

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM HIGIENE VETERINÁRIA
E PROCESSAMENTO TECNOLÓGICO DE PRODUTOS
DE ORIGEM ANIMAL

LEANDRO DOS SANTOS MACHADO

PCR na detecção de *Mycoplasma*
gallisepticum e *Escherichia coli* patogênica
em frangos de corte com aerossaculite
pela Inpeção Sanitária Federal

NITERÓI, RJ
2010

LEANDRO DOS SANTOS MACHADO

**PCR na detecção de *Mycoplasma gallisepticum* e
Escherichia coli patogênica em frangos de corte com
aerossaculite pela Inpeção Sanitária Federal**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense como requisito parcial para aquisição do Grau de Mestre. Área de concentração: Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal.

Orientador: Dr. ELMIRO ROSENDO DO NASCIMENTO
Departamento de Saúde Coletiva Veterinária e Saúde Pública - UFF

Co-orientador: Dr^a VIRGINIA LÉO DE ALMEIDA PEREIRA
Departamento de Saúde Coletiva Veterinária e Saúde Pública - UFF

NITERÓI, RJ
2010

LEANDRO DOS SANTOS MACHADO

**PCR na detecção de *Mycoplasma gallisepticum* e
Escherichia coli patogênica em frangos de corte com
aerossaculite pela Inpeção Sanitária Federal**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense como requisito parcial para aquisição do Grau de Mestre. Área de concentração: Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal.

Aprovada em 03 de fevereiro de 2010

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Elmiro Rosendo do Nascimento
UFF

Prof^a. Dr^a. Virgínia Léo de Almeida Pereira
UFF

Prof. Dr. Roberto Soares de Castro
UFRPE

NITERÓI, RJ
2010

Aos meus pais, Adenair e Jozé Roberto, dedico esta conquista, por tudo o que representam e me ensinaram. Pelo amor, incentivo, amizade e apoio que me deram em todas as fases da minha vida.

AGRADECIMENTOS

À minha família, pelo incentivo, apoio e preocupação.

Ao meu orientador, Elmiro Rosendo do Nascimento, pela confiança, respeito, amizade e pela doação de preciosos ensinamentos.

À minha co-orientadora, Virginia Léo de Almeida Pereira, pela receptividade, disponibilidade e orientação.

Às professoras Dayse Abreu, Maria Lúcia Barreto e Juliana Almeida pela disposição em me auxiliar e grande contribuição para o desenvolvimento da pesquisa.

Aos amigos Rita de Cássia, Raquel Gouvêa, Felipe Faccini, Fernanda Alves, Liana Ogino, Davi de Oliveira Almeida, Lídia dos Santos., Vanessa Simas e Leonardo Gaze, Felipe Toledo pelo valioso auxílio, contribuição e amizade em todas as etapas do meu trabalho.

À todos os professores do Programa de Pós-graduação e graduação que contribuíram para minha formação acadêmica.

Aos funcionários da Faculdade de Medicina Veterinária, em especial ao Drausio de Paiva Ferreira, que direta ou indiretamente contribuíram para que este trabalho fosse possível.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo auxílio financeiro.

“Caminhar, ser interrompido e voltar a caminhar”.

(Clarisse Lispector).

SUMÁRIO

RESUMO, p.11

ABSTRACT, p.12

1 INTRODUÇÃO, p.13

2 REVISÃO DE LITERATURA, p.15

2.1 PRODUÇÃO E COMERCIALIZAÇÃO DE CARNE DE FRANGO, p.15

2.2 IMPORTÂNCIA DOS PROBLEMAS RESPIRATÓRIOS EM FRANGOS DE CORTE, p.16

2.3 QUALIDADE DA CARNE DE FRANGO, p.18

2.4 MICOPLASMOSES AVIÁRIAS, p.20

2.4.1 **Características Gerais**, p.20

2.4.2 ***Mycoplasma gallisepticum***, p.22

2.4.3 **Diagnóstico da micoplasmose aviária**, p.24

2.4.4 **Prevenção e controle**, p.26

2.5 COLIBACILOSE, p.28

2.5.1 **Etiologia**, p.28

2.5.2 ***Escherichia coli* patogênica para aves**, p.28

2.5.3 **Colibacilose na avicultura**, p.30

2.5.4 **Diagnóstico da colibacilose**, p.31

2.5.5 **Diferenciação das cepas de *Escherichia coli* quanto à patogenicidade**, p.31

2.5.5.1 **Métodos fenotípicos**, p.31

2.5.5.2 **Métodos genéticos**, p.32

2.5.6 **Transmissão**, p.33

2.5.7 **Tratamento e controle**, p.33

3 MATERIAL E MÉTODOS, p.34

3.1 AMOSTRAS CLÍNICAS, p.34

3.2 DIAGNÓSTICO, p.36

3.2.1 **Processamento das amostras**, p.36

3.2.2 **PCR**, p.37

3.2.2.1 Extração do DNA, p.37

3.2.2.2 PCR, p.38

3.2.2.3 Eletroforese em Gel de Agarose 1,5%, p.39

3.2.2.4 Visualização dos “amplicons” no gel, p.39

3.2.3 **Análise estatística**, p.39

4 RESULTADOS, p.41

5 DISCUSSÃO, p.46

6 CONCLUSÃO, p.49

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS, p.50

8 ANEXOS, p.61

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 Lotes, identificação e municípios de origem de frangos de corte condenados por aerossaculite, p.36.

Quadro 2 Sequência dos “primers”, tamanho dos fragmentos amplificados (pares de base/pb) e condições usadas na PCR para detecção de *Mycoplasma gallisepticum* e gene *fel A* de *Escherichia coli*, p.39.

Figura 1 Gel de agarose com os “amplicons” de 481 pb referentes aos lotes L19, L20, L21, L22, L23, L24, L27, L31 positivos para MG pela PCR. **M** - Marcador de DNA de 100pb, **L** - lote; **e** - escarificado; **s** - suabe; **C+** - controle positivo, p.41.

Figura 2 Gel de agarose com o lote L20 positivo e lotes L1, L2, L3, L4, L5, L6, L7, L8, L9, L10, L11, L12, L13, L14, L15, L16, L17, L18, L19 negativos na PCR para o gene *fel A*. **M** - Marcador de DNA de 100pb, **L** - lote; **e** - escarificado; **s** - suabe; **C+** - controle positivo, p.42.

Figura 3 Gel de agarose com os lotes L21, L22, L23, L24, L25, L26, L27, L28, L29, L30, L31, L36, L37 positivos e L32, L33, L34, L35, L38, L39, L40 negativos na PCR para o gene *fel A*. **M** Marcador de DNA de 100pb, **L** - lote; **e** - escarificado; **s** - suabe; **C+** - controle positivo, p.42.

Tabela 1 Lotes negativos na PCR, número de aves abatidas, número e percentual de condenações por aerossaculite, peso médio, p.43.

Tabela 2 Lotes positivos na PCR, número de aves abatidas, número e percentual de condenações por aerossaculite, peso médio, p.44.

Tabela 3 Estatística descritiva do peso médio dos lotes de frangos de corte, p.44.

Tabela 4 Positivos e negativos para MG por suabe e escarificação como técnicas de coleta, p.45.

Tabela 5 Positivos e negativos para *E.coli* gene *fel A* por suabe e escarificação como técnicas de coleta, p.45.

LISTA DE ABREVIATURAS

μL	Microlitro
APEC	<i>Escherichia coli</i> patogênica para aves
APPCC	Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle
ATCC	“American Type Culture Collection”
BHI	“Brain Heart Infusion”
BI	Bronquite Infecciosa
BPF	Boas Práticas de Fabricação
C	Citosina
DCR	Doença Crônica Respiratória
DIB	Doença Infecciosa da Bursa
DN	Doença de Newcastle
DNA	“Deoxyribonucleic Acid”
dNTP	Deoxinucleotídeo trifosfatado
DIPOA	Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
μM	Micromolar
pmol	Picomol
<i>Taq</i>	“ <i>Thermus aquaticus</i> ”
EDTA	“Ethylenediaminetetraacetic acid”
ELISA	“Enzyme Linked Immunosorbent Assay”
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EUA	Estados Unidos da América
G	Guanina
HI	Reação de Inibição da Hemaglutinação

H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
H ₂ S	Sulfeto de hidrogênio
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
MG	<i>Mycoplasma gallisepticum</i>
MI	<i>Mycoplasma iowae</i>
MM	<i>Mycoplasma meleagridis</i>
MS	<i>Mycoplasma synoviae</i>
NPIP	“National Poultry Improvement Plan”
pb	Pares de base
PBS	“Phosphated Buffered Saline”
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
PIB	Produto Interno Bruto
PNSA	Programa Nacional de Sanidade Avícola
PPHO	Programa Padrão de Higiene Operacional
RIISPOA	Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal
RNA	“Ribonucleic Acid”
rpm	Rotações por minuto
SAR	Soroaglutinação Rápida
SDA	Secretaria de Defesa Agropecuária
SDS	Sódio Dodecil Sulfato
SIF	Serviço de Inspeção Federal
TE	Tris-EDTA
Tris	“Tris-hydroxymethyl-aminomethane”
USDA	“United States Department of Agriculture”

RESUMO

A Indústria avícola brasileira cresce anualmente e se torna cada vez mais representativa na produção e exportação dos seus produtos. Os cuidados com a sanidade avícola têm acompanhado e favorecido essa evolução, entretanto, agentes respiratórios que afetam o peso e a qualidade da carcaça, continuam a provocar grandes prejuízos à avicultura industrial. Na região sul, sudeste e centro-oeste do Brasil, a aerossaculite é considerada a principal causa da condenação total e parcial de carcaças de frangos de corte, e tem sido atribuída às Micoplasmoses, causadas principalmente pelo *Mycoplasma gallisepticum* (MG) e/ou em associação com *Escherichia coli* (*E.coli*) patogênica para aves (APEC). Este estudo objetivou detectar MG e *E.coli* patogênica pela “Reação em Cadeia da Polimerase” (PCR) e relacionar a positividade para estes agentes com a queda de peso em frangos de corte provenientes de lotes com condenação por aerossaculite na Inspeção Sanitária Federal, e comparar como técnicas de coleta para PCR suabe e escarificação de traquéia. Foram estudados 40 lotes de frangos de corte abatidos em um matadouro avícola sob Inspeção Sanitária Federal, localizado no Estado do Rio Grande do Sul. Foram coletados aleatoriamente três frangos e obtidos “pools” de três traquéias em cada um deles. A cada coleta, reunidas em “pool”, as traquéias foram submetidas a suabe e escarificação para obtenção de material para PCR. O DNA foi extraído pelo método de fenol-clorofórmio e amplificado com pares de “primers” específicos para MG e *E.coli* gene *fel A*. Dos 40 lotes analisados pela PCR, 37.5% (15/40) foram positivos para MG e/ou *E.coli*. Dos positivos, um foi somente para MG; sete somente para *E.coli* e sete apresentaram infecção mista (MG e *E.coli*). Houve relação entre a positividade para MG e/ou *E.coli* com a queda de peso. Além disso, não houve diferença significativa entre os métodos de coleta (suabe e escarificação de traquéia) na PCR.

Palavras-chave: Frangos de corte, Aerossaculite, Micoplasmas, *Escherichia coli*, PCR

ABSTRACT

The Brazilian poultry industry improves annually and is more representative on production and exportation of their products. Care on health poultry cooperates to these developments, however, respiratory agents that affect weight and carcass quality, continue to cause great damage to the poultry industry. In the South, Southeast and Midwest in Brasil, the airsacculitis is considered the main cause of total or partial condemnation of broilers carcasses, and it has been attributed to Mycoplasmosis, mainly due to *Mycoplasma gallisepticum* (MG) and/or in association with pathogenic *Escherichia coli* (*E.coli*) for poultry (APEC). This study objectives to detect MG and pathogenic *E. coli* by "Polymerase Chain Reaction" (PCR) and to correlate the positivity to these agents to weight losses in condemned broilers with airsacculitis by Federal Sanitary Inspection, and to compare by PCR, the swab and the scrape of trachea as techniques of sampling collection. A total of 40 batches of slaughtered broilers at a poultry slaughterhouse under Federal Inspection at Rio Grande do Sul, where there were randomly collected three chickens and obtained a pool of three tracheas of each. In each pool, the tracheas were subjected to swab and scrape to obtain material to PCR. DNA was extracted by the method of phenol-chloroform and amplified with pairs of specific primers for MG and *E. coli*, gene *fel A*. On the 40 batches analyzed by PCR, 37.5% (15/40) were positive for MG and/or *E.coli*. On all positives, one was only for MG, seven only for *E. coli* and seven had mixed infection (MG and *E.coli*). There were a positive correlation for MG and/or *E. coli* with weight losses. Furthermore, there were no significant difference between the techniques of swab and scrape of the trachea in the PCR.

Keywords: Broilers, airsacculitis, *Mycoplasma*, *Escherichia coli*, PCR

1 INTRODUÇÃO

Mesmo sob o impacto da crise econômica que se abateu sobre os cinco continentes em outubro de 2008, a produção mundial de carne de frango registrou crescimento de 4,5%, pouco abaixo dos 6,2% registrados em 2007, totalizando 71,2 milhões de toneladas, segundo dados do United States Department of Agriculture (USDA) e participação próxima de 63,2% nas exportações do país em relação às carnes bovina, suína e de peru, com embarques de 8,4 milhões de toneladas. O crescimento de 13,7% no volume de exportações mundiais mostra que o setor não se deixou abater pela crise.

O Brasil segue como terceiro produtor e maior exportador mundial de carne de frango e a entrada do produto brasileiro no mercado mundial foi devido a uma busca constante de evolução de qualidade e manutenção da sanidade avícola. A presença contínua do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e das Secretarias de Agricultura dos Estados produtores, bem como a participação ativa do setor privado, permitiu aos plantéis brasileiros alcançar a biossegurança desejada. Em função desse grande desenvolvimento no setor avícola, a preocupação com os aspectos higiênico-sanitários dos produtos também evoluiu. Os mais exigentes mercados mundiais importadores reconhecem os altos padrões de qualidade e segurança sanitária dos produtos e subprodutos avícolas brasileiros.

A importância econômica e social da avicultura brasileira estimulou o governo a elaborar normas que estabelecessem diretrizes para o controle de diversas doenças das aves visando a melhor aceitação de produtos e subprodutos avícolas no mercado interno e externo. Desta forma, tanto o setor privado como os governos federal, estadual e municipal demonstraram essa preocupação, desenvolvendo

ações que favoreceram a implantação do Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA), instituído em 1994 pelo MAPA e da adesão dos estados ao Plano de Regionalização. Este último permite que os estados com grande produção mantenham-se ativos, exportando continuamente, mesmo na hipótese de surgirem problemas localizados em regiões distantes dos pólos de produção do país.

Os produtores e os especialistas em sanidade avícola consideram as doenças respiratórias, como as de maior significado econômico, por serem as principais responsáveis por grandes perdas na indústria avícola. Segundo os dados do Serviço de Inspeção Federal (SIF), no ano de 1994 ocorreu uma perda de 34 mil toneladas de carne de frangos, na fase final de produção, por problemas respiratórios, acarretando prejuízo de 30 milhões de dólares.

No Brasil, existem relatos do aumento das condenações de aves em matadouros pela presença de aerossaculite e septicemia, que na sua maioria, podem ser decorrentes de infecção pela *Escherichia coli* (*E.coli*) de forma simples ou associadas a outros microrganismos, como o *Mycoplasma gallisepticum* (MG). No PNSA, as micoplasmoses são consideradas como doenças prioritárias com vistas ao controle e/ou erradicação nos planteis avícolas.

A importância do MG e *E.coli* patogênica para aves (APEC) como agente etiológico de doenças em frangos de corte desperta a preocupação de técnicos e produtores, assim como diversas empresas ligadas a cadeia produtiva da avicultura nacional e internacional.

O objetivo do presente estudo foi detectar MG e APEC pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) como fator de risco no peso vivo de lotes de frangos de corte condenados por aerossaculite na Inspeção Sanitária Federal. Foram ainda comparadas as técnicas de coleta com suabe e por escarificação de traquéia na obtenção de material para a PCR.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PRODUÇÃO E COMERCIALIZAÇÃO DE CARNE DE FRANGO

No cenário mundial, a carne de frango brasileira encontra-se em posição de destaque, colocando o frango como o terceiro produto da pauta agrícola de exportações brasileiras. Em termos de qualidade e competitividade, o país produz o frango mais barato do mundo e o de melhor qualidade. O agronegócio avícola brasileiro movimenta em torno de 10 bilhões de dólares ao ano, representando 2% do produto interno bruto (PIB) do país (MENDES, 2004).

O sucesso da cadeia produtiva de carne de frango brasileira é fruto de um intenso trabalho de seleção e melhoramento genético, da adoção de modernas técnicas de manejo e de medidas de biossegurança (MARTINS; TALAMINI; NOVAES, 2006). Da mesma forma, o processamento industrial, a inspeção industrial e sanitária, os sistemas de transporte e comercialização e os mercados atacadista e varejista sofreram enormes avanços para adequar os produtos avícolas às exigências do mercado (OLIVEIRA, 1995). A avicultura de porte empresarial é importante para a geração de renda, emprego e divisas para o país (FIGUEIREDO, 2009).

O consumo de carne de frango teve um aumento significativo, apesar do hábito do brasileiro de consumir carne bovina. Na verdade foram os planos econômicos dos governos os grandes responsáveis pela mudança desse hábito. Além do custo da carne de frango ter caído em relação às outras carnes, ao longo dos anos, a tecnologia da produção foi incrementada, colocando no mercado produtos como hambúrguer, salsicha, linguiça, almôndegas, *nuggets* e outros produtos pós processados, que atendem as necessidades de praticidade e

conveniência de consumidores domésticos e externos. Outros fatores como o crescente e acelerado processo de urbanização da população brasileira permitindo maior acesso da população a alimentos mais ricos em proteínas e a preferência pela carne branca de aves, considerada por seu menor teor de colesterol e gordura, baixo preço, facilidade de distribuição, acondicionamento e exposição nos pontos de venda também devem ser considerados (MENDES, 2004).

A condição de grande produtor e exportador mundial de frango coloca o Brasil como um competidor no mercado mundial de produtos avícolas, sendo visto como uma ameaça pelos países produtores de grãos e de proteína animal, e alvo de contínuos ataques de concorrentes das diferentes áreas produtivas (MARTINS, 2001). A alteração nos padrões de qualidade pode representar perdas significativas no mercado de exportação e na imagem mundial de nossa avicultura. Neste contexto a saúde animal é uma das principais barreiras não tarifárias para o embargo de nossas exportações ao resto do mundo (SESTI, 2001).

2.2 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, 1998).

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 indústrias avícolas apresentam-se preocupadas com a prevenção das doenças das aves, pois este é um aspecto de caráter econômico que se constitui em ameaça às criações 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; 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).

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 (DN) e a Bronquite Infecciosa (BI) 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 Bursa (DIB) e as micotoxinas também facilitam a invasão do trato respiratório pela *E.coli* e outros patógenos (MARTINS, 1991; NASCIMENTO; PEREIRA, 2009; MINHARRO et al., 2001).

Uma série de doenças nas aves pode ser induzida pela *Escherichia 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 (JANBEN et al., 2001).

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; PEREIRA, 2009). A *E.coli* é considerada um dos principais agentes bacterianos da aerossaculite, estando presente em 80% dos casos, e de quadros septicêmicos nas aves (MINHARRO et al., 2001). Neves (2006) afirma que problemas como aerossaculites causadas por colibaciloses representam um valor bastante considerável de prejuízos econômicos que acometem o segmento avícola do país como um todo.

A aerossaculite, juntamente com as fraturas e os hematomas, está entre as principais causas de condenação parcial e total de carcaças (MENDES, 2004). 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 (BRANCO, 2004).

2.3 QUALIDADE DA CARNE DE FRANGO

A qualidade geral da carne de frango depende de vários fatores, entre eles o efeito das doenças infecciosas. Parte das condenações durante o processo de abate e processamento das aves tem origem no manejo. A identificação, caracterização e registro de processos patológicos dos animais abatidos nos matadouros constituem fonte de dados para a avaliação da condição sanitária das granjas (PINTO, 2003).

Para garantir a qualidade e confiabilidade dos produtos e subprodutos no mercado globalizado é necessária a implementação de medidas sanitárias, que serão responsáveis por proporcionar ao consumidor um produto final isento de microrganismos e toxinas prejudiciais à saúde (QUEVEDO, 2005).

A inspeção e controle sanitário dos plantéis de aves, bem como de ovos e carne de aves, são realizados pela Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA) e pelo Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal (DIPOA), órgãos do MAPA. Eles são responsáveis pela aplicação das normas e regulamento que compõem a moderna legislação brasileira de sanidade animal, em total consonância com as normas internacionais de referência. As ações de governo são complementadas pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), que fornece suporte na pesquisa de modernas práticas de manejo e de novas tecnologias voltadas ao controle e erradicação de enfermidades (AVILA, 2006).

Programas de pesquisas na área de sanidade têm sido priorizados para diminuir as perdas dos produtores e da indústria e atender às exigências do mercado internacional (SILVA, 2004). Governo e empresas investem na implementação de programas como as Boas Práticas de Fabricação (BPF), Programa Padrão de Higiene Operacional (PPHO) e na Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) para garantir a qualidade dos produtos avícolas (MENDES; MOREIRA, 2003).

Silva (2004) classificou as doenças respiratórias como uma das razões que podem comprometer em menor ou maior grau a qualidade da carne de frango, por serem responsáveis por problemas como aerossaculite, pericardite fibrinosa, pericardite de aderência, pneumonias, salpingite, septicemia, ascite, e caquexia.

Nas aves, as doenças respiratórias comumente afetam os sacos aéreos devido ao seu posicionamento ventral, sendo que os pulmões são menos afetados, pela sua extensa vascularização. Os fatores primários associados à etiologia da aerossaculite são a má qualidade do ar e a poeira do ambiente juntamente com outros agentes (HERENDA; FRANCO, 1996).

De acordo com o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) e o Técnico de Inspeção Tecnológica e Higiênico-Sanitária de Carne de Aves (BRASIL, 1998) as carcaças de aves com processo intenso de aerossaculite ou evidência de processo sistêmico deverão ser condenadas totalmente, enquanto as que apresentam um quadro mais discreto

serão rejeitadas parcialmente após a remoção e condenação dos tecidos envolvidos com a lesão. As vísceras sempre serão condenadas totalmente, em caso de aerossaculite.

2.4 MICOPLASMOSES AVIÁRIAS

2.4.1 Características Gerais

Os Micoplasmas são enfermidades causadas pelos menores procariontes (bactérias) conhecidos, que se assemelham, em tamanho, aos grandes vírus (cerca de 300nm). Esses microrganismos têm predileção pelas membranas mucosas e serosas das aves, onde provocam problemas respiratórios, articulares e urogenitais. A Doença Crônica Respiratória (DCR) das galinhas causada por MG, a Sinovite Infecçiosa dos Perus causada por *Mycoplasma synoviae* (MS), a Sinovite Infecçiosa e Aerossaculite das Aves causada por MG e MS, são as formas clássicas da infecção (NASCIMENTO; PEREIRA, 2009).

A palavra micoplasma tem sua origem no grego: *mykes*, que significa fungos, e *plasma*, que diz respeito à forma ou ao molde das células. Ao serem observados pela primeira vez ao microscópio óptico, estes microrganismos foram associados a pequenos fungos por apresentarem a forma de filamentos. Pertencem à divisão Tenericutes e à classe *Mollicutes* (*mollis* / macio e *cutis* / pele), ordem *Mycoplasmatales*, família *Mycoplasmataceae* e gênero *Mycoplasma* e diferem das bactérias convencionais por não possuírem parede celular, sendo o seu citoplasma envolvido somente por uma membrana trilaminar (NASCIMENTO; PEREIRA, 2009). A ausência desta estrutura celular evidencia plasticidade em sua morfologia, dependendo de seu estágio fisiológico (TIMENETSKY, 2009); além de torná-los naturalmente resistentes aos antibióticos que atuam impedindo a síntese da parede celular das bactérias, a exemplo das penicilinas (RAZIN; TULLY, 1995). Apesar da ausência de parede celular, podem sobreviver sob forma desidratada por vários dias, desde que protegidos da luz solar (NASCIMENTO; PEREIRA, 2009). A membrana possui também colesterol que estabiliza a fluidez desta nas variações ambientais e geralmente é adicionado ao meio de cultura pelo soro animal. Esses organismos crescem produzindo colônias em forma de “ovo frito”, e não turvam caldos, mesmo com 10^8 células/ mL (TIMENETSKY, 2009). São Gram negativos,

mas se coram pelo Giemsa ou outros corantes similares, possuem a capacidade de reter o corante de Dienes ao contrário das outras bactérias. Quando cultivados em meio sólido, apresentam colônias que variam de 0,1 a 1,0 mm de diâmetro com crescimento para dentro do Agar, iniciando pela parte central da colônia. Apresentam filtrabilidade em presença de poros de 300 a 450 nm e são neutralizados em cultivo por anticorpos específicos, o que permite sua identificação por soroneutralização, cujo teste é denominado de Inibição de Crescimento ou Inibição de Metabolismo (NASCIMENTO; PEREIRA, 2009). Os micoplasmas possuem metabolismo reduzido, pois o genoma varia de 580 (corresponde a 20% do genoma da *E.coli*) a 2200 kbp, e, portanto, crescem mais lentamente do que a maioria das bactérias de interesse humano e animal; a relação citosina (C) e guanina (G) está entre 23 e 43%, e possuem uma a duas cópias de “Ribonucleic Acid” (RNA) 16S; portanto proteínas, aminoácidos, ácidos nucléicos e soro animal devem ser adicionados para o crescimento do microrganismo. Certas células infectadas por micoplasmas não morrem, mas ficam estressadas, portanto mais sensíveis a outros agentes infecciosos, fator esse que pode interferir no diagnóstico clínico (TIMENETSKY, 2009).

As bactérias da classe *Mollicutes*, que compreende distintas ordens, famílias, gêneros e aproximadamente 200 espécies definidas, se distribuem entre o homem, animais, insetos e plantas. As diferentes espécies de micoplasmas apresentam usualmente uma especificidade em relação ao hospedeiro, com algumas exceções. Até o momento, foram isoladas e caracterizadas 25 espécies de micoplasmas nas aves. Em relação à capacidade de provocar doenças, pode ser observada uma especificidade em relação ao hospedeiro. Destacam-se como patógenos indiscutíveis e de preocupação para a indústria avícola o MG, MS e *Mycoplasma meleagridis* (MM), enquanto *Mycoplasma iowae* (MI) é considerado um agente emergente. Todos esses podem causar doenças subclínicas ou aparentes em galinhas, perus e em outras aves (KLEVEN, 2003). As aves silvestres são pouco susceptíveis a contrair a enfermidade e podem atuar como vetores ou transmissores das micoplasmoses entre as granjas, através do contato direto com as aves de produção ou com a água e/ou alimentos (CERDÁ, 2007).

A transmissão de MG e MS pode ocorrer de forma horizontal mediante o contato direto com secreções respiratórias ou verticalmente pelo oviduto (NASCIMENTO; PEREIRA, 2009). A disseminação horizontal da infecção é em geral

muito rápida entre as aves de um mesmo galpão alcançando 100% das mesmas em poucas semanas. A transmissão vertical em aves comerciais é uma das principais razões da dificuldade em controlar e erradicar a enfermidade. Normalmente as aves infectadas e em estado agudo transmitem a sua progênie uma alta concentração de micoplasmas, e a taxa de transmissão pode variar entre 10 e 40%. A porcentagem mínima de transmissão pela via vertical é suficiente para que nas nascedoras e durante os primeiros dias de vida os micoplasmas se disseminem a todo o lote de pintinhos. A transmissão pode ocorrer durante as primeiras seis a oito semanas depois da infecção quando as aves estão em produção, cessar por alguns períodos e reiniciar-se em qualquer momento conjuntamente com uma situação de estresse (CERDÁ, 2007).

O período de incubação de MG e MS é similar e depende da virulência das cepas (LOCKABY; HOERR, 1999), da concentração das mesmas, dos fatores de estresse ambiental e do manejo dos lotes de aves (YODER et al., 1977). Geralmente é de 11 a 21 dias depois da exposição pelo contato direto. Em aves infectadas pela transmissão vertical o período de incubação pode ser mais curto e já foram relatados casos de sinuvite em pintinhos com seis dias de idade.

2.4.2 *Mycoplasma gallisepticum*

O MG causa doenças nas aves domésticas e naquelas de interesse econômico, porém já foi isolado de aves como pássaros silvestres com conjuntivite, indicando capacidade de adaptar-se a outro hospedeiro (LEY et al., 1997). Segundo classificação filogenética baseada na sequência parcial dos genes conservados do RNA ribossômico 16S, o MG pertence ao grupo do *M.pneumoniae*, juntamente com *M.genitalium*, *M.imitans*, *M.penetrans*, *M.iowae* (MI) e *Ureaplasma urealyticum* (VAN KUPPEVELD et al., 1992).

Os estudos de microscopia eletrônica demonstraram que este microrganismo é pleomórfico, com dimensões variando entre 0,25 e 0,5 µm de diâmetro e, apresentando a forma de “garrafa”, “pêra” ou “clava”, com estruturas terminais em forma de bolha ou vesícula (bleb). Essa estrutura tem papel na aderência ao tecido do hospedeiro e na motilidade ou deslizamento (METTIFOGO; BUIM, 2009).

Os estágios de interação entre MG e hospedeiro incluem uma série de eventos seqüenciais: o primeiro contato não específico, a aderência específica aos receptores, a colonização e os danos subseqüentes à célula. A aderência do MG às células epiteliais no trato respiratório do hospedeiro por meio de proteínas de adesão é essencial para a colonização e infecção. Uma vez que os micoplasmas não possuem parede celular, eles aderem-se diretamente à membrana da célula do hospedeiro (METTIFOGO; BUIM, 2009). Os determinantes antigênicos encontram-se na membrana trilaminar, que serão capazes de estimular o sistema imune do hospedeiro, bem como de funcionar como fatores tóxicos e mitogênicos (YAMAMOTO, 1990).

A estrutura terminal é composta por proteínas interativas, denominadas adesinas, e proteínas acessórias, permitindo dessa forma a adesão (METTIFOGO; BUIM, 2009). A associação íntima proporciona um microambiente, no qual ocorre a concentração de produtos tóxicos excretados pelo parasita, como peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e amônia, que se acumulam e causam danos aos tecidos do hospedeiro. Os micoplasmas são mais suscetíveis a mutações que outras bactérias (WOESE et al., 1985), e isso pode ser explicado pela deficiência no sistema de reparo do “Deoxyribonucleic Acid” (DNA) desses *Mollicutes* (GHOSH et al, 1977). A motilidade, apesar de ser muito lenta, pode ser considerada uma das estratégias desenvolvidas pelos micoplasmas para alcançar o local específico no hospedeiro e replicar-se causando a ação patológica (METTIFOGO; BUIM, 2009).

As manifestações clínicas de MG são tosse, corrimento, descarga ocular e nasal, decréscimo no consumo de alimentação, retardo de crescimento e lotes desiguais e queda na produção de ovos e mortalidade variável (NASCIMENTO; PEREIRA, 2009). As infecções por MS são, na maioria, subclínicas afetando o trato respiratório superior. Nas aves adultas reprodutoras, ocorre a forma crônica ou subclínica com baixo impacto nos índices produtivos. Por outro lado, a progênie costuma ser muito afetada, com descartes em razão de sacos aéreos lesados, ganho de peso reduzido e índices de conversão alimentar negativos (METTIFOGO; FERREIRA, 2006).

Em aves jovens, os sintomas podem se manifestar por uma ligeira conjuntivite e uma quantidade muito pequena de secreção nasal de natureza serosa. Pode haver colapso das pálpebras em função da secreção. Ruídos respiratórios também podem ser ouvidos. As aves diminuem o consumo de ração, com aumento

da conversão alimentar (MENDES, 2004). Quando os sacos aéreos são atingidos e apresentam depósitos de fibrina, quer pelo envolvimento de outros agentes, como vírus respiratórios da DN, BI, Influenza, Laringotraqueíte e outros ou bactérias (*E.coli* e MS), usa-se a denominação da DCR Complicada. Entretanto, as infecções inaparentes são as mais comuns e mais preocupantes, devido aos prejuízos que causam (YODER JR.,1991a, 1991b; KLEVEN, 2003; LEY, 2003). Fatores como baixa temperatura, amoníaco, estresse e associação com vírus imunodepressores como o de DIB, Anemia, Reovírus e outros podem também influenciar na severidade das infecções (CERDÁ, 2007).

2.4.3 Diagnóstico da micoplasmose aviária

O diagnóstico clínico desta enfermidade apesar de ser um bom orientador não é confirmativo devido à impossibilidade de diferenciar os outros agente virais ou bacterianos com apresentação clínica similar. Por este motivo é indispensável o uso das técnicas de diagnóstico laboratoriais. Existem importantes diferenças de sensibilidade e especificidade entre as distintas técnicas pela qual é fundamental saber interpretá-las e combiná-las para se obter um resultado correto (CERDÁ, 2007).

O diagnóstico epidemiológico em frangos de corte em idade de abate pode ser realizado por monitoramento sorológico e/ou etiológico (cultivo e/ou PCR) seguindo procedimentos epidemiológicos de amostragem e periodicidade recomendados pelo PNSA (NASCIMENTO; PEREIRA, 2009). No primeiro, a soroaglutinação rápida em placa (SAR), a inibição da hemaglutinação (HI) e o “Enzyme Linked Immunosorbent Assay” (ELISA) são os testes recomendados pelos programas sanitários governamentais para os estabelecimentos avícolas, por serem baratos e fáceis de desenvolver e a sua validade tem sido confirmada (NASCIMENTO et al., 2005 a; NASCIMENTO et al., 2006). Para o isolamento, o meio de cultura utilizado é o meio de Frey modificado. Após o isolamento, a amostra de micoplasma isolada deve ser submetida às provas bioquímicas e as de tipificação: imunofluorescência direta ou indireta de colônias, imunoperoxidase e inibição de crescimento e a PCR (NASCIMENTO; PEREIRA, 2009).

Para o cultivo e/ou PCR coletam-se fragmentos de tecidos lesados, principalmente sacos aéreos e traquéias, exsudato sinovial e ocular, suabes da traquéia, sacos aéreos, líquido sinovial e exsudato dos seios nasais (NASCIMENTO; PEREIRA, 2009).

Os testes baseados em Biologia Molecular como a PCR podem tanto detectar, quanto tipificar o agente sem a necessidade de um cultivo prévio e por isso passou a desempenhar um papel de grande importância no diagnóstico laboratorial (MADIGAN, 2004). Entre as vantagens do diagnóstico molecular, é possível citar a rapidez, a especificidade, a segurança dos resultados, a possibilidade de detecção de agentes de difícil cultivo ou de crescimento muito lento. A utilização de tipagem molecular, ou genotipagem apresenta também vantagens relacionadas à menor influência de fatores ambientais nas características dos agentes. Quando métodos fenotípicos de tipagem como expressão de proteínas, produção de toxinas ou presença de antígenos capsulares são utilizados para caracterização de agentes microbianos, há risco da não-expressão do gene codificador em função da ação de fatores relacionados ao cultivo *in vitro*. Sob esse aspecto, a caracterização genotípica apresenta menor variabilidade e maior reprodutibilidade que os métodos fenotípicos tradicionais. A sensibilidade observada na PCR é muito útil para a detecção de agentes patogênicos em amostras clínicas de animais assintomáticos ou em tratamento com antibióticos. Além disso, é possível detectar um organismo patogênico antes que este induza uma resposta imunológica, ou então em hospedeiros imunocomprometidos, demonstrando também vantagens sobre os testes sorológicos (MORENO, 2009).

Diversos trabalhos demonstram a eficiência do diagnóstico molecular na detecção das micoplasmoses, entretanto em relação às micoplasmoses aviárias os diagnósticos pela PCR têm sido motivo de discussão, desta forma ainda se faz necessária o uso associado das demais técnicas para a detecção de lotes de frangos de corte positivos (BRANTON et al., 2002; BUIM et al., 2008; CARLI et al., 2003; EVANS et al., 2008; FEBERWEE et al., 2005; GARCIA et al., 2005; HONG et al., 2005; KLEVEN et al., 2004; LYSNYANSKY et al., 2005; NASCIMENTO et al., 2005b; PANG et al., 2002; PILLAI et al., 2003; RAVIV et al., 2007; SPENCER et al., 2002; STEINLAGE et al., 2003).

2.4.4 Prevenção e Controle

Os prejuízos ocasionados pelas infecções micoplasmáticas provocaram a adoção de estratégias de controle. Tornou-se imprescindível a aquisição de aves de um dia ou ovos férteis livres de MG, MS e/ou MM para os sistemas de engorda, postura e reprodução (NASCIMENTO; PEREIRA, 2009).

Em sistemas de produção de frangos de corte, nos quais as aves de reposição são livres de micoplasma, basta o criador cumprir as medidas de biossegurança preconizadas para avicultura e fazer uso de antibioticoterapia, caso surjam lotes com micoplasmose. Em sistemas fechados de produção, onde se têm aves de reprodução que geram os pintos de corte utilizados para engorda, pode-se optar por programas de vacinação ou tratamento das matrizes, associados ao tratamento preventivo dos frangos obtidos de mães infectadas com micoplasma, desde que este procedimento seja economicamente viável (KLEVEN, 2003).

O tratamento da infecção das aves por micoplasmas com antimicrobianos diminui o índice de manifestações clínicas e conseqüentemente o risco de transmissão transovariana para um nível inferior a 0,1% (ORTIZ et al., 1995). Micoplasmas são resistentes a antibióticos β -lactâmicos que atuam na parede celular, como a penicilina e a cefalosporina (KLEVEN, 2008), mas são sensíveis a tetraciclina, macrolídeos, quinolonas ou tialumin. Procedimentos para o teste da sensibilidade *in vitro* dos micoplasmas foram publicados por Hannan (2000). Drogas que se acumulam em alta concentração nas membranas mucosas dos trato respiratório e genitourinário, como tialumin e enrofloxacin (NASCIMENTO; PEREIRA, 2009), são frequentemente preferidos (STIPKOVITS; KEMPF, 1996). A enrofloxacin é altamente eficiente na redução e eliminação da infecção respiratória por MG, mas tem efeito reduzido sobre a população de MS. O tratamento com antimicrobianos pode reduzir a população de MG no trato respiratório e os sinais clínicos, desta forma podendo reduzir o risco de disseminação da doença. Em contrapartida, o uso deste medicamento pode causar erros de diagnóstico e não elimina o agente, além de poder gerar resistência (KLEVEN, 2008).

O diagnóstico etiológico das micoplasmoses é comprometido por estes antimicrobianos potentes, porque eles bloqueiam ou reduzem a resposta imune e forçam os micoplasmas a escaparem ou esconderem-se em tecidos infectados,

tornando-os não detectáveis por cultura e PCR. Esta situação pode ser revertida pela suspensão do tratamento com as drogas (KEMPF, 1991; NASCIMENTO et al., 1999 a).

A vacinação é realizada com o objetivo de reduzir os altos custos dos tratamentos com antibióticos e, ao longo do tempo, minimizar as novas infecções. Existem no mercado dois grupos de vacinas: as inativadas e as atenuadas. As vacinas inativadas são mais seguras por não causarem a doença nas galinhas e em espécies mais suscetíveis, como os perus (METTIFOGO; FERREIRA, 2006). As vacinas inativadas para MG, bacterinas, não lograram boa aceitação devido ao alto custo de produção, aplicação individual nas aves, baixa antigenicidade e persistência de anticorpos vacinais (METTIFOGO; FERREIRA, 2006), mas atualmente são recomendadas em determinadas situações, principalmente pela inexistência de riscos, por não serem infecciosas para aves não vacinadas, não dificultarem o diagnóstico micoplasmológico e nunca apresentarem problema de reversão de patogenicidade (NASCIMENTO; PEREIRA, 2009). Contra o MG, existem três vacinas vivas disponíveis no mercado: a cepa Conn-F (MG-F), ts-11 e 6/85, que apesar de não evitar a transmissão transovariana podem diminuir a queda na produção de ovos.

A vacina viva é aconselhável para poedeiras e não deve ser usada em reprodutoras por prejudicar o diagnóstico e, principalmente, o monitoramento epidemiológico (BRASIL, 1994; BRASIL, 2001). A eficiência das vacinas vivas reside no estímulo de respostas imunes de base celular e humoral e como instrumento de exclusão competitiva em relação a cepas de campo nas granjas avícolas (NASCIMENTO; PEREIRA, 2009).

Um consistente sistema de monitoramento é essencial para a prevenção de infecção por micoplasma. Para implementação do controle da infecção micoplásmica, assim como de outras enfermidades aviárias importantes, programas voluntários para criadores de aves reprodutoras têm sido desenvolvidos por órgãos governamentais em parceria com a iniciativa privada, a exemplo do National Poultry Improvement Plan (NPIP) nos EUA e do PNSA em nosso País (BRASIL, 1994).

2.5 COLIBACILOSE

2.5.1 Etiologia

A *E.coli* é uma enterobactéria pertencente à família *Enterobacteriaceae*, gênero *Escherichia*. É um bastonete curto Gram negativo, não esporulado, anaeróbios facultativos geralmente são móveis pela presença de flagelos peritríquios, existindo também cepas imóveis (FERREIRA; KNOBL, 2009). Nessa família encontram-se gêneros pertencentes à microbiota do trato intestinal dos animais e do homem, de forma comensal ou patogênica (DOYLE; CLIVER, 1990; HOLT et al., 1994).

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 (CAMPOS; TRABULSI, 1999). Souza (2006) cita ainda a existência das espécies *E. adecarboxylata* e *E. vulneris*.

As estirpes diarreogênicas de *E.coli* podem ser diferenciadas com base em dados epidemiológicos, sinais e sintomas de suas respectivas doenças, observações microscópicas de sua interação com células hospedeiras, sorotipos e marcadores genéticos. Essas estirpes correspondem a seis categorias distintas, ou patotipos: enterotoxigênica (ETEC), enteropatogênica (EPEC), enterohemorrágica (EHEC), enteroagregativa (EAEC), enteroinvasiva (EIEC) e difusamente aderente (DAEC) (SOUZA, 2006). Esses patotipos raramente determinam infecções extra-intestinais no homem (TRABULSI; TOLEDO, 1991). No entanto essas infecções podem ocorrer se as estirpes de *E.coli* da microbiota normal do intestino adquirirem fatores que as capacitem a sobreviver à ação lítica do soro (PICARD et al., 1999).

2.5.2 *Escherichia coli* patogênica para aves

A *E.coli* patogênica para aves, a APEC, pertence ao grupo das *E.coli* patogênicas extra-intestinais. Nas aves causa a colibacilose que pode estar associada aos quadros de: colisepticemia, peritonite, pneumonia, pleuropneumonia, aerossaculite, pericardite, celulite, coligranuloma, DCR complicada, onfalite, salpingite, síndrome da cabeça Inchada, panofalmia, osteomielite, ooforite e sinovite

(FERREIRA; KNOBL, 2009). 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).

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; 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, frequentemente, por via inalatória (DHO-MOULIN; 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; FAIRBROTHER, 1999).

As cepas de APEC possuem fatores de virulência específicos e são capazes de causar a colibacilose aviária (CARDOSO et al., 2002; DELICATO et al., 2003). A adaptação ao hospedeiro e a virulência de alguns patótipos de *E.coli* são atribuídos à aquisição horizontal de genes específicos por cepas não patogênicas que, então, tornam-se patogênicas (DOZOIS et al., 2003).

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; FAIRBROTHER, 1999; DELICATO et al., 2003).

Uma das classes de determinantes de virulência da *E.coli* de relevância são os fatores de adesão representados pela presença de fímbrias, responsáveis pela aderência na mucosa em diferentes estágios da doença (KUHNERT et al., 2000). Os fatores de virulência e seus genes responsáveis identificados em amostras de *E.coli* isoladas de aves, comumente encontrados são: capacidade de adesão pela fímbria

P (*pap C*) e fímbria F11 (*fel A*), produção de colicina (*cva C*), produção de aerobactina (*iut A*), presença dos antígenos capsulares K1 e K5 (*kpsII*), resistência sérica (*iss*), hemaglutinina sensível à temperatura (*tsh*) (LA RAGIONE; WOODWARD, 2002). No estudo de Dozois et al. (1996) 12 em 13 cepas de *E.coli* aviárias isoladas de aves com colisepticemia exibiram a seqüência gênica relacionada com gene *fel A* codificada na fímbria F11.

2.5.3 Colibacilose na avicultura

As infecções causadas por *E.coli* comumente são chamadas de colibacilose. Mundialmente, é considerada uma das principais doença da indústria avícola moderna, devido aos grandes prejuízos econômicos causados (FERREIRA; KNOBL, 2009). A *E.coli* contribui não só para a doença em si, mas também como agente sinérgico quando associada a outros agentes (EL TAYEB; HANSON, 2002).

Os principais fatores ambientais predisponentes a esta enfermidade são altas concentrações de amônia no galpão, deficiência na ventilação de ambientes avícolas, extremos de temperatura, umidade da cama, criações com alta densidade e deficiência no processo de desinfecção (FERREIRA; KNOBL, 2009).

Nas aves, a colibacilose inicia-se no epitélio traqueal, em contraste com a maioria das doenças causadas pela *E.coli* em humanos e outros mamíferos, afetados inicialmente no epitélio intestinal e urinário (VIDOTTO et al., 1997).

Dependendo de fatores inerentes ao hospedeiro, como “status” imunológico, a ocorrência de alterações microscópicas ou lesões predisponentes no trato respiratório superior e ao agente, como fatores de adesão ou dose infectante, os mecanismos de defesa do hospedeiro não são capazes de bloquear a multiplicação de *E.coli* e assim favorecer a ação de cepas de *E.coli* não patogênicas (POURBAKHSI et al., 1997).

Dentre os principais agentes infecciosos associados a colibacilose avária podemos citar: MG, MS, *Pasteurella multocida*, *Avibacterium paragallinarum*, Pneumovírus e vírus da BI (incluindo vírus vacinal), da Doença de Marek e da DN, da DIB, além da presença de micotoxinas (aflatoxina) na ração (FERREIRA; KNOBL, 2009).

As doenças respiratórias, freqüentes entre as alterações causadas pela *E.coli*, determinam as aerossaculites, que são causas constantes de condenação em carcaças de aves. Mas, além das infecções do trato respiratório, outras são responsáveis por condenações parciais ou totais das carcaças. Entre os critérios de condenação utilizados pelo SIF (BRASIL, 1998), processos inflamatórios constantemente implicados com a *E.coli* (artrites, celulites, dermatites e salpingites) são listados como causas de condenação parcial ou total. Nas lesões post-mortem de colibacilose aparecem pericardite fibrinosa, perihepatite fibrosa com aumento do fígado, congestão hepática e inflamação dos sacos aéreos (CALDEIRA, 2008).

2.5.4 Diagnóstico da colibacilose

Fragmentos ou suabes de órgãos acometidos devem ser cultivados em caldos nutrientes e incubados a 37°C por 24 horas, e em seguida semeados em meios seletivos. A *E.coli* cresce bem em Agar Mac Conkey, Agar eosina azul de metileno (EMB), Agar Hoekten, Agar Verde Brilhante (AVB). Após o crescimento nos meios seletivos, selecionam-se três a cinco colônias para a identificação bioquímica. Utilizam-se rotineiramente os testes bioquímicos que indiquem a produção de ácido e gás a partir da glicose. *E.coli* não produz H₂S e urease, L-triptofano desaminase, não utiliza o citrato como fonte de carbono, mas utiliza a lisina e produz indol. Após a identificação bacteriológica, pode-se estabelecer a determinação dos sorogrupos com antisoros específicos que contribuirão para a determinação dos fatores de virulência (FERREIRA; KNOBL, 2009).

As técnicas de PCR e as sondas de DNA têm sido muito úteis na pesquisa de genes que codificam vários fatores de virulência (FERREIRA et al., 2009).

2.5.5 Diferenciação das cepas de *Escherichia coli* quanto à patogenicidade

2.5.5.1 Métodos fenotípicos

Nem todas as amostras de *E. coli* são capazes de causar doenças. Assim, após a caracterização bioquímica da espécie, sua patogenicidade deve ser caracterizada. A sorotipagem, baseada no reconhecimento dos antígenos de

superfície, é muito utilizada para a diferenciação entre amostras patogênicas e comensais, e é sustentada pelos antígenos somáticos (O) e os flagelares (H). Os antígenos O identificam os sorogrupos das amostras, e as combinações entre os antígenos O e H identificam os sorotipos (MENG et al., 2001).

Além da investigação da estrutura antigênica, a patogenicidade das amostras desta bactéria também pode ser evidenciada de acordo com seus determinantes específicos de virulência (virotipagem). Esses determinantes concedem a cada patotipo a capacidade de causar uma síndrome clínica com características epidemiológicas e patológicas típicas (NATARO; KEPER, 1998). As cepas de *E.coli* que causam as enfermidades intestinais são caracterizadas por fatores de virulência diferentes daqueles encontrados nas enfermidades extraintestinais (ORSKOV; ORSKOV, 1992).

2.5.5.2 Métodos genéticos

Devido ao consumo de tempo e considerações éticas em relação ao uso de animais para experimentação, os modelos de caracterização de virulência exemplificados anteriormente tendem a ser substituídos por técnicas mais rápidas e aceitáveis, como as técnicas moleculares (KUHNERT et al., 2000).

A identificação de genes de virulência e resistência em *E.coli* pode ser realizada por técnicas de demonstração do DNA bacteriano, através da hibridação com sondas genéticas ou amplificação de segmentos de DNA, através da PCR. As sondas genéticas consistem em segmentos específicos de DNA de fita simples que podem ser utilizados para a pesquisa de seqüências homólogas presentes no genoma de um microorganismo. O método de hibridação baseia-se na propriedade de as fitas complementares de ácidos nucleicos anelarem-se (hibridarem-se) através do pareamento de bases complementares, formando moléculas híbridas de fita dupla (TRABULSI; TOLEDO, 1991).

Na técnica da PCR permite-se a amplificação de um segmento específico do genoma do agente, permitindo a obtenção *in vitro* de várias cópias de determinada região do DNA. Uma variação da PCR, a técnica Multiplex PCR, usa múltiplos pares de “primers” dirigidos a vários genes e amplificam fragmentos de tamanhos diferentes. Permite-se, inclusive, o emprego da Multiplex PCR com “primers”

direcionados a genes de virulência, plasmidiais e cromossômicos (EWERS et al. 2005). Picard et al. (1999) caracterizaram vários determinantes de patogenicidade de *E.coli*, considerados relevantes para o estabelecimento de doença extraintestinal, através dessa técnica.

2.5.6 Transmissão

E.coli é um microrganismo freqüente nos ambientes avícolas. Uma das fontes de infecção para as aves é a água, que pode se contaminar ainda nos reservatórios, antes de passarem pelos bebedouros (AMARAL et al., 2001). Outra fonte importante é a “cama”, uma vez que a *E.coli* é eliminada constantemente através das fezes (ELFADIL et al., 1996). A existência de insetos, como o *Alphitobius diaperinus*, servindo como vetores mecânicos têm sido relacionados com a contaminação das aves (CHERNAKI-LEFFER et al., 2002). A má qualidade do ar também pode pôr em risco a saúde das aves e favorecer a instalação de doenças respiratórias pela presença de amônia ou do próprio agente da colibacilose em suspensão (DAVIS; MORISHITA, 2005).

A peletização das rações, a eliminação de vetores, a cloração da água, o controle de agentes concomitantes, como os micoplasmas, e a ventilação adequada dos galpões são ações desejáveis para o controle da colibacilose (BARNES et al., 2003).

2.5.7 Tratamento e controle

O tratamento de eleição contra a colibacilose aviária inclui a utilização de diversos antimicrobianos, entre os quais a ampicilina, os nitrofuranos, a gentamicina, o ácido nalidíxico, a polimixina B, as fluoroquinolonas e as sulfas (BARNES et al., 2003).

As principais medidas de controle em criações de frangos de corte são melhorias nas condições de ventilação dos galpões, da concentração de gases de amônia e redução da poeira em suspensão; desinfecção; uso de bebedouros do tipo (Nipple); aumento do intervalo entre lotes; utilização de probióticos e produtos de

exclusão competitiva e utilização de vacinas inativadas (bacterinas) (FERREIRA; KNOBL, 2009).

3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi realizado através de um estudo epidemiológico observacional transversal.

3.1 AMOSTRAS CLÍNICAS

Foram coletadas aleatoriamente, na área de pendura três aves de cada lote, no total de 40 lotes distintos de frangos de corte abatidos num matadouro avícola sob Inspeção Sanitária Federal localizado no Estado do Rio Grande do Sul.

Na sala de necrópsia, foi feita a coleta da traquéia de cada ave selecionada, totalizando 40 amostras, cada uma constituída por um “pool” de três traquéias. Cada amostra foi identificada (Quadro 1), acondicionada em saco plástico estéril e congelada para o seu transporte.

Quadro 1 Lotes, identificação e municípios de origem de frangos de corte condenados por aerossaculite.

Lote	Identificação	Municípios	Lote	Identificação	Municípios
1	L1	Iraceminha	21	L21	Riqueza
2	L2	Caibi	22	L22	Cunha Porã
3	L3	Iraceminha	23	L23	Flor Sertão
4	L4	Maravilha	24	L24	Riqueza
5	L5	Iraceminha	25	L25	Cunha Porã
6	L6	Iraceminha	26	L26	Mondaí
7	L7	Cunha Porã	27	L27	Palmitos
8	L8	Tigrinhos	28	L28	Cunha Porã
9	L9	Tigrinhos	29	L29	Mondaí
10	L10	Cunha Porã	30	L30	Palmitos
11	L11	Iraceminha	31	L31	Palmitos
12	L12	Flor Sertão	32	L32	Palmitos
13	L13	Palmitos	33	L33	Iraceminha
14	L14	Palmitos	34	L34	Mondaí
15	L15	Maravilha	35	L35	Cunhá Porã
16	L16	Mondaí	36	L36	Iraceminha
17	L17	Cunha Porã	37	L37	Tigrinhos
18	L18	Cunhataí	38	L38	Maravilha
19	L19	Mondaí	39	L39	Iraceminha
20	L20	Cunha Porã	40	L40	Maravilha

3.2 DIAGNÓSTICO

3.2.1 Processamento das amostras

As amostras foram processadas no Laboratório de Epidemiologia Molecular da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense (UFF).

No laboratório, antes do processamento de cada amostra, procedeu-se a desinfecção periódica do fluxo laminar e a separação de todo o material cirúrgico e

vidraria esterilizados a ser utilizado nesta etapa do estudo. Paralelamente as amostras de traquéias congeladas foram colocadas em banho de gelo para descongelamento lento.

No fluxo, “pools” de três traquéias de cada lote foram colocadas em placa de Petri estéril e abertas com o auxílio de uma tesoura ponta reta. Em seguida foi feita em cada traquéia do “pool” um suabe e depois a escarificação com o auxílio de lâminas de bisturi. Os “pools” de suabe e de escarificado foram adicionados respectivamente em dois tubos de rosca com 2,0 mL de “Phosphated Buffered Saline” (PBS) pH 7,4. De cada tubo foi retirado uma alíquota de 1,0 mL e colocado em tubo graduado de 1,5 mL para extração do DNA.

3.2.2 PCR

3.2.2.1 Extração do DNA

A extração de DNA foi realizada diretamente das amostras coletadas pelo suabe e escarificação da traquéia, sem a realização de pré-enriquecimento. Utilizou-se o método de fenol/clorofórmio para MG e *E.coli*, adaptada de Sambrook et al. (1989), em capela de exaustão. Na sala de extração, cada tubo graduado contendo as amostras foi homogeneizado por cinco segundos e em seguida centrifugado (ALC-PK 121R-Annita IIR-Processing & Control Interface) por 20 minutos a 13.500 rotações por minuto (rpm) a 10°C. De cada tubo foi retirado o sobrenadante e ao sedimento de aproximadamente 40 µL foi adicionado de 400 µL de TE dextrose (ANEXO 8.1), 30 µL de solução aquosa de Proteinase K (240µg /mL) e 30 µL de solução de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 10% (ANEXO 8.2). Essa reação realizou-se por 30 minutos em bloco térmico (QUIMIS) a 50°C e em seguida parada em banho de gelo por cinco minutos. O DNA de cada amostra foi extraído pela adição de 500 µL de fenol ao tubo com os reagentes, homogeneizando por inversão por 15 minutos e depois centrifugando o material por 30 minutos a 13.500 rpm a 10°C. Após a centrifugação, retirou-se o sobrenadante e descartou em novo tubo graduado, onde se adicionou o mesmo volume de clorofórmio. Homogeneizou-se suavemente por três minutos e o material centrifugado nas mesmas condições anteriores. Depois se retirou o sobrenadante e adicionou-se em novos tubos

contendo 1mL de álcool etílico. O DNA precipitado em álcool etílico “overnight” foi centrifugado por 20 minutos a 13.500 rpm, a 10°C. O sedimento foi ressuspenso em 100 µL de tampão TE (anexo 8.3) e estocado a -20°C até o seu uso na PCR.

3.2.2.2 PCR

A reação de PCR para MG foi realizada nas seguintes condições: 56 µL de água ultrapura (Milli-Q), 10 µL de Tampão PCR 10X, 8 µL de MgCl₂ (25mM), 5 µL de dNTP mix (0,25 mM de cada), 2 µL de cada “primer” (100 pmol), 2 µL de Taq Polimerase (2,5U/µL) e 15 µL do DNA extraído, obtendo-se um volume final de 100 µL. Foi utilizado o par de “primer” específico obtido da porção interna do fragmento de 732 pb de DNA de MG que produzem “amplicons” de 481 pb denominado MG-PCR/481 conforme Nascimento et al.(2005b) e as condições de amplificação para MG foram feitas conforme Buim et al. (2009) (Quadro 2). Como controle positivo utilizou-se a cepa padrão “American Type Culture Collection” (ATCC) de MG.

Para *E. coli* patogênica (APEC) gene *fel A*, a reação foi feita nas seguintes condições: 12,75 µL de água ultrapura (Milli-Q), 2,5 µL de Tampão PCR 10X, 1,25 µL de MgCl₂ (25 mM), 1,25 µL de dNTP mix (0,25 mM de cada), 1 µL de cada “primer”, 0,25 µL de Taq Polimerase (2,5U/µL) e 5 µL do DNA extraído, obtendo-se um volume final de 25 µL. O par de “primer” específico para gene *fel A* de *E.coli* e as condições da reação se basearam em Rocha et al.(2008) (Quadro 2). Como controle positivo utilizou-se amostra de *E.coli* fornecida pelo Drº Sílvio Luís da Silveira Rocha do Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Quadro 2 Sequência dos “primers”, tamanho dos fragmentos amplificados (pares de base/pb) e condições usadas na PCR para detecção de *Mycoplasma gallisepticum* e gene *fel A* de *Escherichia coli*.

SEQUÊNCIA DOS “PRIMERS” (5´-3´)		TAMANHO FRAGMENTO	CONDIÇÕES PCR*
MG-1	CGT GGA TAT CTT TAG TTC CAG CTG C	481 pb	5 min 94°C / 35 ciclos (1 min 94°C, 1 min 55°C e 2 min 72°C) / 10 min 72°C
MG-2	GTA GCA AGT TAT AAT TTC CAG GCA T		
Fel A-1	GGC AGT GGT GTC TTT TGG TG	270 pb	5 min 94°C / 35 ciclos (1 min 94°C, 1 min 63°C e 2 min 72°C) / 10 min 72°C
Fel A-2	GGC CCA GTA AAA GAT AAT TGA ACC		

* Reação feita em termociclador PTC-100 (PELTIER-EFFECT CYCLING-MJ Reasearch, Inc.).

3.2.2.3 Eletroforese em Gel de Agarose 1,5%

Terminada a reação de amplificação, homogeneizou-se 10 µL de cada amostra com 2 µL de tampão de arrasto (ANEXO 8.4), aplicou-se em gel de agarose a 1,5% (ANEXO 8.5) submerso em Tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) 0,5X (ANEXO 8.6) e por fim submeteu-se à eletroforese (MODEL 250-Life Technologies/Gibco BRL Electrophoresis Power Supply) em condições baseadas em Sambrook et al. (1989).

3.2.2.4 Visualização dos “amplicons” no gel

Após a corrida eletroforética, corou-se o gel em brometo de etídio (ANEXO 8.7) e a procedeu-se a visualização dos “amplicons”, sob luz ultravioleta em transiluminador (EB-20E-Ultra-Lum, Inc.Carson, Califórnia).

3.2.3 Análise Estatística

Nos estudos analíticos foram utilizados os seguintes testes estatísticos (THRUSFIELD, 2003):

- Teste de Qui-quadrado para avaliar a influência do método de coleta na positividade para PCR.
- Análise de Regressão Logística Simples para verificar se o peso vivo das aves é preditivo da positividade na PCR.

4 RESULTADOS

Dos 40 lotes analisados pela PCR, 37,5% (15/40) foram positivos para MG e/ou *E.coli*, sendo que em sete deles houve infecção mista (MG e *E.coli*). Um lote foi positivo somente para MG pelo aparecimento de “amplicon” de 481 pares de base (pb) (Figura 1) e sete foram positivos somente para *E.coli*, com “amplicons” esperados de 270 pb característicos de gene *fel A* (Figuras 2 e 3).

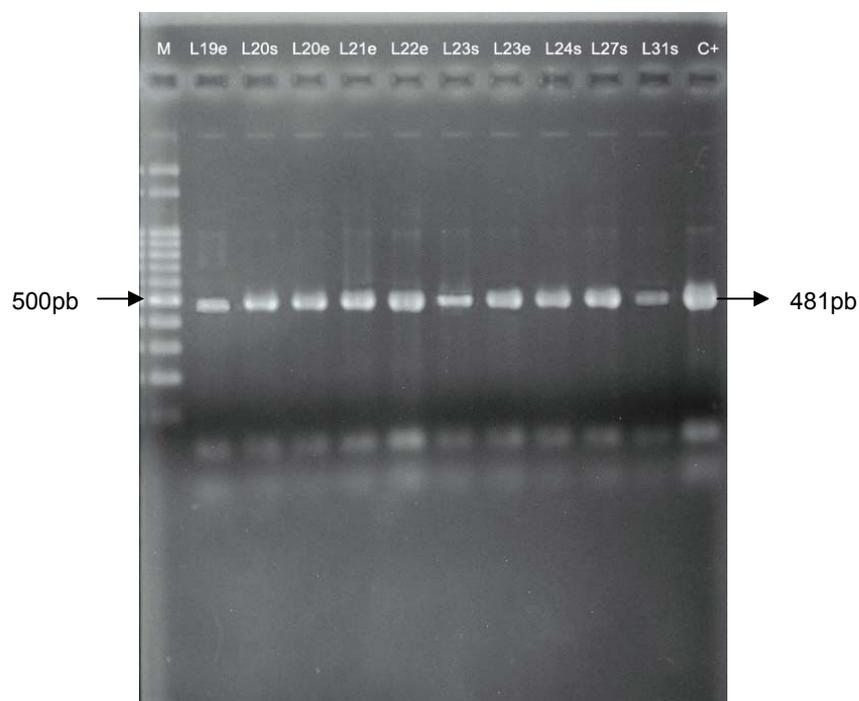


Figura 1. Gel de agarose com os “amplicons” de 481 pb referentes aos lotes L19, L20, L21, L22, L23, L24, L27, L31 positivos para MG pela PCR. **M** - Marcador de DNA de 100pb, **L** - lote; **e** - escarificado; **s** - suabe; **C+** - controle positivo.

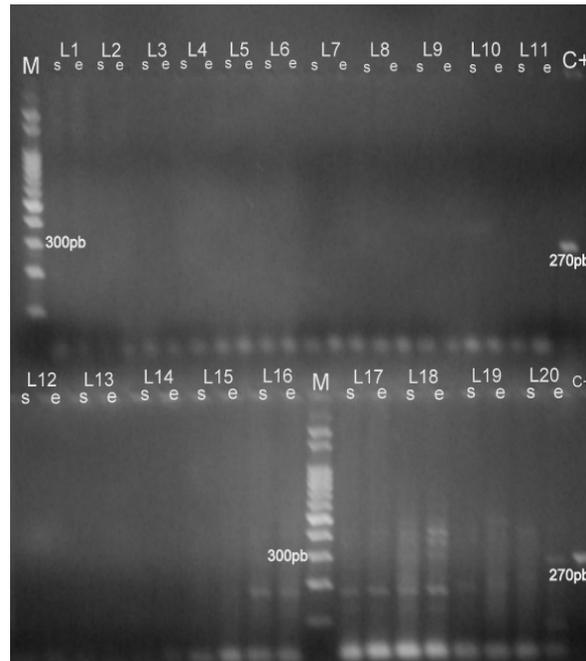


Figura 2. Gel de agarose com o lote L20 positivo e lotes L1, L2, L3, L4, L5, L6, L7, L8, L9, L10, L11, L12, L13, L14, L15, L16, L17, L18, L19 negativos na PCR para o gene *felA*. **M** - Marcador de DNA de 100pb, **L** - lote; **e** - escarificado; **s** - suabe; **C+** - controle positivo.

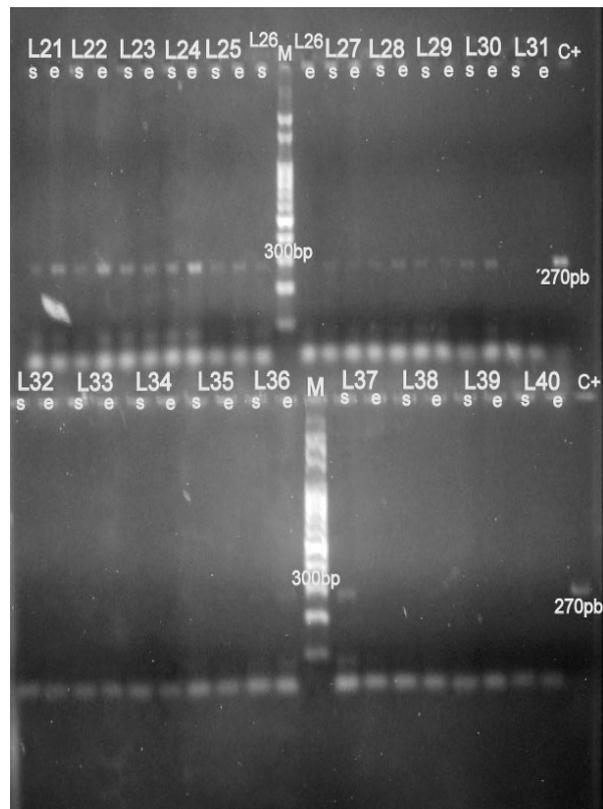


Figura 3. Gel de agarose com os lotes L21, L22, L23, L24, L25, L26, L27, L28, L29, L30, L31, L36, L37 positivos e L32, L33, L34, L35, L38, L39, L40 negativos na PCR para o gene *felA*. **M** Marcador de DNA de 100pb, **L** - lote; **e** - escarificado; **s** - suabe; **C+** - controle positivo.

Em todos os lotes estudados observou-se uma taxa de condenação por aerossaculite, variando de 0,0179 a 0,9435 % (Tabela 1 e 2).

A amplitude de variação dos pesos foi de 2,58 a 3,26. Da relação entre positividade na PCR para MG e/ou *E.coli* com peso vivo das aves obteve-se pela Regressão Logística Simples a equação Logit $P_i = 15,8761 - (5,7 \times X_1)$, significando que a positividade está relacionada com a queda de peso ($p < 0,05$). O risco dos lotes positivos na PCR apresentarem peso médio baixo foi de 0,33%. “Odds ratio” = 0,0033 (0,33%) (IC = 0,00 - 0,59) (Tabela 1 e 2).

Tabela 1 Lotes negativos na PCR, número de aves abatidas, número e percentual de condenações por aerossaculite, peso médio.

Lotes (L)	Nº total de aves	Condenações por aerossaculite		Peso médio* (Kg)
		(Nº)	(%)	
L1	8.456	09	0,1064	3,10
L2	8.434	56	0,6640	2,95
L3	11.656	34	0,2917	3,11
L4	11.112	07	0,0630	3,26
L5	11.465	12	0,1047	3,16
L6	11.456	09	0,0786	3,23
L7	11.196	38	0,3394	3,10
L8	11.568	15	0,1297	3,02
L9	14.535	16	0,1101	2,97
L10	9.568	04	0,0418	2,73
L11	6.366	19	0,2985	2,77
L12	12.536	41	0,3271	2,95
L13	11.662	14	0,1200	3,04
L14	11.688	06	0,0513	3,04
L15	11.520	08	0,0694	3,09
L16	13.800	57	0,4130	2,82
L17	11.661	83	0,7118	2,58
L18	9.221	87	0,9435	2,76
L32	5.728	25	0,4365	2,89
L33	5.792	10	0,1727	2,81
L34	11.598	05	0,0431	2,75
L35	11.480	18	0,1568	2,83
L38	11.504	49	0,4259	2,83
L39	11.634	38	0,3266	2,81
L40	11.560	04	0,0346	2,86
TOTAL	267.196	664	6,4602	

*Regressão Logística Simples e “Odds ratio” realizados pela análise do peso médio e dos resultados na PCR

Tabela 2 Lotes positivos na PCR, número de aves abatidas, número e percentual de condenações por aerossaculite, peso médio.

Lotes (L)	Nº total de aves	Condenações por aerossaculite		Peso médio* (Kg)	Resultados PCR*		
		(Nº)	(%)		MG	<i>E.coli</i>	MG + <i>E.coli</i>
L19	11.112	29	0,2610	2,94	Pos.	Neg.	Neg.
L20	5.774	12	0,2078	2,64	Neg.	Neg.	Pos.
L21	13.749	15	0,1091	2,96	Neg.	Neg.	Pos.
L22	11.579	13	0,1123	2,76	Neg.	Neg.	Pos.
L23	14.068	15	0,1066	2,85	Neg.	Neg.	Pos.
L24	11.577	26	0,2246	2,90	Neg.	Neg.	Pos.
L25	5.696	01	0,0176	2,84	Neg.	Pos.	Neg.
L26	11.368	16	0,1407	2,87	Neg.	Pos.	Neg.
L27	11.676	09	0,0771	2,78	Neg.	Neg.	Pos.
L28	11.552	05	0,0433	2,74	Neg.	Pos.	Neg.
L29	11.392	22	0,1931	2,95	Neg.	Pos.	Neg.
L30	5.728	07	0,1222	2,88	Neg.	Pos.	Neg.
L31	14.507	82	0,5652	2,77	Neg.	Neg.	Pos.
L36	14.328	35	0,2443	2,79	Neg.	Pos.	Neg.
L37	8.584	24	0,2796	2,60	Neg.	Pos.	Neg.
TOTAL	162.690	311	2,7045				

*Regressão Logística Simples e "Odds ratio" realizados pela análise do peso médio e dos resultados na PCR

Tabela 3 Estatística descritiva do peso médio dos lotes de frangos de corte

Valores numéricos	
Máximo	3,2600
Mínimo	2,5800
Mediana	2,8650
Média	2,8932
Variância	0,0260
Coefficiente de variação	5,5700
Desvio padrão	0,1612

Pela análise do teste de Qui-Quadrado, comparando-se a coleta de material por suabe e pela escarificação de traquéia para PCR (MG e gene *fel A* de *E.coli*) obteve-se um $p > 0,05$, portanto não existindo diferença significativa entre as duas técnicas (Tabela 4 e 5).

Tabela 4 Positivos e negativos para MG por suabe e escarificação como técnicas de coleta*

Técnicas de coleta	PCR MG		
	POSITIVO	NEGATIVO	TOTAL
suabe	05	35	40
escarificado	05	35	40
TOTAL	10	70	80

*Qui-quadrado, IC=95%, ($p>0,05$)

Tabela 5 Positivos e negativos para *E.coli* gene *fel A* por suabe e escarificação como técnicas de coleta*

Técnicas de coleta	PCR <i>E.coli</i> gene <i>fel A</i>		
	POSITIVO	NEGATIVO	TOTAL
suabe	13	27	40
escarificado	11	29	40
TOTAL	24	56	80

*Qui-quadrado, IC=95%, ($p>0,05$)

5 DISCUSSÃO

A escolha da PCR como método nesse estudo deveu-se à possibilidade de obtenção eficiente de resultados com rapidez e especificidade, permitindo uma tomada de decisões em relação às medidas sanitárias a serem adotadas na empresa e na indústria. Segundo Callison et al (2006), esta técnica apresenta uma sensibilidade analítica equivalente ou até mesmo superior a outras provas diagnósticas. Como houve casos de condenação por aerossaculite, era esperada a presença nas aves de MG e/ou *E.coli* dentre outros agentes respiratórios, o que foi confirmado pela PCR. O presente estudo demonstrou que o par de “primers” utilizado foi uma boa opção para o diagnóstico molecular da infecção por MG pela sua elevada sensibilidade. A sensibilidade do par de “primer” MG-PCR/481 corrobora com os resultados de Nascimento et al. (2005b) que ao compararem a eficácia do “primer” MG-PCR/481 com o MG-PCR/732, obtiveram um logaritmo mais sensível em relação ao segundo na detecção de MG nos espécimes testados. Além disso, os mesmos autores, demonstraram que ao realizar a coleta com o suabe de traquéia, o MG-PCR/481 amplificou o fragmento de DNA esperado em 70% (7/10) das aves testadas, ao contrário deste estudo em que a técnica não interferiu no resultado.

A presença do gene *fel A* de *E.coli* nos isolados de frangos de corte no presente estudo, é fato que merece ser considerado de grande importância, pois pode comprometer a saúde das aves, por ser considerado um marcador de patogenicidade. Segundo Gyimah e Panigrahy (1988) e Eisenstein (1987), o gene *fel A* é um dos fatores relacionados com a aderência, permitindo assim a interação entre as bactérias e as células do hospedeiro. Sua especificidade para receptores das células do hospedeiro capacita as bactérias a superação dos mecanismos

fisiológicos de defesa, permitindo a colonização e multiplicação com ou sem invasão subsequente.

A detecção do gene *fel A* de *E.coli* no presente estudo está de acordo com os resultados de Rocha et al (2008) que detectaram em 61 cepas de *E. coli*, isoladas de frangos de corte com problemas respiratórios, testadas por PCR utilizando o mesmo par de “primers” utilizado neste estudo, os seguintes resultados para os genes fimbriais: *fel A* em 39,3% das amostras testadas e *pap C* em 24,3%. Pourbakhsh et al. (1997) sugeriram em seus estudos que a fimbria P pode estar envolvida na colonização de órgãos sistêmicos, com subsequente septicemia, em desacordo com Dozois et al (1995) que encontraram como resultados que as traquéias de aves não apresentam receptores para a fimbria P.

A infecção associada de micoplasma e *E.coli* deste trabalho encontra respaldo em estudos prévios. A participação da *E.coli*, em infecções simples ou associadas às infecções respiratórias por MG foi relatada no estudo de Yang-Rende et al. (1996), no qual a *E.coli* estava associada em 37% dos casos à *Mycoplasma* spp.. Linzitto e Menendez (1996) mostraram a importância econômica e sanitária da presença destes microorganismos nas explorações avícolas intensivas na Argentina. Em 66,6 % das lesões de traquéia, seios nasais e pulmões foram isoladas bactérias do gênero *Mycoplasma* e 33,3 % *E.coli*.

Aerossaculite sem a presença de MG e/ou *E.coli* não descarta a possibilidade de envolvimento por outros agentes respiratórios, portanto uma análise mais apurada englobando vários agentes seria ideal. O estudo realizado por Yang-Rende et al. (1996), demonstrou que a *E.coli* estava associada em 37% dos casos a presença de *Mycoplasma* spp., DN e a BI.

A presença de aerossaculite neste estudo está de acordo com Minharro et al (1999), Assis et al. (2003) e Branco (2004), que apontaram a aerossaculite como uma das principais causas de condenações de carcaças em matadouros brasileiros. Linzitto e Menéndez (1996) observaram um percentual maior para as lesões por *Mycoplasma* spp., quando comparadas aquelas ocasionadas por *E.coli*, ao contrário dos resultados do presente trabalho, em que foi observado um maior número de lotes acometidos por *E.coli*. Minharro et al. (2001), estudando causas de condenação em frangos no estado de Goiás, observaram a presença de *E.coli* por cultivo e identificação em 80,64% (25/31) dos galpões estudados e de MG por PCR em 32,25% (10/31) sendo que em 38,7% (12/31) dos lotes a associação de

microrganismos foi encontrada e destes, 12,9% (4/31) eram MG e *E.coli*. O presente estudo concorda com a maior frequência de detecção de *E.coli* em relação ao MG, por outro lado, houve mais casos de associação destes dois agentes que no estudo de Minharro et al. (2001).

Os resultados vão ao encontro aos de Rosales (1991), Minharro et al. (2001) e Neves (2006), nos quais problemas como aerossaculites associadas a colibacilose representaram prejuízos econômicos. A presença de MG e/ou *E.coli* patogênica pode induzir a redução de peso das aves, causando desuniformidade das aves por lotes com prejuízos ocasionados tanto na granja quanto no matadouro na linha de abate, como relatado por Russel (2003) e Branco (2004). Tais afirmativas estão de acordo com o trabalho, já que foi encontrada uma diferença estatística significativa entre a positividade para a presença dos dois agentes e o peso vivo dos frangos estudados.

No presente estudo, as técnicas de coleta de material propostas não influenciaram os resultados da PCR, corroborando com os resultados de Toledo et al. (2009) que compararam as mesmas técnicas em 60 aves para detecção de MG e MS.

6 CONCLUSÃO

- Lotes de frangos de corte condenados por aerossaculite foram positivos para MG e gene *felA* de *E.coli* pela PCR;
- O par de “primers” MG-PCR/481 foi capaz de detectar somente MG em lotes de frangos de corte com condenações por aerossaculite;
- A positividade para MG e/ou *E.coli* em lotes de frangos de corte condenados por aerossaculite pode interferir no peso vivo das aves;
- Os métodos de coleta com o auxílio de suabe e por escarificação da traquéia apresentaram eficácia semelhante na detecção de MG e/ou *E.coli* por PCR.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

AMARAL, L.A.; NADER FILHO, A.; ISA, H.; BARROS, L.S.S. Hygienic and sanitary quality and chlorine demand of the water from nipple and cup drinkers of laying hens. *Brazilian Journal of Poultry Science*, v.3, n.3, p.249-255, 2001.

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.

AVILA, Z.S. A vitoriosa Trajetória da Avicultura. In: OLIVO, R. *O Mundo do Frango: cadeia produtiva de carne de frango*. Criciúma, SC: Editado por Rubison Olivo, 2006. 680 p., cap.1, p.21-26.

BARNES, H.J.; VAILLANCOURT, J.P.; GROSS, W.B. Colibacillosis In: SAIF, Y.M.; BARNES, H.J.; FADLY, A.M.; GLISSON, J.R.; McDOULGALD, L.R.; SWAYNE, D.E. *Diseases of Poultry*.11.ed. Iowa: Iowa State Press, A Blackwell Publishing Company, 2003. 1231 p., seção II, cap.18. p.631-656.

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.

BRANTON,S. L.; BEARSON,S. M. D.; BEARSON,B.; LOTT, B. D.; MASLIN,W. R. ; COLLIER,S. D.; PHARR, G. T.; BOYKIN, D. L. The Effects of 6/85 Live *Mycoplasma gallisepticum* Vaccine in Commercial Layer Hens over a 43-Week Laying Cycle on Egg Production, Selected Egg Quality Parameters, and Egg Size Distribution When Challenged Before Beginning of Lay. *Avian Diseases.*, v.46. p.423–428, 2002

BRASIL. Portaria nº210, de 10 de novembro de 1998. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento Técnico da Inspeção Tecnológica e Higiênico-sanitária de carne de aves do Ministério da Agricultura, Pecuária e

Abastecimento (MAPA). *Diário Oficial República Federativa do Brasil*, Brasília/DF, 11 de novembro. 1998. Seção 1.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Secretaria da Defesa Agropecuária, Departamento de Defesa Animal. Brasília, DF. Programa Nacional de Sanidade Avícola, 1994.

BRASIL. Ministério da Agricultura, pecuária e Abastecimento. Normas Técnicas para o Controle e a Certificação de Núcleos e Estabelecimentos Avícolas para a Micoplasmose Aviária (*Mycoplasma gallisepticum*, *synoviae* e *meleagridis*). Publicado no Diário Oficial da União de 24/08/2001, Seção 1, p.68.

BUIM, M.R.; BUZINHANI, M.; YAMAGUTI, M.; OLIVEIRA, R.C.; METTIFOGO, E.; TIMENETSKY, J.; FERREIRA, A.J.P. Intraspecific variation in 16S rRNA gene of *Mycoplasma synoviae* determined by DNA sequencing. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 21 July 2008.

BUIM, M.R.; METTIFOGO, E.; TIMENETSKY, J.; KLEVEN, S.; FERREIRA, A.J.P. Epidemiological survey on *Mycoplasma gallisepticum* and *M. synoviae* by multiplex PCR in commercial poultry. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.27, n°7, p. 552-556, 2009.

CALDEIRA, L. G. M. Principais Causas de Condenação de Carcaças de Frango de Corte na Inspeção. In: I DIA DO FRANGO. NÚCLEO DE ESTUDOS EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLA. 25 de set/2008. Lavras – MG. Brasil

CALLISON, S.A.; RIBLET, S.M.; SUN, S.; IKUTA, N.; HILT, D.; LEITING, V.; KLEVEN, S.H.; SUAREZ, D.L.; GARCIA, M. Development and validation of a real-time Taqman polymerase chain reaction assay for the detection of *Mycoplasma gallisepticum* in naturally infected birds. *Avian Diseases*, v.50, p. 537-544. 2006.

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, A.L.S.P.; TESSARI, E.N.C.; CASTRO, A.G.M.; PULICI, S.C.P.; ZANATTA, G.F.. 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.; EYIGOR, A. Real-Time Polymerase Chain Reaction for Detection of *Mycoplasma gallisepticum* in Chicken Trachea. *Avian Diseases*, v. 47. p.712–717, 2003.

CERDÁ, R.O. Medidas de Prevención y Control de la Micoplasmosis en Latinoamérica. In: Congreso Latinoamericano de Avicultura, 20°, 2007, Porto Alegre Anais...Porto Alegre: Centro de Eventos Fingers, 2007. p.111-124.

CHERNAKI-LEFFER, A.M. ; BIESDORF, S.M. ; ALMEIDA, L.M.; LEFFER, E.V.B.; VIGNE, F. Isolamento de enterobactérias em *Alphitobius diaperinus* e na cama de

aviários no oeste do Estado do Paraná, Brasil. *Brazilian Journal of Poultry Science*, v.4, n.3, p.243-247, 2002.

DAVIS, M.; MORISHITA, T.Y. Relative ammonia concentrations, dust concentrations, and presence of *Salmonella* species and *Escherichia coli* inside and outside commercial layer facilities. *Avian Diseases*, v.49, n.1, p.30-35, 2005.

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

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.

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

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.

DOZOIS, C.M.; HAREL, J.; FAIRBROTHER, J. M. P-fimbriae-producing septicaemic *Escherichia coli* from poultry possess febrile gene clusters whereas pap hybridizing P-fimbriae negative strains have partial or divergent P fimbrial gene clusters. *Microbiology*, v. 142, p.2759-2766, 1996.

DOZOIS, C. M., POURBAKHS, S.A.; FAIRBROTHER, J. M. Expression of P and type 1 (FI) fimbriae in pathogenic *Escherichia coli* from poultry. *Vet. Microbio.*, v.145, p. 297-309. 1995.

EI TAYEB; HANSON, A.B. Interactions between *Escherichia coli* and Newcastle disease virus in chickens. *Avian Diseases*, v.46, n.3, p.660-667, 2002.

EISENSTEIN, B.I. Fimbriae *Escherichia coli* and *Salmonella Typhimurium*: cellular and molecular Biology. Edited by: Neidhardt, F.C., Washington, D.C., v. 1, p. 84-90, 1987.

ELFADIL, A.A., VAILLANCOURT, J.P.; MEEK, A.H.; GYLES, C.L. A prospective study of cellulitis in broiler chickens in southern Ontario. *Avian Diseases*, v.40, n.3, p.677-689, 1996

EVANS, J.D.; LEIGH, S.A.. Differentiation of *Mycoplasma gallisepticum* Vaccine Strains ts-11 and 6/85 from Commonly Used *Mycoplasma gallisepticum* Challenge Strains by PCR. *Avian Diseases*, v. 52. p.491-497, 2008.

EWERS, C.; JANBEN, T.; KIEBLING, S.; PHILIPP, H.; WIELER, L.H. Rapid detection

of virulence-associated genes in avian pathogenic *Escherichia coli* by Multiplex Polymerase Chain Reaction. *Avian Diseases*, v.49, n.2, p.269-273, 2005.

FEBERWEE, A.; MEKKES, D.R.; WIT, J.J.; HARTMAN, E.G.; PIJPERS, A. Comparison of Culture, PCR, and Different Serologic Tests for Detection of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* Infections. *Avian Diseases*, v. 49. p.260–268, 2005.

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, A.J.P.; KNOBL, T. Colibacilose. In: BERCHIERI JUNIOR, A.; SILVA, E.N.; DI FÁBIO, J.; SESTI, L.; ZUANAZE, M.A.F. *Doenças das Aves*. 2ªed. Campinas. Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas. 2009. p.457-471.

FERREIRA, A.J.P.; REVOLLEDO, L.; FERREIRA, C.S.A. Colibacilose. In: REVOLLEDO, L.; FERREIRA, A.J.P. e organizadores. *Patologia Aviária*. Barueri, SP: Editora Manole, 2009.

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/embrapave>>. Acesso em: nov. 2009.

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.

GARCIA, M.; IKUTA, N.; LEVISOHN, S.; KLEVEN, S.H. Evaluation and Comparison of Various PCR Methods for Detection of *Mycoplasma gallisepticum* Infection in Chickens. *Avian Diseases*, v.49. p.125–132, 2005.

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

GOSH, A.; DAS, J.; MANILOFF, J. Lack of repair of ultraviolet light damage in *Mycoplasma gallisepticum*. *Journal of molecular Biology*, v.116, p.337-344. 1977

GYIMAH, J.E.; PANIGRAHY, B. Adhesin-receptor Interactions Mediating the Attachment of Pathogenic *Escherichia coli* to Chicken Tracheal Epithelium. *Avian Diseases*, v. 32, p. 74-78, 1988.

HANNAN, P.C.T. Guidelines and recommendation for antimicrobial minimum inhibitory concentration (MIC) resting against veterinary mycoplasma species. *Vet. Res.* v.31. p. 373-395. 2000.

HERENDA, D.C.; FRANCO, D. Poultry diseases and meat hygiene: a color atlas. Iowa: Iowa State University Press, 1996, 337p.

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.

HONG, Y.; GARCIA, M.; LEVISOHN, S.; SAVELKOUL, P.; LEITING, V.; LYSNYANSKY, I.; LEY, D.H.; H. KLEVEN, S.H. Differentiation of *Mycoplasma gallisepticum* Strains Using Amplified Fragment Length Polymorphism and Other DNA-Based Typing Methods. *Avian Diseases*, v.49. p.43–49, 2005.

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

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.

KEMPF, I. Influence of the administration of antibiotics on the diagnosis of *Mycoplasma gallisepticum* infection in chickens. *Point- Veterinaire*, v.23, p.767-773. 1991.

KLEVEN, S.H. Mycoplasmosis. In: SAIF, Y.M.; BARNES, H.J., FADLY, A.M.; GLISSON, J.R.; MCDOUGALD, L.R.; SWAYNE, D.E. *Diseases of poultry*. Ames: Iowa State University Press, 11 th, p. 719-721. 2003.

KLEVEN, S.H. Control of Avian *Mycoplasma* Infections in Comercial Poultry. *Avian Diseases*. v.52. p.367-374, 2008.

KLEVEN, S.H.; FULTON, R.M.; GARCIA,M.; IKUTA, V.N.; LEITING, V.A.; LIU, T.; LEY, D.H.; OPENGART, K.N.; ROWLAND, G.N.; WALLNER-PENDLETON, E. Molecular Characterization of *Mycoplasma gallisepticum* Isolates from Turkeys. *Avian Diseases*, v.48. p. 562–569, 2004.

KUHNERT, P.; BOERLIN, P.; FREY, J. Target genes for virulence assessment of *Escherichia coli* isolates from water, food and the environment. *FEMS Microbiology Reviews*, v.24, n.1, p.107-117, 2000.

LA RAGIONE, R.M.; WOODWARD, M.J. Virulence factors of *Escherichia coli* serotypes associated with avian colisepticaemia. *Res. Vet. Sci.* V.73. n.1, p.27-35. 2002.

LEY, D.H. *Mycoplasma gallisepticum* infection. In: SAIF, Y.M.; BARNES, H.J., FADLY, A.M.; GLISSON, J.R.; MCDOUGALD, L.R.; SWAYNE, D.E. *Diseases of poultry*. Ames: Iowa State University Press, 11 th, p. 722-744. 2003.

LEY, D.H.; BERKHOFF, J.E.; LEVISOHN, S. Molecular epidemiologic investigation of *Mycoplasma gallisepticum* conjuntivitis in songbirds by random amplified polymorphic DNA analyses. *Emerging Infectious Diseases*, v.3, p.375-380, 1997.

LINZITO, 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.

LOCKABY, S.B.; HOERR, F.J. Virulence of *Mycoplasma synoviae* in poultry: a review. *Poultry Science*, v.55, p.175-185, 1999.

LYSNYANSKY, I.; GARCIA, M.; LEVISOHN, S. Use of *mgc2*-Polymerase Chain Reaction–Restriction Fragment Length Polymorphism for Rapid Differentiation Between Field Isolates and Vaccine Strains of *Mycoplasma gallisepticum* in Israel. *Avian Diseases*, v.49. p.238–245, 2005.

MADIGAN, M.T.; MARTUSKO, J.M.D.; PARKES, J. *Microbiologia de Brock*. 10.ed. São Paulo, 2004. Cap.10, p.294-296.

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.

MARTINS, P.C. Surtos de Influenza Aviária: Evolução, Controle e seus reflexos no mercado avícola. In: CONFERÊNCIA APINCO 2001 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLA, 2001, Campinas, SP. Anais...Campinas: FACTA.2001, 2v., V.2, p.97-112.

MARTINS, F.M.; TALAMINI, D.J.D.; NOVAES, M. Avicultura: situação e perspectiva brasileira e mundial. *Ave world*. n.20, fev/mar., p.24-30, 2006.

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, A.A.; MOREIRA, P.C. Rastreabilidade.....*Revista Avicultura Industrial*, n.1110, p.44-45, 2003.

MENDES, A.A.; NAAS, I.A.; MACARI, M. Produção de frangos de corte. *Facta - Campinas*, SP. 2004. 356 pgs

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.

MENG, J.; FENG, P.; DOYLE, M.P. Pathogenic *Escherichia coli*. In: DOWNES, F.P.; ITO, K. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. 4. ed. Washington, DC: American Public Health Association (APHA), 2001, 676p, Cap.35, p.331-341.

METTIFOGO, E.; BUIM, M.R. *Mycoplasma gallisepticum*. In: REVOLLEDO, L.;

FERREIRA, A.J.P. e organizadores. *Patologia Aviária*. São Paulo: Manole, 2009. 510 p. cap. 9, p. 86-100.

METTIFOGO, E.; FERREIRA, A.J.P. Micoplasmose Aviária. In: ANDREATTI FILHO, R.L. *Saúde Aviária e doenças*. São Paulo: Roca, 2006. 510 p. cap. 16, p. 147-151.

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

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

MORENO, A.M. Técnicas moleculares de diagnóstico. In: REVOLLEDO, L.; FERREIRA, A.J.P. e organizadores. *Patologia Aviária*. São Paulo: Manole, 2009. 510 p. cap. 14, p. 413-427.

NASCIMENTO, E.R.; PEREIRA, V.L.A. Micoplasmoses. In: DI FABIO, J.; ROSSINI, L.I. *Doenças das Aves*. Campinas: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, 2009. p. 485-496.

NASCIMENTO, E.R.; FERREIRA NETO, S.M.; GALLETI, M.C.M.; NASCIMENTO, M.G.F.; LIGNON, G.B.; MENDONÇA, G.A. Chicken *Mycoplasma gallisepticum* infection, diagnosed by agent detection, hemagglutination inhibition, but not agglutination. In: AVMA CONFERENCE/AAAP MEETING, 1999a; New Orleans, USA. p.56

NASCIMENTO, E.R.; PEREIRA, V.L.A.; NASCIMENTO, M.G.F.; BARRETO, M.L. Avian Mycoplasmosis Update. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*. v.7 , n.1 . p. 01 - 09, jan-mar, 2005a.

NASCIMENTO, E.R.; NASCIMENTO, M.G.F.; VASCONCELOS, M.P.; BARRETO, M.L.; ALMEIDA, J.F.; CAMPOS, C.A.M.; PEREIRA, V.L.A. Aprimoramento da PCR para *Mycoplasma gallisepticum* pelo encurtamento do amplicon e ajuste no processamento da amostra. *Acta Science Veterinariae*, v. 33. p. 297-301, 2005b

NASCIMENTO, E.R.; POLO, P.A.; PEREIRA, V.L.A.; BARRETO, M.L.; NASCIMENTO, M.G.F.; ZUANAZE, M.A.F.; CORRÊA, A.; SILVA, R.C.F. Serologic Response of Spf Chickens to Live Vaccines and other Strains of *Mycoplasma gallisepticum*. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*. v.8 , n.1. p.45 - 50, jan-mar, 2006.

NATARO, J.P.; KEPER, J.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Review*, v.11, n.1, p.142-2001, 1998.

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.

NEVES, T. Perdas por Condenações Causadas por Colibaciloses Aviárias. 2006. <Disponível em: <http://www.avicultura.com.pt>>.

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.

ORTIZ, A.; FROYMAN, R.; KLEVEN, S.H. Evaluation of enrofloxacin against egg transmission of *Mycoplasma gallisepticum*. *Avian Diseases*, v.39, p.830-836, 1995.

ORSKOV, F.; ORSKOV, I. *Escherichia coli* serotyping and disease in man and animals. *Canadian Journal of Microbiology*, v.37, n.7, p.699-704, 1992.

PANG, Y.; WANG, H.; GIRSHICK, T.; XIE, Z.; KHAN, M.I. Development and Application of a Multiplex Polymerase Chain Reaction for Avian Respiratory Agents. *Avian Diseases*, v. 46. p.691–699, 2002.

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.

PICARD, B.; GARCIA, J.S.; GOURIOU, S.; DURIEZ, P. BRAHIMI, N.; BINGEN, E.; ELION, J.; DENAMUR, E. The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection. *Infection and immunity*, v.67, n.2, p.546-553, 1999.

PILLAI, S.R.; MAYS, H.L.; LEY JR., D.H.; LUTTRELL, P.; PANANGALA, V.S.; FARMER, K.L.; ROBERTS, S.R. Molecular Variability of House Finch *Mycoplasma gallisepticum* Isolates as Revealed by Sequencing and Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of the *vpvA* Gene. *Avian Diseases*, v. 47. p.640–648, 2003.

PINTO, M.V. O papel da inspeção sanitária post mortem em matadouro na detecção de lesões e processos patológicos em aves: quatro casos de lesões compatíveis com a doença de Marek em carcaças de aves rejeitadas. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinária*, v.98, n.587, p.145-148, 2003.

POURBAKHS, S. A., DHO-MOULIN, M., BREE, A., DESAUTELS, C., MARTINEAU-DOIZE, B. & FAIRBROTHER, J. M. (1997) Localization of the in vivo expression of P and F1 fimbriae in chickens experimentally inoculated with pathogenic *E. coli*. *Microbial Pathogenesis*, v.22, p. 331–341. 1997.

POURBAKHS, S.A.; BOULIANNE, M.; MARTINEAU-DOIZÉ, B.; DOZOIS, C.M.; DESAUTELS, C.; FAIRBROTHER, M. Dynamics of *Escherichia coli* infection in experimentally inoculated chickens. *Avian Diseases*, v.41, n.1, p.221-233, 1997.

QUEVEDO, A. Anuário 2005 – Frango à brasileira. Disponível em: <<http://www.aviculturaindustrial.com.br/site/dinamica>>. Acesso em nov. 2008.

RAVIV, Z.; CALLISON, S.; FERGUSON-NOEL, N.; LAIBINIS, V.; WOOTEN, R.; KLEVEN, S.H. The *Mycoplasma gallisepticum* 16S–23S rRNA Intergenic Spacer Region Sequence as a Novel Tool for Epizootiological Studies. *Avian Diseases*, v.51. p.555–560, 2007.

RAZIN, S.; TULLY, J.G. Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmaology: Molecular Characterization. Academic Press; San Diego, Califórnia. USA. V.1, P. 215-265,1995.

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

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.

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.

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, n.8 , p.1326-1331, 2003.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. v.2, Cap.14.

SESTI, L.A.C. Filosofias e conceitos de Biosseguridade e doenças com potencial de risco para a aviculture brasileira. In: CONFERÊNCIA APINCO 2001 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2001, Campinas, Anais...Campinas: FACTA, 2001, 2v., V.1, p.47-91.

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, 2004, 2v.,v.2, p.193-199.

SOUZA, C.P. *Escherichia coli* as a specialized bacterial. pathogen. *Revista de Biologia e Ciências da Terra*, v.6, n.2, p.341-352, 2006.

SPENCER, D.L.; KURTH, K.T.; MENON, S.A.; VANDYK, T.; MINION, F.C. Cloning and Analysis of the Gene for a Major Surface Antigen of *Mycoplasma gallisepticum*. *Avian Diseases*, v.46. p.816–825, 2002.

STEINLAGE, S.J.T.; FERGUSON, N.; SANDER, J.E.; GARCIA, M.; SUBRAMANIAN, S.; LEITING, V.A.; KLEVEN, S.H. Isolation and Characterization of a 6/85-like

Mycoplasma gallisepticum from Commercial Laying Hens. *Avian Diseases*, v. 47. p. 499–505, 2003.

STIPKOVITS, L.; KEMPFT, I. Mycoplasmosis in poultry. *Rev. Off. Int. Epizoot.* v.15. p.1495-1525. 1996.

THRUSFIELD, M. *Epidemiologia Veterinária*. 2. ed. São Paulo: Roca, 2003. 556p.

TIMENETSKY, J. Micoplasmose-conceitos gerais. In: REVOLLEDO, L.; FERREIRA, A.J.P. e organizadores. *Patologia Aviária*. Editora Manole LTDA., Barueri-SP, 2009. 510 p.

TOLEDO, F.G.M.; BRANDÃO, M.D.M.; GAZE, L.V.; MACHADO, L.S.; SILVA, R.C.; SILVA, C.C.S.; NASCIMENTO, E.R.; PEREIRA, V.L.A. Suabe e raspado de traquéia como técnicas de coleta de material para diagnóstico da Micoplasmose Aviária pela PCR. 19°. *Seminário de Iniciação Científica – Prêmio Vasconcelos Torres*. 2009.

TRABULSI, L.R.; TOLEDO, M.R.F. *Microbiologia*. Rio de Janeiro: Atheneu, 1991, p.386.

VAN KUPPEVELD, F.J.M.; VAN DER LOGT, J.T.M.; ANGULO, A.F.; VAN ZOEST, M.J.; UINT, W.G.V.; NIESTER, H.G.M.; GALAMA, J.M.D.; MELCHERS, W.J.G. Genus and species-specific identification of mycoplasmas by 16S RNA amplification. *Appl Environ Microbiology*, v.58, n.8, p.2606-2615, 1992.

VIDOTTO, M.C.; NAVARRO, H.R.; GAZIRI, L.C.J. Adherence pili of pathogenic strains of avian *Escherichia coli*. *Veterinary Microbiology*, v.59, n.1, p.79-87, 1997.

YAMAMOTO, R. Mollicutes. In: Biberstein, E.L., Zee, Y.C., editors. Review of veterinary microbiology. Chicago: *Blackwell Scientific Publications*, p.213-227, 1990.

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.

YANG-RENDE; GAO-XUAN; LI-TANQING; CHEN-LIFENG; ZHANG-LIGUO; YANG-RD; GAO-X; LI-TQ; CHEN-LF; ZHANG-LG. Isolation and identification of the pathogen in chickens infected with colibacillosis and preparation of a polyvalent inactivated vaccine. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, v.22, p.17-18.1996.

YODER JR, H.W. Mycoplasmosis. In: CALNEK, B.W.; BURNER, H.J.; BEARD, C.W.; YODER JR; H.W. *Diseases of Poultry*. 9th ed. Ames Iowa State University Press. p.196-198. 1991a.

YODER JR, H.W. *Mycoplasma gallisepticum* infection. In: CALNEK, B.W.; BURNER, H.J.; BEARD, C.W.; YODER JR; H.W. *Diseases of Poultry*. 9th ed. Ames Iowa State University Press. p.198-212. 1991b.

YODER JR, H.W.; DRURY, L.N.; HOPKINS, S.R. Influence of environment on airsacculitis: Effects of relative humidity and air temperature on broilers infected with *Mycoplasma synoviae* and infectious bronchitis. *Avian Diseases*, v.21, p.195-208, 1977.

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

8 ANEXOS

8.1 TAMPÃO TE DEXTROSE

Tampão TE pH 7,6	20,0mL
Dextrose	2,0g

8.2 SOLUÇÃO DE SÓDIO DODECIL SULFATO (SDS) 10%

SDS	20,0g
Água destilada	150,0mL

Ajustar o pH para 7,2 com HCl concentrado.

8.3 TAMPÃO TRIS-EDTA (TE) pH 7,6

Tris	0,211g (10mM)
Água destilada	400,0mL

Ajustar o pH para 7,6 com HCl concentrado.

EDTA	0,3622g (1mM)
------	---------------

Água destilada	400,0mL
----------------	---------

Ajustar o pH para 8,0 com NaOH sólido.

Unir as duas soluções, completando com água destilada qsp 1000 mL.

8.4 TAMPÃO DE ARRASTO

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

Armazenar a 4°C.

8.5 GEL DE AGAROSE 1,5%

Agarose Ultra Pura 3,75g

Água destilada 22mL

Levar esta solução ao microondas até derreter todo o Agar.

Adicionar 25,0 mL de Tampão Tris-borato-EDTA 5X (TBE).

8.6 TAMPÃO TRIS-BORATO-EDTA 0,5X (TBE)

Tris base 54,0g

Ácido bórico 27,5g

EDTA 0,5M (pH 8,0) 20,0mL

Água destilada q.s.p 1000,0 mL

8.7 SOLUÇÃO DE BROMETO DE ETÍDIO 5µg/mL

Brometo de etídio (10mg/mL) 100µL

Água destilada q.s.p. 200mL