bactéria como o principal agente da aerossaculite. Nos frangos com lesões de aerossaculite, pericardite e traqueíte, a maior frequência de isolamento de *E. coli* foi em sacos aéreos e traquéia concomitantemente, sendo justificada pelo uso desses dois espécimes em vez de apenas um deles, aumentando a chance de isolamento.

Um alto nível de resistência, das cepas de *E. coli* de origem aviária, aos antibióticos observado neste estudo, o que também foi obtido por outros autores (YANG et al., 2004). A resistência de *E. coli* aviária à norfloxacin em 83,3% das cepas patogênicas (gene *iss*) encontrada no antibiograma está de acordo com Cardoso et al. (2002), que também evidenciaram resistência à norfloxacin em 75,8% das cepas de *E. coli* isoladas de frangos de corte. Achados semelhantes, em relação a eritromicina, foram relatados anteriormente por Cloud et al. (1985), Erganis et al. (1989), Allan et al. (1993) e Peighambari et al. (1995) observaram um percentual de resistência de 82%, 80%, 98% e 100%, respectivamente. Nos trabalhos de Cloud et al. (1985), Wooley et al. (1992), Peighambari et al. (1995) e no de Blanco et al. (1997), a resistência à tetraciclina foi de 81,6%, 80%, 88% e 95%, respectivamente. Uma alta frequência de resistência aos citados antimicrobianos é demonstrada em estudos anteriores e são compatíveis aos encontrados neste estudo, onde a resistência à eritromicina e à tetraciclina foi observada em todas as cepas testadas.

Neste estudo foram encontradas cepas resistentes ao cloranfenicol, à penicilina, à tetraciclina e à sulfametoxazol/trimetoprim, ou seja, aos antimicrobianos com uso vetado pela legislação brasileira como aditivos alimentares, promotores de crescimento ou como conservantes de alimentos para animais (BRASIL, 1998a), o que pode ser explicado pelo uso abusivo desses antimicrobianos antes de 1998 ou pelo seu uso indevido. O nível observado de resistência aos antimicrobianos nas cepas de *E. coli* testadas demonstra a real necessidade do seu uso correto, em criações de frangos de corte, com o objetivo de tratar possíveis infecções pela *E. coli* nas aves. Todavia, o problema do aumento da resistência bacteriana vem gerando algumas medidas a serem adotadas pelos criadores com o intuito de minimizar este preocupante problema de saúde pública, ou seja, o surgimento de resistência cruzada de *E. coli* aviária com patógenos entéricos dos seres humanos (BARTON, 2000; VAN DEN BOGAARD et al., 2001).

A presença da resistência à tetraciclina e à ampicilina encontrada nas cepas de APEC isoladas neste estudo, onde o gene *iss* estava presente, corrobora os resultados de Johnson et al. (2002). Esses autores evidenciaram a localização do gene *iss* no plasmídeo de conjugação R que codifica resistência à tetraciclina e à ampicilina. Este resultado serve de alerta, pois o uso de tetraciclina ou ampicilina

nas criações de frangos poderia ocasionar uma seleção de bactérias patogênicas para as aves (JOHNSON et al., 2004).

Linzitto e Menéndez (1996) observaram um percentual maior de lesões de traquéia, seios nasais e pulmões por *Mycoplasma* spp., quando comparadas com lesões ocasionadas por *E. coli*, ao contrário do observado no presente trabalho em que nenhum dos 120 frangos estudados foi positivo para MG ou MS. Estes resultados vêm de encontro às observações de Alencar et al. (1998) que ao pesquisar MG e MS, em 125 frangos de corte, também não obtiveram resultados positivos. Entretanto, Minharro et al. (2001) detectaram MG e MS em “pools” de sacos aéreos lesados, empregando a técnica da PCR, em 32,25% (10/31) e 25,80% (8/31) dos lotes estudados, respectivamente.

O resultado negativo para *Salmonella* spp., no presente estudo, com a metodologia de isolamento do PNSA, diferiu dos resultados anteriores de Pereira et al. (1999) que obtiveram resultados positivos no isolamento, porém negativos na SAR. Entretanto, Gambiragi et al. (2003) obtiveram resultados positivos na SAR e negativos no isolamento. Já no trabalho de Tessari et al. (2003) o percentual de resultados positivos encontrado para salmonelas foi de 24,62 % (32/130). Porém, tais autores analisaram 130 lotes compostos cada um por 10 pintos de corte que foram estudados em “pool”, o que pode ter favorecido este percentual.

Os frangos de corte utilizados neste estudo, livres de *Salmonella* spp. na saída para o abate, além de diminuir o risco para a saúde pública, reduz inclusive as chances de deterioração da carcaça e a diminuição da sua vida útil, o que é de grande interesse para a indústria avícola. A ausência de salmonelas nas aves melhora a qualidade microbiológica do produto final, conforme já relatado por outros autores (GAMBIRAGI et al., 2003; NASCIMENTO et al., 1996; PEREIRA et al., 1999).

6 CONCLUSÕES

1- A presença de *E. coli* nos sacos aéreos e/ou traquéia interferiu no peso e na freqüência de problemas respiratórios nos frangos de corte estudados.

2- A presença de aerossaculite e/ou pericardite na maioria dos frangos de corte estudados depreciou a qualidade sanitária dos mesmos, de vez que se constituem em causas de condenação em matadouros.

3- O uso de suabes de sacos aéreos e traquéia concomitantemente melhorou a eficiência da freqüência do isolamento de *E. coli*.

4- As *E. coli* patogênicas aviárias, encontradas neste estudo, foram resistentes a antimicrobianos de uso no tratamento de enfermidades em frangos de corte e de uso proibido pela legislação brasileira em criações de aves para consumo.

5- A presença do gene *iss* em *E. coli* patogênica, nos frangos aparentemente saudáveis, constitui-se num problema de saúde pública, uma vez que a resistência à tetraciclina e à ampicilina está associada ao mesmo.

6- Os problemas respiratórios não estavam relacionados à presença de micoplasmas, de vez que os frangos, na saída para o abate, foram negativos para este agente.

7- A boa qualidade sanitária, em relação à *Salmonella* spp., foi comprovada pela ausência deste microrganismo nos frangos de corte estudados, com a subsequente diminuição do risco de contaminação no processamento tecnológico da carne destes frangos.

7 OBRAS CITADAS

ABEF. Associação Brasileira de Produtores e Exportadores de Frangos. Produção brasileira e Consumo brasileiro de carne de frangos. Disponível em: <<http://www.abef.com.br/estatisticas/MercadoInterno/producao.htm>> e <<http://www.abef.com.br/estatisticas/MercadoInterno/consumoanual.htm>>. Acesso em: 11 jan. 2005.

ALENCAR, A. P.; NASCIMENTO, E.R.; DANELLI, M.G.M.; LIGNON, G.B.; SANTOS, M.A. J.; NASCIMENTO, M.G.F. Relação entre infecção por *Mycoplasma gallisepticum* e *M. synoviae* e lesões de sacos aéreos em frangos de corte. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v.20, n. 6, p. 257-262, 1998.

ALLAN, B.J.; VAN DEN HURK, J.V.; POTTER, A.A. Characterization of *Escherichia coli* isolated cases of avian colibacillosis. *Canadian Journal of Veterinary Research*, v. 57, p. 146-151, 1993.

ANÔNIMO. Associação Brasileira de Pintos de Corte – APINCO. DATAPINCO, Informativo, Campinas, jan., 2000.

ANÔNIMO. Avicultura brasileira mantém crescimento em 2003. Disponível em:<http://www.dipemar.com.br/carne/324/materia_especial_carne.htm>. Acesso em: 14 out. 2004.

ANÔNIMO. Consumo da carne de frango: situação atual e perspectivas para 2005. Disponível em:<<http://www.avisite.com.br/noticias/maisnotss.asp?CodCategoria=&CodNoticia=5175&Mês=12&Ano=2004>>. Acesso em: 27 jan. 2005a.

ANÔNIMO. Nos EUA, consumo de carne de frango segue aumentando. Disponível em:<<http://www.avisite.com.br/noticias/maisnotss.asp?CodCategoria=&CodNoticia=5159&Mês=12&Ano=2004>>. Acesso em: 27 jan. 2005b.

ARNS, C.W.; COSWIG, L.T.; MONTEIRO, M.C.G.B. Pneumovirose aviária. In: BERCHIERI JR, A; MACARI, M. *Doença das aves*. Campinas: FACTA, 2000. Cap. 5.11, p. 359-366. 490p.

ASSIS, M.T.Q.M.; GRUBER, G.L.; HOFMEISTER, A.W.; GUIMARÃES, A.M.P. Avaliação do percentual de descarte na condenação parcial de frangos. *Revista Nacional da Carne*, n. 313, p. 22-31, 2003.

BALEN, L.O., FIORENTIN, L. O *Mycoplasma synoviae* e seu impacto econômico sobre a avicultura. In: CONFERÊNCIA APINCO 1990 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, Campinas, *Anais...*Campinas: FACTA, 1990, p. 135-140.

BARONDESS, J.J.; BECKWITH, J. A bacterial virulence determinant encoded by lysogenic coliphage λ . *Nature*, v. 346, p. 871-874, 1990.

BARTON, M.D. Antibiotic use in animal feed and its impact on human health. *Nutrition Research Reviews*, v. 13, p. 279-299, 2000.

BAUER, A.W.; KIRB, W.M.M.; SCHERRIS, J.C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. *The American Journal of Clinical Pathology*, v. 45, n. 4, p. 493-496, 1966.

BERCHIERI JR., A. Salmoneloses aviárias. In: BERCHIERI JR, A; MACARI, M. *Doença das aves*. Campinas: FACTA, 2000. Cap. 4.1, p. 185-196. 490p.

BINNS, M.M.; DAVIES, D.L.; HARDY, K.G. Cloned fragments of the plasmid ColV, I-K94 specifying virulence and serum resistance. *Nature*, v. 279, p. 778-781, 1979.

BINNS, M.M.; MAYDEN, J.; LEVINE, R.P. Further characterization of complement resistance conferred on *Escherichia coli* by the plasmid genes *traT* of R100 and *iss* of ColV, I-K94. *Infection and Immunity*, v. 35, n. 2, p. 654-659, 1982.

BLANCO, J.E.; BLANCO, M.; MORA, A.; BLANCO, J. Prevalence of bacterial resistance to quinolones and other antimicrobials among avian *Escherichia coli* strains isolated from septicemic and healthy chickens in Spain. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 35, n. 8, p. 2184-2185, 1997.

BOTTEZINI, I.M.P.; CORSO, M.P.; VEIT, V.M. O uso de antibióticos na produção de frangos. Disponível em: <http://www.dipemar.com.br/carne/309/materia_artec_carne.htm>. Acesso em: 27 jan. 2005.

BRANCO, J.A.D. Manejo pré-abate e perdas decorrentes do processamento de frangos de corte. In: CONFERÊNCIA APINCO 2004 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2004, Campinas, *Anais...*Campinas : FACTA, 2004, v.2, p.129-142.

BRASIL. Resolução Mercosul n.º 3 de 1997. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento técnico para registro de antimicrobianos de uso veterinário.

BRASIL. Portaria n.º 193 de 12 de maio de 1998a. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento Técnico Para Licenciamento e Renovação de Licença de Antimicrobianos de Uso Veterinário.

BRASIL. Portaria n.º 210 de 10 de novembro de 1998b. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento Técnico da Inspeção Tecnológica e Higiênico-sanitária de carne de aves.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Programa Nacional de Sanidade Avícola. 1994.

BREMNER, A.S. *Higiene e Inspeccion de carne de aves*. Zaragoza: Editorial Acribia, 1981. 209p.

BRENNER, F.W.; VILLAR, R.G.; ANGULO, F.J.; TAUXE, R.; SWAMINATHAN, B. *Salmonella* nomenclature. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 38, n. 7, p. 2465-2467, 2000.

BROWN, L.R. Carnes. Mercado em alta. Disponível em: <<http://www.joelmirbeting.com.br/noticias.asp?ldgNews=6eldnews=196>>. Acesso em: 27 jan. 2005.

CAMPOS, L.C. *Salmonella*. In: TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O.F.; CANDEIAS, J.A.N. *Microbiologia*. São Paulo: Editora Atheneu, 3 ed., 1999. cap. 29. p. 229-234.

CAMPOS, L.C.; TRABULSI, L.R. *Escherichia*. In: TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O.F.; CANDEIAS, J.A.N. *Microbiologia*. São Paulo: Editora Atheneu, 3 ed., 1999. cap. 28. p. 215-228.

CARDOSO, ALSP; TESSARI, ENC; CASTRO, AGM; PULICI, SCP; ZANATTA, GF. Prevalência de resistência em amostras de *Escherichia coli* de origem aviária. In: CONFERÊNCIA APINCO 2002 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2002, Campinas, *Anais...* Campinas : FACTA, 2002, p.129.

CARLI, K.T.; UNAL, C.B.; CANER, V.; EYIGOR, A. Detection of Salmonellae in chicken feces by combination of tetrathionate broth enrichment capillary PCR, and capillary gel eletrophoreses. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 39, n. 5, p. 1871-1876, 2001.

CASTRO, A.G.M. Enfermidades do sistema respiratório. In: BERCHIERI JR, A; MACARI, M. *Doença das aves*. Campinas: FACTA, 2000. Cap. 2.6, p. 71-74. 490p.

CHARLES, D.R. Poultry meat: a food for today. Disponível em: <<http://www.foodsciencecentral.com/library.html#ifis/11702> >. Acesso em: 27 jan. 2005.

CHARLTON, B.R.; BERMUDEZ, A.J.; BOULIANNE, M.; ECKROADE, R.J.; JEFFREY, J.S.; NEWMAN, L.J.; SANDER, J.E.; WAKENELL, P.S. In:

CHARLTON, B.R. *Avian Disease Manual*. USA: American Association of Avian Pathologists, 1996. p.115-25.

CHUBA, P.J.; LEON, M.A.; BANERJEE, A.; PALCHAUDHURI, S. Cloning and DNA sequence of plasmid determinant *iss*, coding for increased serum survival and surface exclusion, which has homology with lambda DNA. *Molecular and General Genetics*, v. 216, p. 287-292, 1989.

CHUBA, P.J.; PALCHAUDHURI, S.; LEON, M.A. Contributions of *traT* and *iss* genes to the serum resistance phenotype of plasmid ColV2-K94. *FEMS Microbiology Letters*, v. 37, p. 135-140, 1986.

CLOUD, S.S.; ROSENBERGER, J.K.; FRIES, P.A.; WILSON, R.A.; ODOR, E.M. In vitro and in vivo characterization of avian *Escherichia coli*. Serotypes, metabolic activity, and antibiotic sensitivity. *Avian Diseases*, v.29, p. 1084-1093, 1985.

DAVIS, B.D.; DULBECCO, R.; EISEN, H.N.; GINSBERG, H.S.; WOOD, W.B. *Infecções Bacterianas e Micóticas*. São Paulo: EDART; 1973.

DEKICH, M.A. Broiler industry strategies for control of respiratory and enteric diseases. *Poultry Science*, v. 77, p. 1176-1180, 1998.

DELAZARI, I. Abate e processamento de carne de aves para garantia da qualidade. In: CONFERÊNCIA APINCO 2001 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, Campinas, *Anais...Campinas* : FACTA, 2001, p. 191-203.

DELAZARI, I. Programas de segurança de alimentos na indústria de produtos avícolas. In: CONFERÊNCIA APINCO 2003 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, Campinas, *Anais...Campinas* : FACTA, 2003, p. 123-126..

DELICATO, E.R.; BRITO, B.G.; GAZIRI, L.C.J.; VIDOTTO, M.C. Virulence associated genes in *Escherichia coli* isolates from poultry with colibacillosis. *Veterinary Microbiology*, v. 94, p. 97-103, 2003.

DHO-MOULIN, M.; FAIRBROTHER, J.M. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Veterinary Research*, v.30, p. 299-316, 1999.

DICKEL, E.L. *Salmonella* em produtos avícolas e aspectos da legislação. In: CONFERÊNCIA APINCO 2004 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, Santos, *Anais...Santos* : FACTA, 2004, p. 201-210.

DOYLE, M.P.; CLIVER, D.O. *Escherichia coli*. In: CLIVER, D.O. *Foodborne diseases*. San Diego, California: Academic Press, 1990a. cap. 13, p. 209-216.

DOYLE, M.P.; CLIVER, D.O. *Salmonella*. In: CLIVER, D.O. *Foodborne diseases*. San Diego, California: Academic Press, 1990b. cap. 11, p. 185-208.

DOZOIS, C.M.; DAIGLE, F.; CURTISS III, R. Identification of pathogen-specific and conserved genes expressed in vivo by an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 100, n. 1, p. 247-252, 2003.

ERGANIS, O.; KAYA, O.; CORLU, M.; ISTANBULLUOGLU, E. Hemagglutination, hydrophobicity, enterotoxigenicity, and drug-resistance characteristics of avian *Escherichia coli*. *Avian Diseases.*, v.33, p.631–635, 1989.

EUZÉBY, J.P. Revised *Salmonella* nomenclature: designation of *Salmonella enterica* (ex Kauffmann and Edwards 1952) Le Minor and Popoff 1987 sp. Nov., nom. ver. As the neotype species of the genus *Salmonella* Lignieres 1900 (Approved Lists 1980), rejection of the name *Salmonella choleraesuis* (Smith 1894) Weldin 1927 (Approved Lists 1980), and conservation of the name *Salmonella typhi* (Schroeter 1886) Warren and Scott 1930 (Approved Lists 1980). Request for an opinion. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 49, p. 927-930, 1999.

FÁBIO, J.D.; ROSSINI, L.I. Bronquite infecciosa das galinhas. In: BERCHIERI JR, A; MACARI, M. *Doença das aves*. Campinas: FACTA, 2000. Cap. 5.4, p. 293-300. 490p.

FEDDE, M.R. Relationship of structure and function of the avian respiratory system to disease susceptibility. *Poultry Science*, v. 77, p. 1130-1138, 1998.

FERREIRA, AJP; KNÖBL, T. *Colibacilose aviária*. In: BERCHIERI JR, A; MACARI, M. *Doença das aves*. Campinas: FACTA, 2000. Cap. 4.2, p. 197-208. 490p.

FICKEN, M.D. Respiratory system. In: RIDDELL, C. *Avian Histopathology*. Pennsylvania: American Association of Avian Pathologists, 1996. Cap. 6, p. 89-109. 234p.

FIGUEIREDO, E.A.P. Avicultura de corte ou de postura? Disponível em: <<http://www.bichoonline.com.br/artigos/embrapave0003.htm>>. Acesso em: 27 jan. 2005.

FILHO, R.L.A. Enfermidades micóticas. In: BERCHIERI JR, A; MACARI, M. *Doença das aves*. Campinas: FACTA, 2000. Cap. 6.1, p. 369-378. 490p.

FOLEY, S.L.; HORNE, S.M.; GIDDINGS, C.W.; GUSTAD, T.R.; HANDEGARD, E.D.; ROBINSON, M.; NOLAN, L.K. Monoclonal antibodies to avian *Escherichia coli* Iss. *Avian Diseases*, v. 47, p. 79-86, 2003.

FOLEY, S.L.; HORNE, S.M.; GIDDINGS, C.W.; ROBINSON, M.; NOLAN, L.K. Iss from a virulent *Escherichia coli*. *Avian Diseases*, v. 44, p. 185-191, 2000.

FÓSCOLO, C.B. Micoplasmose Aviária: ainda um risco a produção avícola. Disponível em: <<http://www.avisite.com.br/cet/1/14/index.shtm>>. Acesso em: 09 mar. 2005.

FRANCO, B.D.G, LANDGRAF, M. Microrganismos patogênicos de importância em alimentos. In: FRANCO, B.D.G.; LANDGRAF, M. *Microbiologia dos Alimentos*. São Paulo: Editora Atheneu, 1996. cap. 4. p. 33-81.

GAMA, N.M.S. Laringotraqueíte: o caso brasileiro. In: CONFERÊNCIA APINCO 2004 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, Santos, *Anais...*Santos : FACTA, 2004, p. 85-92.

GAMA, N.M.S.Q.; NASCIMENTO, V.P. Coriza infecciosa das galinhas e Pasteureloses. In: BERCHIERI JR, A; MACARI, M. *Doença das aves*. Campinas: FACTA, 2000. Cap. 4.5, p. 225-238. 490p.

GAMBIRAGI, A.P.O.M.; SALLES, R.P.R.; FILHO, J.L.A.; OLIVEIRA, W.F.; MACIEL, W.C.; ROMÃO, J.M.; TEIXEIRA, R.S.C. *Salmonella* sp em frangos de corte de um dia de idade na região metropolitana de Fortaleza-CE. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 31, n. 3, p. 149-153, 2003.

GARCIA, M. Vírus da Laringotraqueíte Infecciosa (ILTV) – Diagnóstico e controle. In: CONFERÊNCIA APINCO 2003 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, Campinas, *Anais...*Campinas : FACTA, 2003, p. 295-304.

GINNS, C.A .; BENHAM, M.L.; ADAMS, L.M.; WHITHEAR, K.G.; BETTELHEIM, K.A .; CRABB, B.S.; BROWNING, G.F. Colonization of the respiratory tract by a virulent strain of avian *Escherichia coli* requires carriage of a conjugative plasmid. *Infection and Immunity*, v. 68, n. 3, p. 1535-1541, 2000.

GLISSON, J.R. Bacterial respiratory diseases of poultry. *Poultry Science*, v. 77, p. 1139-1142, 1998.

HAFEZ, H.M. Perspectiva global de enfermidades emergentes e re-emergentes em aves. In: CONFERÊNCIA APINCO 2005 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, Santos, *Anais...*Santos : FACTA, 2005, p. 123-138.

HOLT, J.G., KRIEG, N.R., SNEATH, P.H.A., STALEY, J.T., WILLIAMS, S.T. Facultatively anaerobic Gram negative. In: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9. ed. Baltimore: Williams e Wilkins, 1994. 787 p.

HORNE, S.M.; MCDONOUGH, J.P.; GIDDINGS, C.W.; NOLAN, L.K. Cloning and sequencing of *iss* gene from virulent avian *Escherichia coli*. *Avian diseases*, v. 44, p. 179-184, 2000.

JANßEN, T.; SCHWARZ, C.; PREIKSCHAT, P.; VOSS, M.; PHILIPP, H.C.; WIELER, L.H. Virulence-associated genes in avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from internal organs of poultry having died from colibacillosis. *International Journal of Medical Microbiology*, v. 291, p. 371-378, 2001.

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. Virulence factors of *Escherichia coli* from cellulitis or colisepticemia lesions in chickens. *Avian Diseases*, v. 46, p. 48-52, 2002.

JOHNSON, T.J.; GIDDINGS, C.W.; HORNE, S.M.; GIBBS, P.S.; WOOLEY, R.E.; SKYBERG, J.; OLAH, P.; KERCHER, R.; SHERWOOD, J.S.; FOLEY, S.L.; NOLAN, L.K. Location of increased serum survival gene and selected virulence traits on a conjugative R plasmid in an avian *Escherichia coli* isolate. *Avian Diseases*, v. 46, p. 342-352, 2002.

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

KAWAZOE, U. Criptosporidiose aviária. In: BERCHIERI JR, A; MACARI, M. *Doença das aves*. Campinas: FACTA, 2000. Cap. 7.2, p. 407-412. 490p.

KLEVEN, S.H. *Mycoplasma gallisepticum* – uma doença emergente. In: V SIMPÓSIO BRASIL SUL DE AVICULTURA, Chapecó, 2004, p. 47-54.

KLEVEN, S.H. Mycoplasmosis. In: CALNEK, B.W. *Diseases of poultry*. 10 ed. USA: Iowa State University Press, 1997, p. 191-193.

KORNACKI, J.L.; JOHNSON, J.L. *Enterobacteriaceae*, Coliforms and *Escherichia coli* as quality and safety indicators. In: DOWNES, F.P.; ITO, K. *Compendium of Methods for the Microbiological examination of foods*. 4 ed. Washington: APHA, 2001. 676 p. cap. 8, p. 69-82.

LEÃO, J.A.; CANAL, C.W.; SALLE, C.T.P. Isolamento e prevalência de *Ornithobacterium rhinotracheale* em matrizes e frangos de corte na região sul do Brasil. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 30, n. 2, p. 145-146, 2002.

LEITÃO, M.F.F. Qualidade e segurança alimentar em produtos avícolas. In: CONFERÊNCIA APINCO 2001 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, Campinas, *Anais...*Campinas : FACTA, 2001, p. 181-190.

LE MINOR, L. Genus III – *Salmonella*. In: KRIEG, N.R.; HOLT, J.G. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore: Willians and Wilkins, 1984. v. 1, p. 427-458. 964 p.

LEY, D.H.; YODER JR, H.W. *Mycoplasma gallisepticum* infection. In: CALNEK, B.W. *Diseases of poultry*. 10 ed. USA: Iowa State University Press, 1997, p. 194-207.

LINZITTO, O.R.; MENÉNDEZ, N.A. *Mycoplasma* e *Escherichia coli* associados a problemas respiratórios em aves na República Argentina. *A Hora Veterinária*, v. 94, p. 46-47, 1996.

LOBÃO, M.L.; LIMA, C.B.S.; NASCIMENTO, E.R.; SANTOS, M.G.; MEDEIROS, M.I.M.; BARRETO, M.L.; LEMOS, M.; SILVA, R.C.F.; PEREIRA, V.L.A. Micoplasmoses em Avestruzes (*Struthio camelus*). In: VIII SEMANA DE EXTENSÃO DA UFF; 2003; Niterói, Rio de Janeiro. p. 181-2.

MAINIL, J. Facteurs de virulence et propriétés spécifiques des souches invasives d'*Escherichia coli*: II) Franchissement des muqueuses et propriétés invasives. *Annales de Médecine Vétérinaire*, v. 147, p. 159-171, 2003.

MARKHAN, P.F.; GLEW, M.D.; SYKES, J.E.; BOWDEN, T.R.; POLLOKS, T.D.; BROWNING, G.F.; WHITHEAR, K.G.; WALKER, I.D. The organization of multigene family which encodes the major cell surface protein, pMGA, of *Mycoplasma gallisepticum*. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, v. 352, n. 3, p. 347-352, 1998.

MARTINS, P.C. Problemas respiratórios em frangos de corte: a situação no Brasil. In: CONFERÊNCIA APINCO 1991 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 1991, Campinas, *Anais...Campinas : FACTA*, 1991, p.177-181.

MELLATA, M.; DHO-MOULIN, M.; DOZOIS, C.M.; CURTISS III, R.; BROWN, P.K.; ARNÉ, P.; BRÉE, A.; DESAUTELS, C.; FAIRBROTHER, J.M. Role of virulence factors resistance of avian pathogenic *Escherichia coli* to serum and in pathogenicity. *Infection and Immunity*, v. 71, n. 1, p. 536-540, 2003.

MENÃO, M.C.; FERREIRA, C.S.A. CASTRO, A.G.M.; KNÖBI, T.; FERREIRA, A.J.P. Sorogrupos e *Escherichia coli* isolados de frangos com doença respiratória crônica. *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 69, n. 4, p. 15-17, 2002.

MENDES, AA. Características de interesse industrial das principais linhagens de cortes criadas no Brasil. In: *Industrialização da carne de frango*. CTC: Campinas, 1992. 78p.

MENDES, A.A. Rendimento e Qualidade da Carcaça de Frangos de Corte. In: CONFERÊNCIA APINCO 2001 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, Campinas, *Anais...Campinas : FACTA*, 2001, p.79-99.

MENDES, A.A. Controle de perdas e condenações no abatedouro. *Ave World*, n. 6, dez./jan., p. 16-25, 2004.

MENDES, A.A.; PATRÍCIO, I.S. Controles, registros e avaliação do desempenho de frangos de corte. In: MENDES, A.A.; NÄÄS, I.A.; MACARI, M. *Produção de frangos de corte*. Campinas: FACTA, 2004. cap. 20, p. 323-335.

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

MONTEIRO, M.C.G.B.; ROSSINI, L.I. Problemas respiratórios em frangos de corte. In: MENDES, A.A.; NÄÄS, I.A.; MACARI, M. *Produção de frangos de corte*. Campinas: FACTA, 2004. cap. 14, p. 261-274.

MORAES, H.L.S.; SALLE, C.T.P. Influenza aviária. In: BERCHIERI JR, A; MACARI, M. *Doença das aves*. Campinas: FACTA, 2000. Cap. 5.3, p. 283-292. 490p.

NASCIMENTO, E.R. Micoplasmoses. In: BERCHIERI JR, A; MACARI, M. *Doença das aves*. Campinas: FACTA, 2000. Cap. 4.4, p. 217-224. 490p.

NASCIMENTO, V.P.; SILVA, A.B.; SALLE, C.T.P.; RIBEIRO, A.R.; SCHUCH, D.M.T.; SANTOS, L.R.; CARDOSO, M.O.; ROCHA, S.L.S.; VIEIRA, J.S. Ocorrência de *Salmonella* sp em carcaças de frango industrialmente processadas. In: CONFERÊNCIA APINCO 1996 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, Campinas, *Anais...* Campinas: FACTA, 1996, p. 81.

NAVARRO, M.P. Infecção por *Salmonella enteritidis* em reprodutoras pesadas na América Latina. In: CONFERÊNCIA APINCO 1995 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, Curitiba, *Anais...*Curitiba : FACTA, 1995, p.7-16.

NCRA. North Central Regional Association of Agricultural Experiment Station Directors. NC228: Avian Respiratory Diseases: Pathogenesis, surveillance, diagnosis and control. Disponível em: <http://lgu.umd.edu/lgu_v2/homepages/home.cfm?trackID=1514>. Acesso em: 20 jan. 2005.

NOLAN, L.K.; GIDDINGS, C.W.; HORNE, S.M.; DOETKOTT, C.; GIBBS, P.S.; WOOLEY, R.E., FOLEY, S.L. Complement resistance, as determined by viable count and flow cytometric methods, and its association with the presence of *iss* and the virulence of avian *Escherichia coli*. *Avian Diseases*, v. 46, p. 386-392, 2002.

OLIVEIRA, L.C. Novos Critérios na Inspeção industrial e sanitária de aves. In: CONFERÊNCIA APINCO 1995 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 1995, Curitiba, *Anais...*Campinas : FACTA, 1995, p.119-134.

PARSONNET, K.C.; KASS, E.H. Does prolonged exposure to antibiotic-resistant bacteria increase the rate of antibiotic-resistant infection? *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 31, n. 6, p. 911-914, 1987.

PAULILLO, A.C.; DORETTO JR., L. Doença de Newcastle. In: BERCHIERI JR, A; MACARI, M. *Doença das aves*. Campinas: FACTA, 2000. Cap. 5.2, p. 267-282. 490p.

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.

PEREIRA, V.L.A.; SILVA, G.M.; LEMOS, M. Presença de *Salmonella* em frangos de corte aparentemente sadios em unidades de criação industrial na região de São José do Vale do Rio Preto – RJ. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, v. 6, n. 3, p. 156-161, 1999.

PFUFF-MCDONOUGH, S.J.; HORNE, S.M.; GIDDINGS, C.W.; EBERT, J.O.; DOETKOTT, C.; SMITH, M.H.; NOLAN, L.K. Complement resistance-related traits among *Escherichia coli* isolates from apparently healthy birds and birds with colibacillosis. *Avian Diseases*, v. 44, p. 23-33, 2000.

QUEVEDO, A. Anuário 2005 – Frango à brasileira. Disponível em: <http://www.aviculturaindustrial.com.br/site/dinamica.asp?id=12036etipo_tabela=negociosecategoria=mercado_interno> Acesso em: 20 abr. 2005.

ROCHA, A.A. Consumo interno de frango volta a aumentar. Disponível em: <http://www.agrolink.com.br/saudeanimal/pg_detalhe_noticia.asp?cod=21937>. Acesso em: 27 jan. 2005.

ROCHA, P.T.; MESQUITA, A.J.; ANDRADE, M.A.; LOULY, P.R.; NASCIMENTO, M.N. *Salmonella* spp. em forros de caixa de transporte e órgãos de pintos de um dia. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 55, n. 6, p. 672-676, 2003.

RODRIGUES, D.P. Ecologia e prevalência de *Salmonella* spp. em aves e material avícola no Brasil. In: CONFERÊNCIA APINCO 2005 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2005, Santos, *Anais...Santos* : FACTA, 2005, p. 223-228.

ROSALES, A.G. Enfermedades respiratorias en el pollo de engorde – manifestaciones clinicas, etiologia y control In: CONFERÊNCIA APINCO 1991 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 1991, Campinas, *Anais...Campinas* : FACTA, 1991, p.163-176.

ROSENBUSCH, R.F. Biology and taxonomy of the Mycoplasmas. In: WHITFORD, H.W.; ROSENBUSCH, R.F.; LAUERMAN, L.H. *Mycoplasmosis in animals: Laboratory diagnosis*. Iowa: Iowa State University Press, 1994. 173p. Cap. 1, p. 3-11.

RUSSEL, S.M. The effect of airsacculitis on bird weights, uniformity, fecal contamination, processing errors, and populations of *Campylobacter* spp. and *Escherichia coli*. *Poultry Science*, v. 82, p. 1326-1331, 2003.

SAMBROOK, K.J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratoru Press,1989. V. 2, cap. 14.

SANTOS, D.M.S.; BERCHIERI JR., A.; FERNANDES, S.A.; TAVECHIO, A.T.; AMARAL, L.A. *Salmonella* em carcaças de frango congeladas. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 20, n. 1, p. 39-42, 2000.

SANTOS, L.R. Fagotipagem e análise por RAPD/PCR (amplificação de DNA através de iniciadores aleatórios) de amostras de *Salmonella* Enteritidis isoladas de materiais de origem avícola e de alimentos e humanos envolvidos em casos de toxinfecções alimentares, 2001. Tese Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

SCHORR, H. O futuro da cadeia de produção de frangos de corte (uma visão internacional). In: CONFERÊNCIA APINCO 2002 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2002, Campinas, *Anais...*Campinas : FACTA, 2002, p.19-30.

SESTI, L.A .C. Filosofias e conceitos de Biosseguridade e doenças com potencial de risco para a avicultura brasileira. In: CONFERÊNCIA APINCO 2001 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2001, Campinas, *Anais...*Campinas : FACTA, 2001,v. 1, p.47-91.

SILVA, B.G.M. Pneumovírus aviário: panorama atual no Brasil. Disponível em: <<http://www.avisite.com.br/cet/1/24/index.shtm>>. Acesso em: 12 dez. 2004a.

SILVA, E.N.; DUARTE, A . *Salmonella* Enteritidis em aves: retrospectiva no Brasil. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*, v.4, n. 2, p. 85-100, 2002.

SILVA, E.N. Efeito das doenças infecciosas na qualidade da carne de frangos. In: CONFERÊNCIA APINCO 2004 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2004, Santos, *Anais...*Santos : FACTA, 2004b, p. 193-199.

SILVA, E.N. Medidas gerais de controle de salmonelas em frangos. In: CONFERÊNCIA APINCO 2005 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2005, Santos, *Anais...*Santos : FACTA, 2005a, p. 229-237.

SILVA, J.C.T. Carne de frango: aumenta a demanda mundial e a produção brasileira acompanha o crescimento. Disponível em: <http://www.aviculturai.../dinamica.asp?id=1338etipo_tabela=produtosecategoria=frango_de_corte>. Acesso em: 27 jan. 2005b.

STIPKOVITS, L.; KEMPF, I. Mycoplasmoses in poultry. *Revue Scientifique et Technique*, Office International des Epizooties, v.15, p.1495-525, 1996.

STONE, G.G.; OBERST, R.D.; HAYS, M.P.; MCVEY, S.; CHENGAPPA, M.M. Combined PCR-Oligonucleotide ligation assay for rapid detection of *Salmonella* serovars. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 33, n. 11, p. 2888-2893, 1995.

TESSARI, E.N.C.; CARDOSO, A.L.S.P.; CASTRO, A.G.M.; ZANATTA, G.F.; KANASHIRO, A.M.I. Incidência de *Salmonella* spp. em pintos de corte recém-nascidos. *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 70, n. 3, p. 279-281, 2003.

THRUSFIELD, M. *Veterinary epidemiology*. 2.ed. Oxford: Blackwell Publishing Company, 1995. 483p.

TIVENDALE, K.A. ; ALLEN, J.L.; GINNS, C. A.; CRABB, B. S.; BROWNING, G.F. Association of *iss* and *iucA*, but not *tsh*, with plasmid-mediated virulence of avian pathogenic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, v. 72, n. 11, p. 6554-6560, 2004.

UBA. União Brasileira de Avicultura. Números da avicultura brasileira 2004. Disponível em:<<http://www.uba.org.br>>. Acesso em 17 dez. 2004.

UBA. Objetivos do Programa Nacional de Sanidade Avícola. Disponível em:<http://www.uba.org.br/pnsa_objetivos.html>. Acesso em: 14 jan. 2005.

VAN DEN BOGAARD, A.E.; LONDON, N.; DRIESSEN, C.; STOBBERINGH, E.E. Antibiotic resistance of faecal *Escherichia coli* in poultry, poultry farmers and poultry slaughterers. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 47, p. 763-771, 2001.

WEEBADDA, W.K.C.; HOOVER, G.J.; HUNTER, D.B.; HAYES, M.A. Avian air sac and plasma proteins that bind surface polysaccharides of *Escherichia coli* O2. *Comparitive Biochemistry and Physiology Part B* 130, p. 299-312, 2001.

WOESE, C.R.; STACKEBRANDT, E.; LUWIG, W. What are mycoplasmas: the relationship of tempo and mode in bacterial evolution. *Journal of Mollecular Evolution*, V. 21, P. 305-316, 1985.

WOOLEY, R.E.; SPEARS, K.R.; BROWN, J.; NOLAN, L.K.; FLETCHER, O.J. Relationship of complement resistance and selected virulence factors in pathogenic avian *Escherichia coli*. *Avian Diseases.*, v.36, p. 679-684, 1992.

YANG, H.; CHEN, S.; WHITE, D.G.; ZHAO, S.; MCDERMOTT, P.; WALKER, R.; MENG, J. Characterization of multiple-antimicrobial-resistant *Escherichia coli* isolates from diseased chickens and swine in China. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 42, n. 8, p. 3483-3489, 2004.

YODER JR, H.W. Mycoplasmosis. In: CALNEK, B.W.; BURNES, H.J.; BEARD, C.W.; YODER JR, H.W. *Diseases of Poultry*. USA: Iowa State University Press, 1991. p. 196-198.

ZAUNAZE, M.F. Experiência brasileira no controle da SCI. Disponível em: <<http://www.avisite.com.br/cet/1/22/index.shtm>>. Acesso em: 15 mai. 2005.

8 ANEXOS

8.1 MEIO DE FREY MODIFICADO

Caldo básico Difco ou outro fabricante...	21,0g
Glicose.....	3,0g
Soro suíno inativado.....	120,0mL
Nicotinamida adenina dinucleotídeo.....	0,1g
Hidrocloridrato de cisteína.....	0,1g
Extrato de levedura fresco a 25%*	100,0mL
Vermelho de fenol (solução a 1%)	2,5mL
Acetato de tálio (solução a 10%)**	5,0mL
Penicilina G potássica ou sódica**	1.000.000unds
Água destilada q.s.p.....	1.000,0mL

* Opcional, mas deve ser usado quando o meio não contiver NAD e cisteína-HCl.

** Para espécimes muito contaminados, aconselha-se o dobro desses antimicrobianos.

Fonte: Nascimeto (2000).

8.2 REAGENTES E SOLUÇÕES PARA PCR

8.2.1 Tampão Tris-EDTA (TE) – pH= 8,0

Tris.....	1,211 g (10 mM)
Água destilada.....	400 mL

Ajusta-se o pH para 7,6 com HCl concentrado.

EDTA.....	0,3722 g (1 mM)
-----------	-----------------

Ajusta-se o pH para 8,0 com NaOH sólido. Unir as duas soluções, completando com água destilada qsp 1000 mL.

8.2.2 Tampão de arrasto

Azul de bromofenol.....	0,25 mL
Sucrose.....	40 g
Água destilada qsp.....	100 mL

Armazenar a 4° C.

8.2.3 Tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) 5X

Tris base.....	54 g
Ácido bórico.....	27,5 g
EDTA 0,5 M (pH 8,0).....	20 mL
Água destilada qsp.....	1000 mL

8.2.4 Solução de Brometo de Etídio (5µg/mL)

Brometo de etídio (10 mg/mL).....	100 µl
Água destilada qsp.....	200 mL

8.2.5 Tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) 0,5X

TBE 5X.....	30 mL
Água destilada qsp.....	270 mL

8.2.6 Solução Salina 0,85%

NaCl.....	8,5 g
Água destilada.....	1000 mL

Esterilizar a solução em autoclave a 121° C durante 15 minutos. Armazenar em geladeira.

8.2.7 Tampão TE acrescido de dextrose

Tampão TE pH 8,0.....	20 mL
Dextrose.....	2 g

8.3 GEL DE AGAROSE (1,5 %)

- Agarose ultra-pura.....	3,75 g
- Água destilada.....	225 mL

Adicionar o pó a água, misturando para dissolvê-lo ao máximo. Colocar no microondas até completa dissolução (aproximadamente 2 minutos, aos poucos). Posteriormente, adicionar 25 mL de Tampão TBE 5X. O gel está pronto para ser estocado e deve ser fundido quando for ser utilizado.

8.4 REAGENTE DE KOVAC'S

Paradimetilaminobenzaldeído.....	5g
Álcool isoamílico.....	75mL
Ácido clorídrico (concentrado).....	25mL

8.5 SOLUÇÃO DE VERMELHO DE METILA

Vermelho de Metila.....	0,1g
Álcool etílico.....	300mL
Água destilada.....	100mL

8.6 SOLUÇÃO ALCOÓLICA DE ALFA-NAFTOL

Alfa-naftol (92,5°C ou maior).....	5g
Álcool etílico absoluto.....	100 mL

8.7 ESCALA DE MAC FARLAND 0,5

Solução de BaCl ₂	0,5 mL
Solução de H ₂ SO ₄	99,5 mL