

CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

DAYSE LIMA DA COSTA ABREU

SOROTIPAGEM E GENE *iss* DE *Escherichia coli*
E DETECÇÃO DE *Mycoplasma gallisepticum*
EM CODORNAS (*Coturnix coturnix coturnix*)
SOB INSPEÇÃO SANITÁRIA

UNIVERSIDADE
FEDERAL
FLUMINENSE

NITERÓI
2008

DAYSE LIMA DA COSTA ABREU

SOROTIPAGEM E GENE *iss DE Escherichia coli* E DETECÇÃO DE *Mycoplasma gallisepticum* EM CODORNAS (*Coturnix coturnix coturnix*)
SOB INSPEÇÃO SANITÁRIA

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

ORIENTADOR : PROF. Dr. ROBSON MAIA FRANCO

CO-ORIENTADORA: PROF^a D^{ra} VIRGINIA LÉO DE ALMEIDA PEREIRA

Niterói-RJ

2008

DAYSE LIMA DA COSTA ABREU

SOROTIPAGEM E GENE *iss DE Escherichia coli* E DETECÇÃO DE
Mycoplasma gallisepticum EM CODORNAS (*Coturnix coturnix coturnix*)
SOB INSPEÇÃO SANITÁRIA

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

Aprovada em 27 de fevereiro de 2008.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Robson Maia Franco – Orientador
UFF

Profa. Dra Virginia Léo de Almeida Pereira – Co-orientadora
UFF

Prof. Dr. Elmiro Rosendo do Nascimento
UFF

Dra. Maria da Graça Fichel do Nascimento
EMBRAPA – Agroindústria de alimentos

Dra Maíra Halfen Teixeira Liberal
PESAGRO- Rio

NITERÓI

2008

Ao meu marido, que me ensinou que podemos ter prazer no mais árduo dos trabalhos e que me entendeu, incentivou, ajudou e torceu para que tudo fosse possível.

AGRADECIMENTOS

À professora Virginia Léo de Almeida Pereira, modelo de integridade, competência, determinação e amor ao trabalho, cujo exemplo seguirei sempre.

Ao Professor Robson Maia Franco que com dedicação e sabedoria guiou-me sem nunca impedir meu desenvolvimento.

Ao professor Elmiro Rosendo do Nascimento, pela confiança em vários momentos, por sempre compartilhar seus conhecimentos e pelo auxílio indispensável nas análises estatísticas deste trabalho.

Ao professor Rogério Tortelly pela simpatia, presteza e pela colaboração inestimável nas análises histológicas.

À professora Teresinha Ferreira e à pesquisadora Maria da Graça Fichel do Nascimento por sua participação em minha qualificação, o que foi de grande importância no meu preparo para a finalização deste trabalho.

À Doutoranda Rita de Cássia Figueira Silva, por sua disponibilidade em esclarecer as mais diversas dúvidas, auxiliar nas mais diversas tarefas, pela alegria contagiante e pelo incentivo constante.

À Doutoranda Fernanda Martinez, pelo auxílio em todas as etapas do meu experimento, pela amizade e pela alegria que certamente fizeram “tudo dar certo”.

Ao Médico Veterinário Leandro Machado e à Doutoranda Juliana Almeida pelas análises da PCR.

Ao Doutorando Môsar Lemos pela prática adquirada para a coleta de materiais e pelo fornecimento de materiais para as análises laboratoriais.

Ao Mestrando Vinícios Teixeira, prestativo e imprescindível em vários momentos.

À aluna Vanessa Simas pelo auxílio nas análises laboratoriais e pela presença alegre que tornava o trabalho menos exaustivo.

Ao Fiscal Federal Agropecuário Rafael Martins Felício, pelo fornecimento dos animais para a elaboração deste estudo e por toda a atenção dedicada durante o período de coleta.

Ao secretário da Coordenação de Pós-graduação, Dráusio de Paiva Ferreira, sempre prestativo à todas as solicitações.

À CAPES, pelo auxílio financeiro.

À todos que, mesmo não citados, participaram desse trabalho e serão sempre lembrados como imprescindíveis para a sua realização.

“Tudo que você disser deve fazer bem. Nada que
você comer deve fazer mal”.

Gilberto Gil

RESUMO

Mycoplasma gallisepticum e *Escherichia coli* são agentes bacterianos freqüentes em codornas e têm um papel importante como agentes etiológicos nas doenças respiratórias das aves, reduzindo índices produtivos e aumentando a condenação de carcaças. Individualmente, *Escherichia coli* pode ser relacionada ao aumento da virulência e resistência a antimicrobianos de várias bactérias por meio de genes plasmidiais que podem ser trocados entre subprodutos de codornas e os consumidores. Este estudo foi conduzido para determinar a presença de *Mycoplasma gallisepticum* e *Escherichia coli* em traquéias e sacos aéreos de codornas aparentemente saudáveis e em codornas condenadas na linha de processamento, para definir se esses agentes contribuem para a redução de peso e a presença de alterações anatomopatológicas no trato respiratório de codornas e para demonstrar a resistência de *Escherichia coli* a antimicrobianos, a presença de isolados enteropatogênicos para humanos e o potencial patogênico da *Escherichia coli* para codornas através da presença do gene *iss*. Em uma empresa de processamento industrial, 120 codornas aparentemente saudáveis foram selecionadas antes de entrarem na linha de processamento e outras 60 foram selecionadas após condenadas pela Inspeção Sanitária, tendo sido todas posteriormente examinadas quanto à presença de *Mycoplasma gallisepticum* e *Escherichia coli* através da “Polymerase Chain Reaction (PCR) e do isolamento bacteriano, respectivamente. A Soroaglutinação Rápida (SAR) e o Teste de Inibição da Hemaglutinação (HI) foram usados para a detecção de anticorpos no soro das codornas. Somente as codornas positivas no HI foram submetidas à PCR e somente as traquéias foram examinadas. Os isolados de *Escherichia coli* foram submetidos ao teste de aglutinação com antisoro específico contra o antígeno O. Um teste de sensibilidade foi procedido com os isolados de *Escherichia coli* para os seguintes antimicrobianos: Amoxicilina (AMO), Ampicilina (AMP), Cefotaxima (CAZ), Cefoxitina (CFO), Ciprofloxacina (CIP), Enrofloxacina (ENO), Gentamicina (GEN), Ácido Nalidixico (NAL.), Polimixina B (POL), Cotrimoxazol (Sulfazotrin) (SUT) e Tetraciclina (TET). O gene *iss* foi detectado utilizando-se a PCR. As alterações macroscópicas no trato respiratório das codornas foram observadas em apenas uma das codornas selecionadas antes de entrarem na linha de processamento, e foram caracterizadas como aerossaculites, assim como ao exame microscópico. Outras alterações microscópicas foram detectadas em dez codornas condenadas. Não houve detecção de *Mycoplasma gallisepticum* nas traquéias de codornas a partir do uso da PCR. Isolados de *Escherichia coli* (26,66% - 16/60) foram detectados nas traquéias das codornas condenadas, apresentando esse agente correlação com a caquexia nas aves ($p < 0,05$). Nenhuma codorna foi positiva para a presença de anticorpos pela SAR. No teste de HI foram detectadas 28,3% (34/120) de codornas positivas para a presença de anticorpos contra *Mycoplasma gallisepticum*, e essa situação teve correlação com a variação de peso das aves. Dos isolados de *Escherichia coli* 45% (9/20) pertenciam ao patótipo EPEC e 25% (5/20) não puderam ser sorogrupoados. Todos os isolados de *Escherichia coli* mostraram resistência a, no mínimo, um antimicrobiano. A maioria das cepas foi resistente à TET (16/20), seguida pela CAZ (13/20) e NAL (12/20). Somente um isolado foi resistente à AMO. A detecção do gene *iss* ocorreu em 55% (11/20) dos isolados de *Escherichia coli*.

Palavras-chave: *Coturnix*, *Mycoplasma*, *Escherichia coli*, gene *iss*

ABSTRACT

Mycoplasma gallisepticum and *Escherichia coli* are frequent bacterial agents in quails, and play an important role as etiologic agent in avian respiratory disease, reducing rates of production, and increasing carcasses condemnation. Individually, *Escherichia coli* can be linked to the increase of virulence and antimicrobial resistance of various bacterial agents by means of plasmids genes that may be exchanged between quail subproducts and consumers. This study was conducted to determine the presence of *Mycoplasma gallisepticum* and *Escherichia coli* in tracheas and air sacs of apparently health and condemned quails at the processing line, and if this agents contributes with weight decrease, and anatomopathologies changings in the respiratory tract and to demonstrate the antimicrobial resistance of *Escherichia coli*, the presence of enteropathogenics isolates to humans, and the *Escherichia coli* pathogenic potential to the quails, through the presence of the *iss* gene. In an industrial processing facility 120 apparently healthy quails, before entering the slaughter line, and 60 condemned quails at the processing line were selected and assessed for *Mycoplasma gallisepticum* and *Escherichia coli* using the Polymerase Chain Reaction (PCR) and bacterial isolation respectively. The Rapid Serum Agglutination (RSA) and Hemagglutination Inhibition (HI) tests were used to *Mycoplasma gallisepticum* antibodies detection in quail serum. Only positive quails in the HI test to *Mycoplasma gallisepticum* were submitted to PCR and only tracheas were analyzed. The *Escherichia coli* isolates were submitted to slide agglutination test with specific antiserum to O antigen. A susceptibility test was performed with the *Escherichia coli* strains for the following antimicrobials: Amoxicillin (AMO), Ampicillin (AMP), Ceftazidime (CAZ), Cefoxitin (CFO), Ciprofloxacin (CIP), Enrofloxacin (ENO), Gentamicin (GEN), Nalidixic Acid (NAL.), Polimixin B (POL), Cotrimoxazole (Sulfazotrin) (SUT) and Tetracyclin (TET). The gene *iss* was examined usin PCR. Macroscopic changes in the respiratory tract were exhibit only in one quail selected before entering the slaughter line, and was characterized like aerossaculitis also in the microscopic examination. The others microscopic changes were detected in ten, condemned quails. There was no *Mycoplasma gallisepticum* detected in trachea of quails using PCR. Isolates of *Escherichia coli* (13,33% - 20/180) were detected, only in the condemned quail tracheas, and this agent appears have been a relationship with the presence of cachexia ($p < 0,05$). No quail was positive to *Mycoplasma gallisepticum* by the RSA. The HI test detected 28,3% (34/120) of quail positive to the presence of antibodies against *Mycoplasma gallisepticum*, and this situation was correlated with the weight decrease. From the isolates of *Escherichia coli* 45% (9/20) were grouped like EPEC pathotypes whereas 25% (5/20) of the isolates could not be typed. All the *Escherichia coli* isolates showed resistance to at least one antimicrobial. The majority of the specimen were resistant to the TET (16/20), followed by CAZ (13/20) and NAL (12/20). Only one isolate was resistant to AMO. Detection of the gene *iss* occurred in 55% (11/20) of the *Escherichia coli* isolates.

Key-words: *Coturnix*, *Mycoplasma*, *Escherichia coli*, gene *iss*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 Codorna da espécie *Coturnix coturnix coturnix* da linhagem francesa CDR, p.53.
- Figura 2 Grupo de codornas prontas para a pesagem individual, p.54.
- Figura 3 Alterações macroscópicas em codornas de corte retiradas da linha de processamento no momento da pendura, p.66.
- Figura 4 Principais alterações macroscópicas em codornas de corte condenadas pela Inspeção Sanitária, p.66.
- Figura 5 Codorna descartada ao abate apresentando hematoma no peito, p.67.
- Figura 6 Codorna descartada ao abate apresentando alteração na coloração da carcaça por focos hemorrágicos, p.67.
- Figura 7 Codorna descartada ao abate apresentando celulite no peito, p.68.
- Figura 8 Codorna, saco aéreo. Acentuado espessamento com presença de células mononucleares. H.E.obj. 10x, p.69.
- Figura 9 Codorna, pulmão. Processo inflamatório difuso mononuclear. H.E. obj. 10x, p.69.
- Figura 10 Codorna, pulmão. Processo inflamatório difuso mononuclear. H.E. obj. 40x, p.70.
- Figura 11 Codorna, traquéia. Traqueíte localizada na mucosa e submucosa. H.E. obj. 10x, p.70.
- Figura 12 Resultado da PCR para o gene *iss* em estirpes de *Escherichia coli* isoladas de traquéias de codornas condenadas ao abate, p.74.
- Figura 13 Resultado da PCR para o gene *iss* em estirpes de *Escherichia coli* isoladas de traquéias de codornas condenadas ao abate, p.74.

LISTA DE QUADROS E TABELAS

- Tabela 1 Efetivo de codornas no Brasil e nas diferentes Unidades Federativas entre os anos de 2001 e 2006, p.17.
- Quadro 1 Teores nutricionais comparativos entre a carne de codorna, a carne de frango e as carnes bovina e suína, p.20.
- Tabela 2 Ultimos surtos de micoplasmose no Brasil, causados por *Mycoplasma gallisepticum* (MG) e *Mycoplasma synoviae* (MS), notificados à OIE, p.33.
- Tabela 3 Surtos de micoplasmose causados por *Mycoplasma gallisepticum* (MG) e *Mycoplasma synoviae* (MS) nas diferentes regiões do mundo, entre os anos de 2006 e 2007, p.34.
- Quadro 2 Patotipos e sorogrupos de *Escherichia coli* diarreio gênicas, p.46.
- Quadro 3 Principais doenças em aves provocadas por *Escherichia coli* e os sorogrupos responsáveis, p.48.
- Tabela 4 Presença de sorogrupos do patotipo EPEC em isolados de *Escherichia coli* em traquéias de 16 codornas condenadas ao abate, p.72.
- Tabela 5 Comportamento de 22 estirpes de *Escherichia coli*, isoladas de traquéias de 16 codornas condenadas ao abate, quanto à susceptibilidade antimicrobiana, p.73.
- Tabela 6 Presença do gene *iss* em 22 estirpes de *Escherichia coli*, isoladas de traquéias de 16 codornas condenadas ao abate, p.73.
- Tabela 7 Relação entre a presença de caquexia em 60 codornas condenadas ao abate e a presença de *Escherichia coli*, p.75.
- Tabela 8 Relação entre a presença de caquexia em 60 codornas condenadas ao abate e a presença de *Escherichia coli* do patotipo EPEC, p.75.
- Tabela 9 Relação entre a presença de caquexia em 60 codornas condenadas ao abate e a presença Do gene *iss* em *Escherichia coli*, p.76.
- Tabela 10 Valor de regressão para o peso de 120 codornas retiradas antes da entrada na linha de processamento como variável dependente frente à variável preditiva presença de anticorpos contra *Mycoplasma gallisepticum* pelo teste do HI, p.76.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A-EPEC	<i>Escherichia coli</i> Enteropatogênica atípica (Atypical Enteropathogenic <i>Escherichia coli</i>)
APEC	<i>Escherichia coli</i> Patogênica para Aves (Avian Pathogenic <i>Escherichia coli</i>)
DAEC	<i>Escherichia coli</i> Difusamente Aderente (Diffusely Adherent <i>Escherichia coli</i>)
EAEC	<i>Escherichia coli</i> Enteroagregativa (<i>Escherichia coli</i>)
EIEC	<i>Escherichia coli</i> Enteroinvasiva (Enteroinvasive <i>Escherichia coli</i>)
EPEC	<i>Escherichia coli</i> Enteropatogênica (Enteropathogenic <i>Escherichia coli</i>)
ETEC	<i>Escherichia coli</i> Enterotoxigênica (Enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i>)
ExPEC	<i>Escherichia coli</i> Extraintestinal (Extraintestinal Pathogenic <i>Escherichia coli</i>)
ELISA	Ensaio imunoabsorvente de ligação de enzimas (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)
HA	Hemaglutinação (Hemagglutination)
HI	Inibição da Hemaglutinação (Hemagglutination Inhibition)
<i>iss</i>	Aumento de resistência ao soro (Increased serum survival)
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
OIE	Office International des Epizooties (World Organisation for Animal Health)
PBS	Salina Fosfatada Tamponada (Phosphated Buffered Saline)
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase (Polymerase Chain Reaction)
PNSA	Programa Nacional de Sanidade Avícola
SAR	Soroaglutinação Rápida
TSI	Três Açúcares e Ferro (Triple Sugar Iron)
UPEC	<i>Escherichia coli</i> Uropatogênica (Uropathogenic <i>Escherichia coli</i>)

SUMÁRIO

RESUMO, p.6

ABSTRACT, p.7

LISTA ILUSTRAÇÕES, p.8

LISTA DE QUADROS E TABELAS, p.9

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS, p.10

1 INTRODUÇÃO, p.14

2 REVISÃO DE LITERATURA, p.16

2.1 A CARNE DE CODORNA, p.16

2.1.1 **Sistemática do gênero *Coturnix***, p.17

2.1.2 **Produção**, p.17

2.1.3 **Consumo e comercialização da carne de codorna**, p.19

2.1.4 **Aspectos nutricionais e sensoriais da carne de codorna**, p.19

2.2 ASPECTOS ANATÔMICOS E FUNCIONAIS DO TRATO RESPIRATÓRIO DAS CODORNAS, p.20

2.3 MECANISMOS DE DEFESA DO TRATO RESPIRATÓRIO DAS AVES, p.22

2.4 IMPORTÂNCIA DAS DOENÇAS RESPIRATÓRIAS NA PRODUÇÃO AVÍCOLA, p.22

2.5 MICOPLASMOSE E COLIBACILOSE EM CODORNAS, p.23

2.5.1 **Micoplasmose**, p.24

2.5.1.1 Taxonomia e espécies de interesse para a coturnicultura, p.24

2.5.1.2. Micoplasmose na coturnicultura, p.25

2.5.1.3 Diagnóstico, p.27

2.5.1.3.1 *Diagnóstico sorológico*, p.27

2.5.1.3.2 *Isolamento em meios de cultivo*, p.29

2.5.1.3.3 *Detecção de micoplasmas através da técnica da Reação em Cadeia de Polimerase*, p.30

2.5.1.4 Tratamento e controle, p.31

2.5.1.5 Importância das micoplasmoses para a coturnicultura, p.32

2.5.2 **Colibacilose**, p.34

2.5.2.1 Taxonomia, p.34

2.5.2.2 Colibacilose na coturnicultura, p.35

2.5.2.3 Diagnóstico, p.36

2.5.2.4 Tratamento e controle, p.36

2.5.2.5	Importância da colibacilose para a coturnicultura,	p.37
2.6	DIFERENCIAÇÃO DAS ESTIRPES DE <i>Escherichia coli</i> QUANTO A PATOGENICIDADE,	p.38
2.6.1	Métodos fenotípicos,	p.38
2.6.2	Métodos genéticos,	p.41
2.7	PATOTIPOS DE <i>Escherichia coli</i> ,	p.44
2.7.1	Estirpes enteropatogênicas,	p.44
2.7.2	Estirpes extraintestinais,	p.47
2.7.3	Estirpes patogênicas para as aves,	p.47
2.8	GENE <i>iss</i> ,	p.49
2.9	IMPORTÂNCIA DAS ESTIRPES DE <i>Escherichia coli</i> AVIÁRIAS COMO AGENTES ETIOLÓGICOS DE DOENÇAS ALIMENTARES,	p.50
3	MATERIAL E MÉTODOS,	p.52
3.1	OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS,	p.52
3.2	COLETA DE DADOS E DE MATERIAL,	p.52
3.3	AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES ANATOMOPATOLÓGICAS,	p.54
3.3.1	Alterações macroscópicas,	p.54
3.3.2	Alterações microscópicas,	p.55
3.4	SOROLOGIA PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA <i>Mycoplasma gallisepticum</i> ,	p.55
3.4.1	Soroaglutinação Rápida,	p.55
3.4.2	Inibição da Hemaglutinação,	p.56
3.4.2.1	Coleta e preparo de hemácias de aves,	p.56
3.4.2.2	Titulação do antígeno de <i>Mycoplasma gallisepticum</i> pelo teste de Hemaglutinação,	p.57
3.4.2.3	Teste de HI,	p.57
3.5	REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE PARA DETECÇÃO DE <i>Mycoplasma gallisepticum</i> ,	p.58
3.5.1	Extração do DNA,	p.58
3.5.2	Amplificação do DNA,	p.59
3.5.3	Eletroforese em gel de agarose,	p.60
3.6	ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA DE <i>Escherichia coli</i> ,	p.60
3.7	SOROTIPAGEM DAS ESTIRPES DE <i>Escherichia coli</i> ,	p.61
3.8	TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA DE ESTIRPES DE <i>Escherichia coli</i> ,	p.61
3.9	REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE PARA DETECÇÃO DO GENE <i>iss</i> em estirpes de <i>Escherichia coli</i> ,	p.62
3.9.1	Extração do DNA,	p.62

3.9.2	Amplificação do DNA	p.63
3.9.3	Eletroforese em gel de agarose	p.63
3.10	ANÁLISES ESTADÍSTICAS	p.64
4	RESULTADOS	p.65
4.1	AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES ANATOMOPATOLÓGICAS	p.65
4.1.1	Alterações macroscópicas	p.65
4.1.2	Alterações microscópicas	p.68
4.2	SOROLOGIA PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA <i>Mycoplasma gallisepticum</i>	p.71
4.2.1	Soroaglutinação Rápida	p.71
4.2.2	Inibição da Hemaglutinação	p.71
4.3	REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE PARA DETECÇÃO DE <i>Mycoplasma gallisepticum</i>	p.71
4.4	ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA DE <i>Escherichia coli</i>	p.71
4.5	SOROTIPAGEM DAS ESTIRPES DE <i>Escherichia coli</i>	p.72
4.6	TESTE DE SENSIBILIDADE ANTIMICROBIANA DE ESTIRPES DE <i>Escherichia coli</i>	p.72
4.7	Reação em Cadeia de Polimerase para detecção do gene <i>iss</i> em cepas de <i>Escherichia coli</i>	p.73
4.8	ANÁLISE DOS DADOS	p.75
5	DISCUSSÃO	p.76
6	CONCLUSÕES	p.78
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	p.79

INTRODUÇÃO

A carne de codorna tem oferta reduzida no mercado de carnes de aves. A utilização de linhagens específicas para corte e a exploração comercial podem aumentar a produtividade dos plantéis e melhorar as características sensoriais da carne, tornando o produto mais acessível.

A criação em grande escala, entretanto, pode predispor as codornas a um maior risco de doenças, principalmente as respiratórias. Apesar das diferentes linhas de defesa do trato respiratório, vários agentes conseguem se estabelecer, sendo de destaque os micoplasmas e a *Escherichia coli*.

Os micoplasmas que afetam as codornas são o *Mycoplasma gallisepticum* e o *Mycoplasma synoviae*. As doenças causadas por esses agentes são de notificação obrigatória aos órgãos de saúde animal, quando ocorrem em reprodutores, e a sua presença inviabiliza a produção e o comércio de aves e seus subprodutos, inclusive para o mercado internacional. Os micoplasmas são responsáveis também pelas aerossaculites que podem determinar elevados índices de condenação das carcaças, elevando o prejuízo dos produtores.

A *Escherichia coli* é um agente freqüente nos ambientes avícolas e é capaz de causar infecções no trato respiratório das aves pois, devido a sua dinâmica de patogenicidade, tem habilidade de colonizar o trato respiratório. Ao alcançar a circulação pode, ainda, afetar outros sítios. Possui a capacidade de se manifestar como um agente primário ou estar de forma concomitante com outros patógenos que acometem o trato respiratório das codornas, tal como os micoplasmas.

Os patótipos de *Escherichia coli* que causam doenças nas aves representam baixo risco de infecção para os seres humanos. As aves, no entanto, atuam como um reservatório de cepas, causadoras de importantes infecções entéricas ou extraintestinais em humanos ou servem como fonte de plasmídios que codificam fatores para a virulência e resistência. Esses

fatores podem ser trocados entre amostras presentes na microbiota normal por mecanismos de recombinação.

Os objetivos desse estudo foram: determinar a presença de *Mycoplasma gallisepticum* e *Escherichia coli* em traquéias e sacos aéreos de codornas aparentemente saudáveis e em codornas condenadas na linha de processamento; definir se esses agentes contribuem para a redução de peso e a presença de alterações anatomopatológicas no trato respiratório de codornas; demonstrar a susceptibilidade de *Escherichia coli* a antimicrobianos, a presença de isolados enteropatogênicos para humanos e seu potencial patogênico para codornas de corte através da presença do gene *iss*, que é considerado como um marcador de patogenicidade para as aves.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A CARNE DE CODORNA

No Brasil, o produto de codorna com maior aceitação entre os consumidores é o ovo. A carne de codorna, no entanto, ainda é considerada exótica e tem oferta reduzida no mercado. A falta de divulgação dos produtores e das empresas beneficiadoras é um dos obstáculos para o aumento do consumo. A produção ainda é pequena, tornando elevado o preço pago pelo consumidor. O consumo poderá aumentar à medida que aumentar o número de criadores, o que dependerá também da disponibilidade de linhagens de codornas especializadas para corte (informação verbal)¹.

No Brasil o efetivo de codornas alcançou, no período de 2001 a 2006, um crescimento de 19,23% no número de aves alojadas (Quadro 1). Desse número, entretanto, não é possível se distinguir a distribuição entre os setores de corte e postura (IBGE, 2007). O consumo de carne de codorna no país é muito difundido em algumas regiões do Nordeste. Entretanto, nas demais regiões do Brasil o interesse é pequeno, o que impede maior exploração da carne (MOREIRA, 2005).

¹Comunicação feita por Antônio Gilberto Bertechini em 20-03-2002 em entrevista concedida ao site www.avisite.com.br.

Tabela 1: Efetivo de codornas no Brasil e nas diferentes Unidades Federativas entre os anos de 2001 e 2006.

<i>ANO</i>	<i>BRASIL</i>	<i>NORTE</i>	<i>NORDESTE</i>	<i>SUDESTE</i>	<i>SUL</i>	<i>CENTRO-OESTE</i>
2001	6.045.342	143.720	906.646	3.446.147	1.220.811	327.991
2002	5.575.068	158.981	892.135	3.281.828	910.127	331.997
2003	5.980.474	96.421	29.147	3.555.166	1.125.149	324.365
2004	6.243.202	87.955	30.594	3.748.136	1.083.060	324.791
2005	6.837.767	83.455	30.381	4.150.327	1.150.597	307.406
2006	7.207.830	82.536	28.293	4.364.305	1.155.973	312.037

Fonte: Adaptado de IBGE (2007).

2.1.1 Sistemática do gênero *Coturnix*

A codorna é uma ave pertencente à superordem *Neognathae*, ordem *Galliforme*, família *Phasianidae*, subfamília *Phasianinae*, gênero *Coturnix* (BISCHOFF et al., 2007). Existem mais de 100 variedades, sendo as mais conhecidas a *Coturnix coturnix japonica*, ou codorna japonesa, e a *Coturnix coturnix coturnix*, ou codorna européia (PÉREZ, 1966).

2.1.2 Produção

Entre as muitas vantagens da codorna, destacam-se a sua grande rusticidade, maturidade sexual precoce (apenas 45 dias de vida), produtividade elevada (média de 300 ovos por ano) e grande fecundidade (o período de incubação de seus ovos é de apenas 16 dias) (VIEIRA, 1988).

A criação de codornas pode ser praticada sobre o solo, com o uso de “cama” feita com material absorvente, ou em baterias, utilizando-se gaiolas. A criação sobre o solo, além de mais econômica, permite o alojamento de um grande número de animais, cerca de 100 aves por m², e as aves apresentam plumagem mais perfeita. No entanto, há um maior risco de doenças e, além disso, as codornas, por possuírem maior espaço para os movimentos, gastam mais energia inutilmente e ingerem três a cinco por cento mais de ração, em relação à criação em baterias. As codornas podem ser criadas em gaiolas com compartimentos individuais ou coletivos, obedecendo a proporção de 100 a 200 aves por m² (PÉREZ, 1966). Ariki (2000)

citou, para poedeiras em galpão pinteiro, uma lotação de 50 aves/ m². Para codornas de corte, contudo, por apresentarem tamanho maior, recomenda-se uma densidade de 25 aves/m² (ALMEIDA, 2001).

A coturnicultura, voltada para a obtenção de carne, conta hoje com linhagens específicas provenientes da espécie *Coturnix coturnix coturnix*, mas alguns produtores ainda utilizam linhagens de postura - machos ou fêmeas da espécie *Coturnix coturnix japonica* descartadas no final do ciclo reprodutivo - para a exploração de carne. As codornas de postura, ou japonesas, geram animais com carcaça de qualidade inferior, de tamanho pequeno e carne dura (MOREIRA, 2005). A simples adoção de linhagens específicas para corte pode promover um rendimento até 70% maior em relação às linhagens de postura (ALMEIDA et al., 2002a). Correa et al. (2004) consideraram que existe interação entre o tipo de linhagem de codorna de corte, a idade de abate e o nível protéico da ração, e que essas variáveis têm, ainda, estreita correlação no que diz respeito aos custos da produção. Almeida et al. (2002b) compararam o desempenho de machos de codornas japonesas e européias e verificaram que o peso das codornas italianas foi maior desde o primeiro dia de idade, sendo superior ao das codornas japonesas, mas não detectaram interação entre genótipo e exigências nutricionais sobre o peso das aves. As codornas européias apresentaram menor consumo relativo de ração e melhor conversão alimentar, tornando os custos da produção menores, quando comparados com os custos da criação de codornas japonesas para o mesmo fim.

Ambos os sexos são utilizados para a exploração de carne. As fêmeas apresentam peso vivo 26% maior que os machos e, considerando-se apenas o peso da carcaça, essa superioridade cai para 12%. O maior peso das fêmeas se deve, inicialmente, ao maior peso das vísceras não comestíveis. A melhor idade de abate situa-se próximo aos 42 dias de vida. Após essa idade, com a maturidade sexual, as fêmeas aumentam o consumo de ração, para compensar o desgaste fisiológico representado pelo início da postura, enquanto os machos desenvolvem um comportamento competitivo violento, para determinar a dominância social, ocorrendo, com frequência, mutilações, caquexia e aumento da mortalidade (OLIVEIRA et al., 2005a).

2.1.3 Consumo e comercialização da carne de codorna

A coturnicultura conta hoje com uma grande empresa, a Perdigão, com abate em escala industrial e com o selo da Inspeção Federal. Utiliza-se de criação própria, sem o tradicional sistema de integração da criação de frangos. Com uma produção de mais de 80 toneladas mensais, a codorna está incluída na linha “Avis rara” da empresa e rende até R\$ 10,00 por quilo, inclusive já exportando para a Arábia Saudita (GESSULLI, 2002). O produto é comercializado em caixas contendo aproximadamente cinco carcaças de 200 gramas, congeladas, para consumo no varejo, e em sacos contendo 1,5 Kg e 2,5 Kg de carcaças congeladas.

2.1.4 Aspectos nutricionais e sensoriais da carne de codorna

Quando comparada às carnes de frango, bovina e suína, a carne de codorna é mais rica em ferro, fósforo, cobre, vitaminas C e A e proteínas (esta última abaixo apenas da carne de frango) (Quadro 2).

A carne de codorna caracteriza-se por sua suculência e sabor agradável, sendo bem aceita pelo consumidor (OLIVEIRA, 2005b). A suculência pode ser explicada pela rapidez do ciclo produtivo, visto que a ave é abatida no auge de seu desenvolvimento, perdendo essa característica quando o abate é feito após o período de reprodução. A carne procedente de poedeiras com mais de um ano de idade apresenta condições sensoriais inferiores, comparadas às de carnes de aves mais jovens (PÉREZ, 1966). Oliveira et al.(2005b) encontraram variações em relação ao aroma, sabor e cor, tendo influência do sexo. As fêmeas foram as portadoras das menores médias. Entretanto, todas as pontuações apresentaram-se acima dos percentuais considerados normais. Entre os 35 e 77 dias de vida a idade ao abate não teve efeito significativo sobre a maciez da carne.

Quadro 1: Teores nutricionais comparativos entre a carne de codorna, a carne de frango e as carnes bovina e suína.

Nutrientes	Peito de codorna sem pele (100g)	Peito de frango sem pele (100g)	Carne bovina magra (100g)	Carne suína magra (100g)
Calorias	123,00	110,00	278,00	120,00
Proteínas (g)	022,59	023,09	017,48	020,99
Gordura total. (g)	002,99	001,24	022,55	003,41
Cálcio (mg)	010,00	011,00	008,00	005,00
Ferro (mg)	002,31	000,72	001,85	001,23
Magnésio (mg)	028,00	028,00	017,00	026,00
Fósforo (mg)	228,00	196,00	156,00	226,00
Potássio (mg)	260,00	255,00	271,00	366,00
Sódio (mg)	055,00	065,00	059,00	050,00
Zinco (mg)	002,70	000,80	003,59	002,03
Cobre (mg)	000,43	000,04	000,07	000,05
Manganês (mg)	000,02	000,02	000,01	000,02
Selenio (mg)	018,80	017,80	015,90	028,90
Vit C (mg)	005,10	001,20	000,00	000,90
Tiamina (mg)	000,24	000,07	000,08	000,97
Riboflavina (mg)	000,24	000,09	000,17	000,28
Niacina (mg)	008,20	011,19	003,54	004,43
Vit B6 (mg)	000,53	000,55	000,33	000,52
Vit B12 (mcg)	000,47	000,38	002,69	000,81
Vit A (UI)	037,00	020,00	000,00	007,00
Ácidos graxos saturados (g)	000,87	000,33	009,16	001,18
Ácidos graxos monoinsaturados (g)	000,84	000,30	009,82	001,54
Ácidos graxos poliinsaturados (g)	000,77	000,28	000,86	000,37
Colesterol (mg)	058,00	058,00	074,00	065,00

Fonte: Adaptado de DIAB, 2007.

2.2 ASPECTOS ANATÔMICOS E FUNCIONAIS DO TRATO RESPIRATÓRIO DAS CODORNAS

O sistema respiratório das aves caracteriza-se pela presença de pulmões de estrutura relativamente rígida, que não se expande e retrai com a respiração. Sua função é a de fornecer uma superfície para as trocas gasosas com o sangue. Quem modula o volume de ar corrente são os sacos aéreos, estruturas extremamente finas que ocupam todo o espaço disponível no celoma, não ocupado por outras vísceras (FEDDE, 1998). Os sacos aéreos apresentam epitélio cuboidal ciliado próximo aos brônquios e, no corpo o epitélio se torna mais plano, com pequenos grupos de epitélio colunar ciliado formando pequenas “ilhas ciliadas” (FICKEN,

1997). Nas codornas, aves melhor adaptadas para o vôo do que, por exemplo, as galinhas, os sacos aéreos invadem o celoma de forma mais exuberante, estabelecendo franca comunicação com o sistema esquelético (PÉREZ, 1966).

O tamanho e a disposição dos sacos aéreos variam nas diferentes espécies aviárias. A maioria delas apresenta nove sacos aéreos, sendo um clavicular, dois cervicais, dois torácicos craniais, dois torácicos caudais e dois abdominais (FEDDE, 1998). Nas codornas existem ainda, além dos sacos aéreos já citados, um par de sacos aéreos axilares. Os sacos aéreos cervicais se prolongam em direção ao pescoço, desde a entrada do peito, comunicando-se com algumas vértebras cervicais; o clavicular ocupa o espaço entre o papo e o coração; os torácicos anteriores e posteriores terminam em divertículos secundários que pneumatizam ossos da cintura torácica e vértebras dessa região, e cobrem quase todo o espaço parietal pulmonar; os axilares são muito irregulares, para que se adaptem às proeminências que formam o cinturão escapular, e se comunicam com o forame pneumático do úmero. Por fim o saco abdominal se estende pela área lombo-sacral, pondo-se em contato, ao se expandir, com as gônadas, rins e numerosas alças intestinais. Nas codornas os sacos aéreos de maior desenvolvimento são os mais posteriores, precisamente os encarregados de pneumatizar os blocos mais volumosos do esqueleto e dar leveza às regiões de maior gravitação do corpo (PÉREZ, 1966).

Os pulmões se localizam na região torácica dorsal e apresentam três subdivisões brônquicas: brônquios primários (extra e intrapulmonares), brônquios secundários e brônquios terciários. Os brônquios primários se originam da traquéia, quando esta se bifurca próximo ao pulmão, sendo esta a porção extrapulmonar. Quando penetram nos pulmões os brônquios são denominados de brônquios primários intrapulmonares e logo depois de brônquios secundários (mediodorsais, medioventrais e lateroventrais) e brônquios terciários, ou parabrônquios, divididos em um pulmão compartimentado em paleopulmo e neopulmo (MACARI; GIVISIEZ, 2002).

Os brônquios primários são revestidos por epitélio ciliado com células de muco, os brônquios secundários por epitélio colunar alto ciliado, com poucas glândulas mucosas, inicialmente, que são substituídas por células caliciformes, e os brônquios terciários, que se originam dos brônquios secundários, formam massas de túbulos livremente anastomosados cobrindo todos os espaços do pulmão. Os parabrônquios possuem revestimento cuboidal escamoso não dotado de cílios (FICKEN, 1997).

Na inspiração um certo volume de ar passa através do neopulmo para dentro dos sacos aéreos caudais (torácicos caudais e abdominais), o restante do ar desloca-se através do

paleopulmo para dentro dos sacos aéreos craniais (clavicular, cervicais e torácicos craniais). Na expiração, o ar dos sacos aéreos caudais passa novamente no neopulmo e se desloca para o paleopulmo, na mesma direção, como durante a inspiração. O ar dos sacos aéreos craniais é lançado na atmosfera sem passar novamente pela superfície de trocas gasosas. Por essa descrição entende-se que o ar passa através do paleopulmo num movimento unidirecional (caudo-cranial) em ambos os ciclos respiratórios e é bidirecional no neopulmo (FURLAN, 2000).

2.3 MECANISMOS DE DEFESA DO TRATO RESPIRATÓRIO DAS AVES

A superfície do epitélio traqueal é coberta por muco e cílios que carreiam, rapidamente (10mm/min), possíveis partículas inspiradas para a faringe, onde podem ser engolidas e eliminadas nas fezes (MENSAH; BRAIN, 1982). Esta parte do sistema respiratório forma a primeira linha de defesa contra a inspiração de grandes partículas, com até 4 μm , mas não consegue captar muitas partículas menores que 0,2 μm (HAYTER; BESCH, 1974). O sistema macrofágico pulmonar representa a segunda linha de defesa do trato respiratório. Porém existe uma pequena quantidade de macrófagos residentes neste sistema. Sendo assim, estes não podem ser responsáveis pela manutenção da limpeza deste meio (FEDDE, 1998). Para Toth et al. (1988), quando substâncias quimiotáticas estão presentes, durante a presença de microrganismos, os macrófagos são rapidamente atraídos, apresentando forte reação fagocítica. Macari e Givisiez (2002) relataram que, diante da pequena presença de macrófagos no tecido pulmonar outras células podem agir como substitutas deste tipo celular, removendo o material estranho na região dos parabronquios.

2.4 IMPORTÂNCIA DAS DOENÇAS RESPIRATÓRIAS NA PRODUÇÃO AVÍCOLA

O trato respiratório das aves é um dos principais sistemas afetados por doenças infecciosas. Os sacos aéreos são muito susceptíveis a danos e como resposta tornam-se mais espessos, infiltrados por células inflamatórias e exsudatos, caracterizando a aerossaculite (CASTRO, 2000). Pela dinâmica respiratória das aves, as doenças respiratórias comumente

causam aerossaculites, que são motivo de descarte ao abate (MACARI; GIVISIEZ, 2002). Russel (2003) descreveu que a presença de aerossaculite tem um impacto negativo sobre o peso das aves destinadas ao abate. Em seu estudo, frangos de corte apresentaram perdas de até 84g/carcaça e a desuniformidade dos lotes contribuiu para um aumento nos casos de erros durante o processamento, principalmente durante a evisceração, aumentando o risco de contaminação das carcaças com patógenos do trato intestinal. As contagens de *Escherichia coli* foram significativamente maiores nas aves com aerossaculite do que nas aves sem aerossaculite. No Brasil, o Serviço de Inspeção Sanitária, baseado na Portaria n.º 210 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (BRASIL, 1998), prevê que em presença de aerossaculite deve haver a condenação total de vísceras comestíveis e a condenação total de carcaças quando ocorrer o envolvimento extenso dos sacos aéreos ou comprometimento sistêmico. As carcaças menos afetadas podem ser rejeitadas parcialmente, após a remoção e condenação completa de todos os tecidos envolvidos com a lesão. Nessa mesma Portaria, encontra-se descrito que a colibacilose, compreendida entre os processos inflamatórios, também pode ocasionar a condenação parcial de partes afetadas ou condenação total, se houver comprometimento sistêmico. Armendaris (2006) relata que, de 3.514.573.349 aves abatidas no ano de 2005, as aerossaculites foram responsáveis por 4.552.240 casos de condenações parciais e 796.967 de condenações totais, sendo a sexta causa de condenação entre os principais achados patológicos nesse mesmo ano.

Mead (2004) considerou que mesmo as aves aparentemente sadias são importantes no contexto da Saúde Pública, pois continuam sendo reservatórios de agentes zoonóticos e que o uso de antimicrobianos, mesmo usados de forma preventiva ou para melhoria de performance produtiva, contribuem para o desenvolvimento de resistência de microrganismos patogênicos para o Homem.

2.5 MICOPLASMOSE E COLIBACILOSE EM CODORNAS

Apesar das diferentes linhas de defesa, que evitam a instalação de vários agentes infecciosos, alguns fatores inerentes ao hospedeiro, ao agente ou ao manejo sanitário podem comprometer as barreiras primárias e afetar o sistema respiratório. Alguns agentes infecciosos, mesmo que inativados, como os utilizados durante as vacinações, podem causar descamação e perda dos cílios do epitélio traqueal, favorecendo a instalação de agentes

secundários (SANTIN et al., 2003). A interação de dois ou mais patógenos pode ser, além de sinérgica, antagônica, modificando o curso e a resposta aos agentes, dependendo da ordem de exposição. Segundo El Tayeb e Hanson (2002), a inoculação prévia do vírus da doença de Newcastle em um cultivo celular acentuou a aderência de *Escherichia coli*, caracterizando o sinergismo, e a inoculação prévia de *Escherichia coli* pela via oral, em galinhas de oito semanas de idade, determinou títulos virais menores, caracterizando desta vez o antagonismo entre os dois agentes. Minharro et al. (2001) estabeleceram uma elevada frequência de *Escherichia coli* e micoplasmas (*Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma synoviae*), sozinhos ou associados entre si, envolvidos com a presença de aerossaculite em frangos. Condições desfavoráveis do meio ambiente, como altas concentrações de amônia e poeira, associados à presença de agentes infecciosos no ambiente, também podem predispor as aves às doenças respiratórias (DAVIS; MORISHITA, 2005).

2.5.1 Micoplasmose

2.5.1.1 Taxonomia e espécies de interesse para a coturnicultura

A micoplasmose é uma enfermidade causada por bactérias da classe *Mollicutes* (do latim *Mollis* = macio e *cutis* = pele), que caracteriza agentes que não apresentam parede celular. Devido a essa característica, esses agentes podem se apresentar de várias formas, sendo a esférica a forma predominante (RAZIN et al., 1998). Bier (1984) descreveu que a forma pode variar conforme o estágio de desenvolvimento e o meio em que se encontram os agentes. Nos meios líquidos apresentam-se como corpúsculos esféricos e filamentosos ou em forma de anel. Nos meios sólidos predominam os grânulos de densidade variável. As formas arredondadas apresentam diâmetro entre 0,3 a 0,8 µm e as formas filamentosas pouco mais de 150 µm de comprimento. Em relação ao tamanho, Nascimento (2000) comparou os micoplasmas aos grandes vírus.

Normalmente esses agentes são imóveis. São aeróbios facultativos e suas colônias são muito pequenas, medindo menos de 1 mm de diâmetro e que, sob condições adequadas, têm a aparência de “ovo frito” (HOLT et al., 1994). Pertencem à ordem *Mycoplasmatales* e incluem-se na família *Mycoplasmataceae* devido ao requerimento de colesterol para seu

crescimento, ao tamanho do genoma (entre 600 e 1350kbp) e por terem o homem e os animais como *habitat*. A divisão em gêneros é feita de acordo com seus mecanismos para obter energia (WHITFORD et al., 1994). A fermentação de carboidratos é variável, mas as espécies podem ser divididas entre aquelas que fermentam a glicose, com produção de ácido, e aquelas que não o fazem. A glicose é adicionada ao caldo nutriente para acentuar o crescimento das espécies fermentadoras e promover a mudança da cor de meios de cultivo em que se utiliza vermelho de fenol como indicador. Muitas espécies que não fermentam a glicose usam o aminoácido arginina como fonte de energia. Outras espécies fermentam a glicose e utilizam a arginina (KLEVEN, 2003a). Nascimento (2000) relatou que as espécies de interesse para as codornas são a *Mycoplasma gallisepticum* e a *Mycoplasma synoviae*, que fermentam a glicose, não hidrolizam a arginina, e não produzem fosfatase.

Os micoplasmas patogênicos têm predileção pelas mucosas respiratória, ocular e genital, estabelecendo infecções superficiais persistentes (WHITFORD et al., 1994). A habilidade em causar infecções é dependente da propriedade de adesão dos micoplasmas à célula hospedeira, que os torna capazes de se fixarem às membranas mucosas (ATHAMNA et al., 1997; BASEMAN et al., 1982), da capacidade de se evadir da ação das imunoglobulinas (LAUERMAN; REYNOLDS-VAUGHN, 1991), da presença de toxinas (GABRIDGE et al., 1972) e da estimulação de citocinas do hospedeiro, determinando a ocorrência de lesões celulares (FAULKNER et al., 1995). Lockaby et al. (1999a) afirmaram que, além dos fatores de virulência, a interação com fatores ambientais acentua a ação das amostras virulentas.

2.5.1.2. Micoplasmose na coturnicultura

Os principais relatos de micoplasmose em codornas se devem à presença de *Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma synoviae* (NASCIMENTO, 2000). Kleven (2003a) relatou que *Mycoplasma gallisepticum* é a causa primária de doenças respiratórias e que *Mycoplasma synoviae* é responsável tanto por doenças respiratórias quanto pela presença de sinovites.

A patogenicidade dos micoplasmas tem relação com a estirpe envolvida (LOCKABY et al., 1999a) e seus fatores de virulência (LOCKABY et al., 1999b). Kleven (2003a) mencionou que esses agentes têm a tendência de interagir com outros microrganismos do trato respiratório, como o vírus da doença de Newcastle e com bactérias como a *Escherichia coli*,

sendo esta última interação conhecida como Doença Crônica Respiratória (DCR). Sem a intervenção de outros agentes, *Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma synoviae* podem causar infecções brandas ou até subclínicas.

Nascimento et al. (1998) descreveram pela primeira vez, no Brasil, a presença de *Mycoplasma synoviae* em codornas. As aves apresentaram dificuldades respiratórias, acompanhadas de edema de face e articulações, queda na postura e aumento da mortalidade. Macroscopicamente foram observados líquido viscoso e incolor nas articulações e material caseoso na região periorbital.

Sinais de doença respiratória em criações de codornas, causadas exclusivamente por *Mycoplasma gallisepticum*, têm sido descritas e se caracterizam por dificuldade respiratória, sinusite, edema dos seios infraorbitais e aumento das taxas de mortalidade (NASCIMENTO; NASCIMENTO, 1986; TIONG, 1978; TÜRKYILMAZ et al., 2007). Murakami et al (2002) relataram os mesmos sinais clínicos em codornas, acompanhados por queda na produção de ovos. Nesse relato a infecção era mista e envolvia a presença de *Mycoplasma gallisepticum*, o protozoário *Cryptosporidium baileyi*, as bactérias *Pasteurella multocida*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp., além de elevado nível de amônia no ambiente de criação. Nesse surto também foi descrita queda na produção de ovos. Tiong (1978) descreveu queda na produção de ovos acompanhada por alteração na sua qualidade externa, caracterizada pela presença de casca mole e despigmentada, em casos de micoplasmose causados exclusivamente por *Mycoplasma gallisepticum*, além de paralisia de membros.

As lesões mais freqüentes causadas por *Mycoplasma gallisepticum*, descritas em codornas, são caracterizadas pela presença de material caseoso ou mucóide nos seios infraorbitais (NASCIMENTO; NASCIMENTO, 1986; TIONG, 1978), formação de exsudato catarral na traquéia e aerossaculite (TÜRKYILMAZ et al., 2007). Tiong (1978) relatou a presença de atrofia ovariana. Nascimento e Nascimento (1986) citaram a ocorrência de lesões hemorrágicas discretas na moela e hemorragia difusa nos pulmões e cérebro, entretanto, esses casos apresentavam concomitância com outros microrganismos. Murakami et al. (2002) encontraram as mesmas alterações características, como: exsudato mucoso nos seios infraorbitais, aerossaculite, material caseoso nas cavidades nasais e peritonite. Microscopicamente, Ley (2003) descreve como alterações freqüentes o espessamento das membranas mucosas dos tecidos afetados, devido à infiltração por células mononucleares, e a hiperplasia das glândulas mucosas. Murakami et al. (2002) relataram que as lesões em codornas ocorrem com maior freqüência na conjuntiva e na região superior do trato

respiratório, ocorrendo perda dos cílios das células epiteliais e hiperplasia com vacuolização citoplasmática nas células traqueais. Na submucosa há acúmulo de infiltrados linfocíticos.

2.5.1.3 Diagnóstico

Nascimento (2000) cita que a análise de dados epidemiológicos, como período de incubação, índices de morbidade e mortalidade e parâmetros produtivos, como ganho de peso e número de ovos postos, assim como a análise das lesões macro e microscópicas, devem ser associados aos exames laboratoriais. Steinlage et al. (2003) relataram ausência de lesões macro e microscópicas em aves que apresentavam sinais de doença respiratória e sorologia e isolamento positivos para *Mycoplasma gallisepticum*.

2.5.1.3.1 Diagnóstico sorológico

A sorologia é um método laboratorial que visa ao estudo e à mensuração do nível de anticorpos no soro das aves expostas a determinado antígeno. Além da detecção de doenças, os testes sorológicos também se prestam ao conhecimento dos parâmetros de normalidade dos lotes, à comprovação da eficácia das vacinações e ao ajuste e elaboração de programas de vacinação (SANTOS; SILVA, 2000). No Brasil, o Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA), através da Instrução Normativa nº44, de 23 de agosto de 2001, do MAPA (BRASIL, 2001), determina, para aplicação em estabelecimentos avícolas de reprodução, a utilização da Soroaglutinação Rápida (SAR) e os testes denominados de Inibição da Hemaglutinação, conhecido por sua sigla HI, do inglês “Haemagglutination inhibition” e o ELISA, do inglês “Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay”.

A SAR é um método rápido e de baixo custo que se baseia na capacidade de os anticorpos se ligarem a antígenos específicos. Essa ligação faz surgir uma reação visível à olho nu, devido ao uso de antígenos corados (FREIRE, 1988). Segundo Santos e Silva (2000), as diferentes classes de anticorpos (imunoglobulinas) diferem entre si em sua capacidade de promover a aglutinação. A imunoglobulina M (IgM), por sua configuração pentamérica, é a classe que tem maior capacidade de se aglutinar aos antígenos específicos. A maioria dos

anticorpos detectados na SAR pertencem à classe IgM (FREIRE,1988). A formação da rede de aglutinação ocorre apenas quando há uma zona de equivalência entre antígenos e anticorpos. Entretanto, se houver um excesso de um ou de outro componente, a aglutinação é inibida e uma reação imunológica visível não será detectada (MADRUGA et al, 2001; SANTOS; SILVA, 2000). Se o soro proveniente de uma ave, depois de diluído, apresentar reação igual ou superior a 1:10, o resultado é considerado positivo, sendo considerado suspeito à diluição de 1:5 e negativo, se ocorrer somente em soro não diluído (NASCIMENTO, 2000).

O teste de HI fundamenta-se na capacidade de alguns microrganismos apresentarem, em sua superfície, estruturas capazes de se combinarem com receptores específicos, presentes nas hemácias. Tais estruturas são denominadas de hemaglutininas. É um teste qualitativo e quantitativo que mede, principalmente, imunoglobulinas da classe IgG (SANTOS; SILVA, 2000). O teste de HI é considerado positivo quando o título obtido for igual ou superior a 1:40, suspeito se ocorrer entre 1:20 a 1:40 e negativo se for inferior a 1:20. Estes resultados são os obtidos para galinhas (NASCIMENTO, 2000).

O ELISA é um teste de marcação primária que, nos testes sorológicos, serve para detectar e quantificar os anticorpos. Uma superfície é usada como suporte inerte para a adsorção de moléculas antigênicas, sobre o qual se adiciona o soro a ser testado. Sobre o complexo formado adiciona-se antiglobulina conjugada a uma enzima e esse conjugado se liga ao complexo antígeno-anticorpo. A presença de anticorpos é detectada pela adição de um substrato, específico para a enzima utilizada, e de uma substância cromogênica. Da reação enzima-substrato, desenvolve-se um produto colorido. A intensidade da cor é proporcional à concentração de anticorpos (FREIRE, 1988). Chirinos et al (2000) determinaram que, comparado ao HI, o ELISA foi mais sensível e específico para a detecção de anticorpos contra *Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma synoviae* em galinhas. A antiglobulina utilizada no conjugado é anti-espécie (SANTOS; SILVA, 2000). Oliveira et al (2007) relataram que não existe um conjugado comercial anti- IgG de codorna, e que a inexistência de um teste de ELISA específico para codornas tem motivado os centros de diagnóstico a utilizarem “kits” comerciais de ELISA, empregados para ensaios com soros de galinhas, sem a devida validação. Devido a isso, padronizaram um ELISA para a detecção de IgG específicas para o vírus da doença de Newcastle em codornas. Türkyilmaz et al. (2007), comparando a sensibilidade entre os testes de ELISA, o HI e a SAR, para a detecção de anticorpos contra micoplasmas em codornas, obtiveram como resultado uma maior sensibilidade no ELISA (85% - 17/20), seguido pelo HI (50% - 10/20) e a SAR (10% - 2/20). Feberwee et al. (2005)

divulgaram um grande percentual de amostras falso positivas ao utilizarem a SAR e o ELISA para a detecção de *Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma synoviae* em galinhas, e aconselham o uso de várias provas para a detecção dos micoplasmas aviários.

A resposta humoral típica de uma ave começa com a produção de IgM. Após algum tempo, a produção de IgM se modifica em função da produção de IgG (SHARMA, 2003). Os testes sorológicos detectam, com maior ou menor eficiência, as diferentes classes de anticorpos. A SAR detecta imunoglobulinas da classe IgM que aparecem entre três e cinco dias após a infecção por micoplasmas e a IgG é demonstrada pelo HI sete a dez dias após o início das infecções (NASCIMENTO, 2000). Feberwee et al (2005) relataram um percentual crescente no nível de anticorpos específicos para *Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma synoviae*, na SAR, entre o sétimo e o décimo quarto dia, com um maior percentual no 14º dia e queda a partir do 21º dia. A detecção de anticorpos através do HI teve início 14 dias após a infecção.

As amostras de soro sanguíneo, destinadas ao diagnóstico imunológico, deverão ter o volume mínimo de 0,5 mL e estar conservadas a aproximadamente 4°C, por um período não superior a três dias ou por um período de 30 dias, se mantidas a -20°C (BRASIL, 1994).

2.5.1.3.2 Isolamento em meios de cultivo

Devido à presença de reações cruzadas inespecíficas nos exames sorológicos, apenas o diagnóstico micoplasmológico é considerado conclusivo para a detecção da presença dos micoplasmas em um lote (BRASIL, 2001). A prova considerada padrão para o diagnóstico das micoplasmoses é o isolamento do agente causal em meios de cultivo apropriados (LEY, 2003). Os micoplasmas são organismos fastidiosos que requerem meios de cultivo específicos e complexos. Uma modificação do meio de Frey suporta o crescimento de todos os micoplasmas aviários conhecidos, sendo o meio de preferência para o isolamento desses agentes (WHITFORD et al., 1994). As espécies de fontes aviárias geralmente requerem um meio rico em proteínas, contendo 10 a 15% de soro animal. Tendem a crescer vagarosamente, com suas colônias se formando de três a dez dias após a semeadura do meio de cultivo, e necessitam de temperaturas entre 37 e 38°C. Colônias de amostras não patogênicas, como *Mycoplasma gallinarum* e *Mycoplasma gallinaceum*, contudo, podem ser formadas em um dia (KLEVEN, 2003a).

Embora testes bioquímicos possam ser usados para a identificação das espécies, os isolados são comumente identificados através de testes como a imunofluorescência, imunoperoxidase e a inibição do crescimento, utilizando-se soros hiperimunes (WHITFORD et al, 1994).

Para o isolamento de micoplasmas, Nascimento (2000) recomendou a coleta de fragmentos de tecidos lesionados, exsudato sinovial e ocular, além de suabes de traquéia, sacos aéreos, líquido sinovial e exsudato dos seios nasais, que devem ser imersos em meio de Frey líquido. Segundo a Portaria nº 208 de 20 de dezembro de 1994 do MAPA (BRASIL, 1994) o material destinado ao exame micoplasmológico, contendo pequenas porções de tecidos ou suabes, deverão ser submersos imediatamente em caldo para o micoplasma suspeito. O transporte deve ser feito sob refrigeração a aproximadamente 4°C e as amostras deverão ser conservadas, sob a mesma temperatura, por não mais que 24 horas.

2.5.1.3.3 *Detecção de micoplasmas através da técnica da Reação em Cadeia de Polimerase*

A Reação em Cadeia de Polimerase (em inglês “Polymerase Chain Reaction” - PCR), é usada para amplificar um segmento de DNA que se encontra entre duas regiões de seqüência conhecida. Dois oligonucleotídeos são usados como iniciadores (“primers”) para uma série de reações sintéticas catalizadas por enzimas. Essas reações fazem a amplificação de um segmento específico do genoma do agente, permitindo a obtenção de várias cópias desse segmento a um nível que possa ser facilmente detectado por eletroforese em gel de agarose. Antes da amplificação, no entanto, o DNA é desnaturado e o “primer” é anelado. Esse ciclo (desnaturação-anelamento-extensão) é repetido várias vezes, permitindo a amplificação exponencial daquela seqüência específica. A detecção de determinado agente é indicada pela formação de um produto de amplificação de tamanho definido, corado e visualizado sob luz ultravioleta (SAMBROOK et al., 1989).

Para a identificação de micoplasmas vários métodos, baseados na amplificação de diferentes genes, são utilizados. Garcia et al (2005) avaliaram quatro desses métodos, baseados na amplificação dos gene 16S rRNA, *mgc2*, *nLP* e *ngapA*. O sistema 16S rRNA amplificou o DNA de *Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma imitans* e os outros sistemas amplificaram apenas o DNA do *Mycoplasma gallisepticum*.

A PCR para detecção de *Mycoplasma gallisepticum* foi desenvolvida pela primeira vez por Nascimento et al. (1991), sendo uma alternativa ao cultivo, pois, excluindo-se o valor dos equipamentos, é considerada de baixo custo e de rápida execução. Marois et al. (2002) estudaram a persistência dos micoplasmas no meio ambiente e sua capacidade de disseminação por meio da transmissão indireta, através do isolamento em meios de cultivo e da PCR. A detecção de micoplasmas através do cultivo foi menos eficiente (6/160) do que a PCR (103/160), sendo possível o uso desse método para análises epidemiológicas e controle da higienização dos galpões antes da introdução de um novo lote em um galpão.

2.5.1.4. Tratamento e controle

A infecção pelos micoplasmas é passível de tratamento utilizando-se antimicrobianos como: tetraciclina, tilosina e fluoroquinolonas (LEY, 2003). Devido à falta de parede celular os micoplasmas são resistentes aos antimicrobianos que têm ação sobre essa estrutura (NASCIMENTO et al., 2005).

O tratamento com antimicrobianos reduz as taxas de mortalidade, a severidade das manifestações clínicas e as lesões causadas por estirpes patogênicas de micoplasmas, mas causam declínio ou ausência da resposta sorológica e da taxa de isolamento, devido à localização intracelular do micoplasma, não havendo reconhecimento do sistema imunológico do hospedeiro. Jordan et al. (1998) estudaram as concentrações inibitórias mínimas, capazes de inibir o crescimento de *Mycoplasma gallisepticum in vitro* e *in vivo*, da valnemulina, tiamulina, tilosina, enrofloxacina e lincomicina, e apontaram a valnemulina como a mais eficaz para o tratamento das micoplasmoses em aves, seguida pela tiamulina, tilosina e enrofloxacina. Nesse estudo os testes sorológicos por aglutinação refletiram a frequência dos isolados, exceto quando foram utilizados soros de aves tratadas com enrofloxacina ou tilosina.

A presença de infecções inaparentes, aliada às diversas formas de transmissão dos micoplasmas – formas vertical, horizontal e venérea – torna difícil o controle da disseminação a lotes não infectados. Devido às severas consequências epidemiológicas da transmissão vertical, o controle das micoplasmoses deve ser direcionado para as aves reprodutoras. O monitoramento periódico, através de provas sorológicas, pode auxiliar a detecção de lotes contaminados e prevenir a transmissão para a progênie (LEY, 2003). No Brasil, o PNSA, através da Instrução Normativa nº 44, de 23 de agosto de 2001 do MAPA (BRASIL, 2001),

determina, para aplicação em estabelecimentos avícolas de reprodução, a utilização da SAR para a triagem dos lotes quanto à presença de *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae* e *Mycoplasma meleagridis*, sendo este último apenas em perus. Quando houver resultado positivo perante a SAR os lotes devem ser testados através dos testes de HI e ELISA.

Em decorrência das perdas econômicas causadas pela micoplasmose, intensos esforços devem ser feitos para seu controle e erradicação. Além da terapia com antimicrobianos, medidas adequadas de manejo e desinfecção e vacinações podem ser aplicadas para minimizar os efeitos adversos da doença. Fiorentin et al (2003) conseguiram erradicar *Mycoplasma synoviae* em galinhas reprodutoras após a utilização intensiva de fluoroquinolonas, aliado a medidas adequadas de biossegurança. que, contudo, foram direcionadas inicialmente para o tratamento de peritonites causadas pela *Escherichia coli*.

Correntemente, estão disponíveis no mercado vacinas vivas e inativadas, para o controle da micoplasmose causada por *Mycoplasma gallisepticum*. No Brasil, não existe vacina viva contra *Mycoplasma synoviae* (NASCIMENTO et al., 2005). O PNSA, através da Instrução Normativa nº 44, de 23 de agosto de 2001 do MAPA (BRASIL, 2001) proíbe a utilização de vacina, de qualquer natureza, contra as micoplasmoses em aves de reprodução. De acordo com Carpenter et al. (1981), as cepas de *Mycoplasma gallisepticum* mais utilizadas para vacinas vivas são a MG ts11, MG-6/86 e MG-F, que provocam imunidade prolongada e têm comprovada eficácia contra a queda na produção de ovos. Ley et al. (1997) estabeleceram que quanto maior o tempo de sobrevivência da vacina em um plantel, maior a chance de transmissão para aves não vacinadas, o que é útil na substituição de cepas selvagens, auxiliando na erradicação do agente nos plantéis.

2.5.1.5. Importância das micoplasmoses para a coturnicultura

Os micoplasmas são amplamente distribuídos no mundo e as doenças causadas pelo *Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma synoviae* constam da lista de doenças notificáveis do “Office International des Epizooties” (OIE) que, embora mantida a mesma sigla, é denominada Organização Mundial de Saúde Animal (OIE, 2007a). No Brasil os últimos surtos de micoplasmose foram relatados até o segundo semestre de 2006, conforme dados

apresentados no quadro 3. No mundo, surtos foram notificados até o primeiro semestre de 2007, de acordo com os dados apresentados no quadro 4 (OIE, 2007b).

Tabela 2: Últimos surtos de micoplasmose no Brasil, causados por *Mycoplasma gallisepticum* (MG) e *Mycoplasma synoviae* (MS), notificados à OIE.

2006*						
Meses	MG		MS			
	Santa Catarina	São Paulo	Santa Catarina	Rio Grande do Sul	Pernambuco	Bahia
Jan	04	-	-	03	07	-
Fev	01	-	-	-	02	-
Mar	-	34	-	02	-	-
Abr	-	34	-	01	06	-
Mai	-	-	-	03	-	-
Jun	-	-	-	04	01	-
Jul	-	-	-	02	01	-
Ago	-	-	-	01	-	-
Set	-	03	-	-	-	01
Out	-	-	-	02	-	-
Nov	-	11	-	-	-	-
Dez	-	52	2	-	-	-

Fonte: Adaptado de OIE, 2007b.

* No ano de 2007 não foram registrados surtos.

As micoplasmoses em codornas são tão importantes quanto para outras explorações avícolas. Mas as características ainda rústicas de algumas criações podem inviabilizar a produção, pois, além das doenças aparentes, os micoplasmas são responsáveis, mais comumente, por infecções subclínicas, podendo causar o declínio de importantes índices zootécnicos como conversão alimentar, número de ovos postos, incubabilidade e peso das carcaças (NASCIMENTO, 2000).

Tabela 3: Surtos de micoplasmose causados por *Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma synoviae* nas diferentes regiões do mundo, entre os anos de 2006 e 2007.

MG			MS		
Regiões	2006	2007	Regiões	2006	2007
África	080	044	África	050	15
Américas	155*	009	Américas	036**	-
Ásia	036	007	Ásia	002	-
Europa	002	-	Europa	-	-
Oceania	-	-	Oceania	-	-

Fonte: Adaptado de OIEb.

*Incluindo os 139 casos ocorridos no Brasil.

**Todos ocorridos no Brasil.

A presença de aerossaculites em codornas infectadas por micoplasmas, conforme citado por Türkyilmaz et al. (2007), pode causar prejuízos, visto que, de acordo com o Regulamento Técnico da Inspeção Tecnológica e Higiênico-Sanitária de carne de aves (BRASIL, 1998), há citação de que a presença de aerossaculites determina a condenação parcial ou total das carcaças.

Além das implicações negativas à produtividade, a presença desses agentes em empresas certificadas impossibilita o comércio de aves e seus produtos, gerando o sacrifício dos núcleos e a destruição dos ovos provenientes de aves contaminadas (BRASIL, 2001).

2.5.2 Colibacilose

2.5.2.1 Taxonomia

A colibacilose é uma infecção localizada ou sistêmica, causada inteiramente ou em parte por bactérias da espécie *Escherichia coli* (BARNES et al., 2003). A *Escherichia coli* contribui não só para a doença em si, mas também como agente sinérgico quando associada a outros agentes (EL TAYEB; HANSON, 2002).

O gênero *Escherichia* pertence à família *Enterobacteriaceae* e é composto por bacilos Gram negativos, medindo 1,1-1,5 µm de largura e 2,0-6,0 µm de comprimento, sendo anaeróbios facultativos. Nessa família encontram-se gêneros pertencentes a microbiota do trato intestinal dos animais e do Homem, de forma comensal ou patogênica (HOLT et al., 1994). O gênero *Escherichia* compreende as espécies *Escherichia blattae*, *Escherichia fergusonii*, *Escherichia hermannii* e *Escherichia coli*, sendo esta última a única potencialmente patogênica (TRABULSI; TOLEDO, 1991). Souza (2006) cita ainda a existência das espécies *Escherichia adecarboxylata* e *Escherichia vulneris*.

2.5.2.2 Colibacilose na coturnicultura

Nos mamíferos, muitas doenças causadas por estirpes patogênicas de *Escherichia coli* são de caráter gastroentérico, enquanto que nas aves as doenças são de caráter extraintestinal (BARNES et al., 2003). O agente da colibacilose causa nas aves quadros como: colisepticemia, peritonite, pneumonia, aerossaculite, pericardite, celulite, coligranuloma, panoftalmite, onfalite, salpingite, ooforite, osteomielite e sinovite (FERREIRA; KNÖBIL, 2000).

Em codornas, várias formas de colibacilose foram descritas. Arenas et al. (1999) descreveram um surto de septicemia em codornas em que o único agente era a *Escherichia coli*. As aves não apresentaram sintomas respiratórios, mas houve uma alta mortalidade em quatro dias (90%) e, macroscopicamente, havia congestão generalizada, esplenomegalia e edema da mucosa duodenal. Silva et al. (1989) relataram, no Brasil, a ocorrência de coligranuloma em codornas causado por cepas de *Escherichia coli*. Murakami et al. (2002) descreveram um quadro de doença respiratória com o envolvimento de agentes concomitantes. Burns et al. (2003) citaram, pela primeira vez, a presença de celulite causada por *Escherichia coli* em codornas destinadas para corte, associando os casos ao aumento na densidade populacional dos galpões. Roy et al. (2006) relacionaram o aumento da incubabilidade, da mortalidade embrionária e da mortalidade de codornas de um dia à presença de cepas patogênicas de *Escherichia coli*.

2.5.2.3 Diagnóstico

Escherichia coli cresce bem em ágar sangue e ágar MacConkey, que são usados rotineiramente em seu isolamento. A combinação do comportamento das amostras em ágar MacConkey, ágar três açúcares e ferro (em inglês Triple Sugar Iron - TSI) e caldo lisina descarboxilase pode ser útil na identificação presuntiva, não havendo dúvidas de que uma série de testes bioquímicos é necessária para caracterizar o agente de forma definitiva, sendo recomendado o Sistema API 20E que, embora consuma menos tempo, é mais dispendioso (QUINN et al., 1998). Para alguns propósitos, a morfologia colonial em meios diferenciais ou seletivos, e as características morfotintórias do microrganismo se prestam à identificação presuntiva. Em outros casos, um número significativo de testes bioquímicos é necessário para a distinção das amostras, tais como a produção de ácidos a partir de carboidratos e/ou a determinação de enzimas específicas. Segundo Varnam e Evans (1996), em uma situação em que se necessita distinguir somente um organismo alvo, é possível restringir o número de testes bioquímicos. Toledo et al. (1982a) propuseram um meio, denominado de Motilidade Indol Lisina (MILi), para a diferenciação de enterobactérias, que promove em um só tubo a caracterização de informações sobre os testes de motilidade, produção de indol e lisina descarboxilase, o qual apresentou 99,9% de concordância com meios convencionais e Toledo et al. (1982b) propuseram um meio, denominado de meio de Rugai e Araújo modificado, para a determinação de enterobactérias, denominado de EPM, que também promove em apenas um tubo a produção de gás, a partir da glicose, de H₂S, urease e triptofano desaminase, com 94,3% de concordância com meios convencionais.

2.5.2.4 Tratamento e controle

Escherichia 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 *Escherichia coli* é eliminada constantemente através das fezes (ELFADIL et al., 1996). A existência de insetos, como o *Alphitobius diaperinus*, servindo como vetores mecânicos tem sido relacionada 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). Ferreira e Knöbil (2000) afirmaram que a utilização de probióticos pode diminuir a eliminação de estirpes patogênicas para o ambiente de criação. Tamehiro et al. (2005) observaram uma redução na mortalidade, em um lote de codornas inoculadas experimentalmente com cepas patogênicas de *Escherichia coli*, após a suplementação da ração com vitamina E, embora não tenham conseguido diminuir a presença de lesões causadas pelo agente.

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). Roy et al. (2006) detectaram em casos de colibacilose em codornas 100% de resistência a múltiplos fármacos como: ampicilina/cloxacilina, cloranfenicol, tetraciclina e cotrimoxazol. *Escherichia coli* resistente a antimicrobianos foi detectada em carne de aves vendidas no varejo, com presença de maior resistência ao ácido nalidíxico e a ciprofloxacina (JOHNSON et al., 2005).

2.5.2.5 Importância da colibacilose para a coturnicultura

Nas aves, a colibacilose inicia-se no epitélio traqueal, em contraste com a maioria das doenças causadas pela *Escherichia coli* em humanos e outros mamíferos, afetados inicialmente no epitélio intestinal e urinário (VIDOTTO et al., 1997). Gazdzinski e Barnes (2004) revelaram que lesões predisponentes nos tecidos podem exacerbar a ação de cepas de *Escherichia coli* não patogênicas. Pourbakhsh et al. (1997) afirmaram que, dependendo de fatores inerentes ao hospedeiro, como “status” imunológico ou ocorrência de alterações microscópicas no trato respiratório superior, ou do agente, como fatores de adesão ou dose infectante, os mecanismos de defesa do trato respiratório superior não são capazes de bloquear a multiplicação de *Escherichia coli*. O agente, então, pode colonizar a traquéia, multiplicar-se e causar doença respiratória. Uma vez que a região capilar do pulmão é uma

importante via de microrganismos, como a *Escherichia coli*, para a corrente sangüínea, a infecção pode ocorrer em outros órgãos.

As doenças respiratórias, freqüentes entre as alterações causadas pela *Escherichia coli*, determinam as aerossaculites, que são causas freqüentes 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 pela Inspeção Sanitária (BRASIL, 1998), processos inflamatórios constantemente implicados com a *Escherichia coli* (artrites, celulites, dermatites e salpingites) são listados como causas de condenação parcial ou total.

As codornas podem ser ainda reservatórios de amostras de *Escherichia coli*, que são capazes de trocar entre si, através do fenômeno da conjugação, fatores que tornam as bactérias da microbiota intestinal do consumidor de sua carne mais virulentas e resistentes a múltiplos antibióticos (SKYBERG et al., 2003).

2.6 DIFERENCIAÇÃO DAS ESTIRPES DE *Escherichia coli* QUANTO À PATOGENICIDADE

2.6.1 Métodos fenotípicos

Nem todas as amostras de *Escherichia 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). A sorotipagem é muito complexa, com seus 173 antígenos O, 56 antígenos H e ainda 80 antígenos K, em amostras dotadas de cápsula. Podem ser encontrados na natureza em muitas possíveis combinações, mas o número de sorotipos patogênicos é limitado (ØRSKOV; ØRSKOV, 1992). Em torno de 60 sorotipos são mais freqüentemente associados ao homem, sendo que 35 deles estão associados a infecções intestinais (TRABULSI; TOLEDO, 1991). Os antígenos de superfície, por si só, não podem classificar as amostras de *Escherichia coli* quanto a sua capacidade patogênica. Exceção seja feita ao sorotipo O157:H7 que, pela forte

associação com o patotipo, serve como indicador da amostra enterohemorrágica (KUHNERT et al., 2000)

Além da investigação da estrutura antigênica, a patogenicidade das amostras de *Escherichia coli* 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 *Escherichia coli* que causam as enfermidades intestinais são caracterizadas por fatores de virulência diferentes daqueles encontrados nas enfermidades extraintestinais (ØRSKOV; ØRSKOV, 1992).

Provas biológicas, baseadas principalmente nos padrões de adesão celular e no potencial toxigênico das amostras, podem ser viabilizadas a partir do uso de cultivos celulares ou em animais de laboratório, respectivamente. Scaletsky et al. (2002), para diferenciar os padrões de adesão celular que caracterizam as amostras enteropatogênicas de *Escherichia coli*, utilizaram 3mL de cultivo, desenvolvido em caldo nutriente, para inocular cultivos celulares, empregando as linhagens celulares HEp-2 e HeLa. O cultivo celular inoculado foi incubado durante três horas a 37°C. Após esse período foi lavado, fixado com metanol, corado com corante May-Grunwald-Giemsa e examinado sob microscopia. Os padrões de aderência identificados foram: aderência localizada, pois a célula bacteriana se aderiu ao cultivo celular formando microcolônias de forma localizada; aderência difusa, quando os microrganismos aderiram inteiramente à superfície do cultivo celular, sem a formação de microcolônias, e a aderência agregativa, em que as amostras determinaram uma proeminente aglutinação entre as células bacterianas na superfície das células hospedeiras. Brito et al. (2003) citaram uma técnica para a detecção da enterotoxina “Stable Toxin” (ST) pelo método de inoculação em camundongos recém-nascidos. Cepas de *Escherichia coli* foram semeadas em caldo Caye, recomendado para o cultivo de *Vibrio cholerae*, e incubadas durante 18 horas a 37°C. A toxina foi extraída por centrifugação do meio de cultivo e o sobrenadante inoculado em camundongos, pela via intragástrica. Os animais foram mantidos em uma estufa a 35°C por três horas e depois sacrificados, necropsiados e os intestinos e carcaças foram pesados separadamente, para a determinação da relação peso dos intestinos/peso das carcaças. Valores iguais ou superiores a 0,085 foram considerados positivos para a presença da toxina.

Outras provas *in vitro* foram descritas, como a caracterização de adesinas, que são moléculas que permitem a adesão celular entre a bactéria e uma célula hospedeira. As adesinas podem estar presentes no glicocálix da célula microbiana ou em estruturas superficiais denominadas de fimbrias (TORTORA et al., 1994). As técnicas para a

caracterização das fímbrias baseiam-se na sua capacidade de aglutinar hemácias, podendo ser classificadas em fímbrias não aglutinantes, fímbrias que têm sua aglutinação inibida pela D-manose (manose sensíveis, ou fímbria tipo I) e as que não têm a aglutinação inibida pela manose (manose resistentes). Rocha et al. (2002) utilizaram a prova de aglutinação para caracterizar a presença de fímbrias em amostras de *Escherichia coli* isoladas de frangos com problemas respiratórios. O crescimento bacteriano foi realizado em “factor antigen agar” e a atividade hemaglutinante foi determinada por teste de microaglutinação, utilizando-se uma suspensão bacteriana e eritrócitos de cobaios e galinhas, ambos na presença e ausência de D-manose, dispostos em microplacas com base em “U”.

Outro fator de virulência, a produção do metabólito bacteriano colicina, foi caracterizado por Brito et al. (2003), cuja atividade colicinogênica de *Escherichia coli* foi determinada a partir de estirpes cultivadas em caldo soja tripticaseína e incubadas a 37°C por 18 horas. Essas amostras foram, posteriormente, semeadas em vários pontos de placas de Petri contendo ágar soja tripticaseína, incubadas nas mesmas condições e inativadas pelo clorofórmio. Após a inativação, ágar soja tripticaseína semisólido, no qual foram cultivadas previamente estirpes de *Escherichia coli* indicadoras sensíveis a colicina, foi vertido sobre cada uma das placas com as bactérias inativadas, sendo posteriormente incubadas durante 18 horas a 37 °C. A produção de colicina foi visualizada pela presença de halos de inibição de crescimento da bactéria indicadora.

Após a colonização inicial em tecidos do hospedeiro, como os do intestino ou traquéia, algumas cepas de *Escherichia coli* podem ganhar a circulação. Mas logo se confrontam com os efeitos bactericidas ou bacteriostáticos do soro. A presença de determinados lipopolissacarídeos, de cápsula e de proteínas de superfície, tem sido atribuída à resistência de algumas dessas cepas (FERREIRA; KNÖBIL, 2000). Gibbs et al. (2003) determinaram a resistência das estirpes de *Escherichia coli* ao soro através da caracterização da atividade lítica do complemento pelo método de contagem de células viáveis. Plasma de galinha foi misturado a uma suspensão bacteriana em salina tamponada. A mistura de suspensão e plasma foi incubada em banho-maria e organismos viáveis foram determinados pelo plaqueamento de diluições seriadas em ágar MacConkey, coletados zero, uma, duas e três horas depois. Intervalos de confiança foram calculados quanto à diferença entre as médias entre zero e três horas. Se a diferença estivesse acima ou abaixo dos limites de confiança o isolado seria considerado intermediariamente resistente à ação do complemento; se estivesse acima do limite superior seria classificado como resistente, e se estivesse abaixo do limite inferior de confiança o isolado seria classificado como sensível ao complemento.

A limitada disponibilidade de ferro é um mecanismo de defesa do hospedeiro, pois impede o desenvolvimento dos microrganismos que necessitam desse elemento. A *Escherichia coli* produz uma molécula transportadora de ferro denominada de sideróforo. Algumas bactérias só produzem uma classe de sideróforos e outras secretam múltiplos tipos. A *Escherichia coli* produz dois tipos de sideróforos: a enterobactina (ou enteroquelina) e a aerobactina (FARINATI, 2007). A aerobactina é mais eficiente em condições de limitação de ferro (WILLIAMS; CARBONETTI, 1986). Para detectarem a produção de aerobactina, Stehling et al. (2003) utilizaram um meio sólido (ágar Luria), fizeram orifícios no meio de cultivo, que foram preenchidos com o sobrenadante de cultivos bacterianos a serem testados, crescidos em um meio livre de ferro (caldo Luria). Uma vez que o meio sólido tivesse absorvido todo o líquido, uma estirpe de *Escherichia coli* indicadora era inoculada sobre a superfície e a placa incubada a 37 °C “overnight”. O crescimento da bactéria indicadora, em um dado orifício, indicava a capacidade da amostra pesquisada de produzir aerobactina.

Hemolisina é um tipo de fator de virulência geralmente encontrado nas amostras enterohemorrágicas, mas seu papel na patogenicidade ainda não é bem estabelecido (KUHNERT et al., 2000). Reingold et al. (1999) destacaram que a hemolisina está presente também em cepas uropatogênicas e determinaram, em aves, a presença de hemolisinas distintas de outras espécies. Rocha et al. (2002) relacionaram a presença de hemolisina à capacidade de a *Escherichia coli* produzir hemólise em ágar sangue. Amostras que apresentassem um halo claro ao redor das colônias crescidas, após a incubação do cultivo, eram definidas como hemolíticas.

2.6.2 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).

Muitos genes de virulência estão localizados em elementos móveis, como os plasmídios, e podem ser trocados entre as bactérias que compõem a microbiota normal. (KUHNERT et al., 2000). Plasmídios são pequenas moléculas de DNA circular, unidos ao cromossomo bacteriano e que são capazes de se replicarem de forma autônoma (TORTORA

et al., 1994). Além da capacidade de auto-replicação, esses elementos codificam uma grande variedade de funções utilizadas para sua classificação em: plasmídios F, que possuem capacidade de autotransferência; plasmídios R, que codificam resistência a antimicrobianos; plasmídios de virulência, que transportam genes codificadores da síntese de fatores de virulência como adesinas, enterotoxinas e colicinas. Existem ainda os plasmídios metabólicos, que conferem propriedades metabólicas extras às bactérias, como a capacidade, entre outras, de fermentar açúcares, normalmente não fermentados, induzindo assim a erros de identificação (TRABULSI; TOLEDO, 1991). Embora as bactérias possam transferir material genético entre si por meio de mecanismos de transformação, conjugação e transdução, a *Escherichia coli* é mais competente para captar DNA de outras células através da conjugação. Na conjugação ocorre o contato entre as células, sendo que a célula doadora leva o plasmídeo e a receptora não. A fixação ocorre quando a fimbria sexual da bactéria doadora se liga a receptores específicos, presentes na parede da célula receptora (TORTORA et al., 1994). A transferência inicia-se com a quebra de uma das fitas do plasmídeo da célula doadora. Essa fita é transferida para a receptora através da fimbria sexual. Simultaneamente à transferência, ambas as fitas do plasmídeo são replicadas e a que foi transferida é anelada pela ação de enzimas específicas. A célula receptora passa a expressar as características codificadas pelo plasmídeo recebido, que poderão ser transferidas para outras bactérias e herdadas pela progênie (TRABULSI; TOLEDO, 1991).

A identificação de genes de virulência e resistência em *Escherichia 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 nucléicos anelarem-se (hibridarem-se) através do pareamento de bases complementares, formando moléculas híbridas de fita dupla (TRABULSI; TOLEDO, 1991). Para sua utilização o DNA da bactéria é extraído e purificado, digerido com uma enzima de restrição. Após essa etapa são feitos corrida eletroforética, transferência de fragmentos desnaturados para um filtro, hibridação com sonda marcada e revelação do padrão de bandas (DARINI et al., 1998). Considerando a descrição de Trabulsi e Toledo (1991), as sondas são marcadas por métodos colorimétricos ou por substituição de alguns nucleotídeos por outros análogos. As amostras (colônias a serem testadas) são inoculadas sobre um filtro de nitrocelulose e colocadas na superfície de um meio de cultura sólido. As colônias que se desenvolvem sobre o filtro são subsequente

tratadas, de modo a lisar as bactérias, para que seu conteúdo genético seja exposto e desnaturado. Os filtros, então, são incubados em uma solução contendo a sonda genética marcada. Onde a sonda encontrar seqüências homólogas ela hibrida, e sua presença é posteriormente revelada. No caso de sondas radioativas, essa revelação é feita através de um autorradiograma, sendo que as bactérias portadoras da seqüência pesquisada impressionarão uma base (filme) sensível aos raios-X, formando manchas negras. Souza et al. (2002) traçaram um perfil etiológico, através de cultivos bacterianos, em casos de diarreia infantil no Estado de São Paulo, e indicaram as bactérias como agentes mais importantes. Porém, através da hibridação para detecção dos fatores de virulência, chegou-se à conclusão de que boa parte das bactérias poderia estar atuando como comensais, visto que os mesmos microrganismos foram encontrados em crianças sem diarreia. Os fatores de virulência pesquisados através da técnica de hibridação de colônias foram: adesão (EPEC Adherence Factor - EAF, *Escherichia coli attaching and effacing* - *eae*, “Bundle Forming Pilus” - BPF), invasão (“Invasion” - INV) e toxinas (Heat-Labile Toxin - LT, Heat-Stable Toxin - ST, Shiga-Like Toxin I - SLTI e Shiga-Like Toxin II - SLTII).

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. Seqüências de determinado microrganismo podem ser amplificadas utilizando-se “primers” (seqüências iniciadoras) complementares àquelas seqüências em locais específicos do genoma. Ocorre a extensão do fragmento de DNA a partir dos “primers”, pela ação de uma DNAPolimerase termoestável, a taqDNAPolimerase. Antes da extensão o DNA é desnaturado e o “primer” anelado, sendo o ciclo (desnaturação-anelamento-extensão) repetido várias vezes, permitindo a amplificação exponencial daquela seqüência específica. A detecção de determinado agente é indicada pela formação de um produto de amplificação de tamanho definido. 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 *Escherichia coli*, considerados relevantes para o estabelecimento de doença extraintestinal, através dessa técnica. Os genes caracterizados codificavam fatores de adesão (*pap*, *sfa* e *afa*), uma proteína da membrana envolvida na meningite neonatal (*ibe10*), uma alfa-hemolisina (*hly*), uma toxina freqüentemente produzida em amostras presentes em infecções do trato urinário, que induz à lise celular, e um

determinante de aerobactina (*aer*). Nesse estudo também foi acessado o gene *eae*, envolvido na aderência celular.

2.7 PATOTIPOS DE *Escherichia coli*

2.7.1 Estirpes enteropatogênicas

Devido à facilidade de acesso, através da ingestão de alimentos contaminados, o trato intestinal do homem é muito susceptível às infecções por *Escherichia coli* enterovirulentas (SOUZA, 2006). Em levantamento feito por Amson et al. (2006) no Estado do Paraná entre 1978 e 2000, *Escherichia coli* figurou em quinto lugar entre as ocorrências bacterianas em humanos, após *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp, *Clostridium perfringens* e *Bacillus cereus*.

As estirpes diarreio gênicas de *Escherichia 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, conforme disposto no quadro 5: 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 *Escherichia coli* da microbiota normal do intestino adquirirem fatores que as capacitem a sobreviver à ação lítica do soro (PICARD et al., 1999).

ETEC é o nome dado a um grupo de *Escherichia coli* produtora de toxinas especiais que estimulam o revestimento intestinal, estimulando a produção de fluidos em excesso, produzindo assim a diarreia. As toxinas produzidas são as ST e LT, de acordo com sua sensibilidade ao calor (CDC, 2007). ETEC está associada à doença entérica em indivíduos de todas as idades. Pela ação das toxinas produzidas, enzimas envolvidas na manutenção do equilíbrio hidrossalino da mucosa intestinal são estimuladas. Esse estímulo resulta em uma menor absorção de sódio pelas microvilosidades das células intestinais e maior excreção de cloretos e bicarbonatos, com conseqüente acúmulo de líquidos no lúmen intestinal e diarreia (TRABULSI; TOLEDO, 1991).

EPEC é correntemente subdividida em típica (EPEC) e atípica (A - EPEC). EPEC é a principal causa de diarreia infantil em países em desenvolvimento e é rara em países industrializados, onde a A - EPEC é a causa mais importante de diarreia. Somente os humanos são reservatórios da EPEC, e a A - EPEC pode ser encontrada em humanos e animais. EPEC promove lesões do tipo “attaching-effacing” em células eucarióticas. Essas lesões são mediadas pela intimina, uma proteína de aderência da membrana externa da *Escherichia coli* codificada pelo gene *eae*. EPEC também possui um plasmídio para um fator de aderência (pEAF), que codifica o pili BPF e um complexo regulador de vários genes de virulência (*Per*), expressando um padrão de aderência localizado, caracterizado por um grupamento bacteriano compacto desenvolvido em células HeLa e HEp-2. Na A - EPEC não existe o fator de aderência EAF, ou não há a expressão de um BPF funcional. A - EPEC perde assim a capacidade de expressar o padrão de aderência localizado (KAPER et al., 2004).

A categoria EHEC causa enterocolite hemorrágica e a síndrome urêmica hemolítica no homem. Essa síndrome é decorrente da adesão de estirpes de bactérias às células do epitélio intestinal e a ação das shigatoxinas. O sorotipo mais envolvido em casos de intoxicação alimentar que causam a enterocolite hemorrágica é o O157:H7 (TRABULSI; TOLEDO, 1991). Nataro e Keper (1998) destacam outros sorogrupos O, conforme demonstrado no quadro 5, cujas estirpes apresentam plasmídios que codificam a produção de toxinas da família “shiga”.

Estirpes de *Escherichia coli* classificadas como EAEC são responsáveis pela “diarreia do viajante” e diarreia endêmica, tanto em países em desenvolvimento como nos países industrializados. As principais características desse grupo são a capacidade de se aderir à mucosa intestinal, a elaboração de citotoxinas e a capacidade de induzir a inflamação da mucosa. EAEC é identificada por sua forma de aderência agregativa em células HeLa e HEp-2. Genes requeridos para a produção desse tipo de aderência são produzidos por plasmídios de aderência agregativa (pAA), que codificam fímbrias de aderência denominadas de “Aggregative Adherence Fimbria” (AAF). As bactérias ligam-se, formando agregados em toda a superfície das células da mucosa intestinal, desenvolvendo um denso biofilme, o que favorece uma prolongada colonização, induzindo a má nutrição. A expressão das AAF requer uma proteína (AggR), capaz de regular os genes envolvidos na biogênese fimbrial. Algumas estirpes podem elaborar citotoxinas codificadas por plasmídios e enterotoxinas (HARRINGTON et al., 2006).

Estirpes do patotipo DAEC são caracterizadas por seu padrão de aderência difusa em células da linhagem Hep-2 ou HeLa. Existem duas classes de DAEC. Uma abriga adesinas

Afa/Dr e está associada a infecções do trato urinário e a várias infecções entéricas, sendo também portadora de vários sistemas de transporte de ferro e uma hemolisina funcional, que é responsável pela morte celular por apoptose ou necrose. A segunda classe inclui a estirpe de *Escherichia coli* que expressa uma adesina envolvida na aderência difusa e é a causa potencial de diarreia infantil (SERVIN, 2005). Meng et al. (2001) consideraram não haver o envolvimento deste patotipo com alimentos.

Quadro 2: Patotipos e sorogrupos de *Escherichia coli* diarreiogênicas.

Categoria	Sorogrupo	Antígeno^(s) H associado^(s)	Categoria	Sorogrupo	Antígeno^(s) H associado^(s)
ETEC	O6	H16	EPEC	O55	H6, NM
	O8	H9		O86	H34, NM
	O11	H27		O111	H2, H12, NM
	O15	H11		O119	H6, NM
	O20	NM		O125ac	H21
	O225	H42, NM		O126	H27, NM
	O27	H7		O127	H6, NM
	O78	H11,H12		O128	H2, H12
	O128	H7		O142	H6
	O148	H28			
	O149	H10			
	O159	H20			
	O173	NM			
EHEC	O26	H11, H32, NM	EAEC	O3	H2
	O55	H7		O15	H18
	O111ab	H8, NM		O44	H18
	O113	H21		O86	NM
	O117	H14		O77	H18
	O157	H7		O111	H21
		O127		H2	
		O ^{2a}		H10	
EIEC	O28ac	NM	DAEC^b		
	O29	NM			
	O112 ac	NM			
	O124	H30, NM			
	O136	NM			
	O143	NM			
	O144	NM			
	O152	NM			
	O159	H2, NM			
	O164	NM			
167	H4, H5, NM				

Fonte: NATARO; KEPER (1998).

^a Antígeno O não tipável por métodos convencionais.

^b Caracterizada por padrões de aderência em cultivo celular.

2.7.2 Estirpes extraintestinais

As amostras extraintestinais são denominadas de “Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*” (ExPEC) e possuem fatores de virulência que permitem a resistência da *Escherichia coli* à atividade lítica do soro (PICARD et al., 1999). Fernandez-Bero et al. (1990), estudando casos de diarreia e meningite em humanos, causadas pela *Escherichia coli*, relataram que as estirpes do trato intestinal abrigam poucos fatores de resistência que as capacitam a sobreviverem na corrente sanguínea, ao contrário das amostras isoladas do sangue. Foram encontrados, nesse estudo, plasmídios que abrigam os genes de resistência ao soro *iss* (*increased serum survival*), *trat* (proteínas da membrana externa) e *iuc/iut* (produção de aerobactina). As doenças mais comuns afetando os humanos incluem as infecções urinárias, a meningite neonatal, a septicemia e as infecções pós-operatórias. Estirpes de *Escherichia coli* pertencentes à classe ExPEC também podem causar infecções extraintestinais em animais domésticos, e a presença de fatores de virulência compartilhados entre as amostras humanas e de animais sugere que esses organismos são patógenos de caráter zoonótico. Amostras ExPEC também têm sido isoladas de alimentos crus, carne bovina e carne de aves, indicando que elas representam uma nova classe de patógenos transmissíveis por alimentos (SMITH et al., 2007).

2.7.3 Estirpes patogênicas para as aves

A categoria que apresenta estirpes patogênicas para as aves é denominada como “Avian Pathogenic *Escherichia coli*” (APEC). Nela, as estirpes são classificadas de acordo com a presença de fatores de virulência específicos (FERREIRA; KNÖBL, 2000). Brito (2000), em uma revisão sobre os fatores de virulência de *Escherichia coli* de origem aviária, destacou como essenciais para a patogenicidade das amostras a ação das adesinas fimbriais e não fimbriais no aspecto da adesão celular, a produção de metabólitos bacterianos, como as bacteriocinas (colicinas), fatores de resistência sérica, a ação de hemolisinas e aerobactina e a produção de citotoxinas. Gibbs et al. (2003) elegeram como características importantes, para indicar a virulência das amostras de *Escherichia coli*, a resistência ao complemento, produção de colicina (Col V), presença do elemento genético de resistência ao soro (*iss*), expressão de fimbrias do tipo F1, motilidade e a presença do gene *tsh* (“temperature sensible

haemagglutinin”), mas apenas os três primeiros foram correlacionados com uma maior letalidade quando inoculados em embriões de galinha. Ainda segundo esse autor, a patogenicidade das amostras está relacionada com o impacto cumulativo de um ou vários fatores de virulência. Skyberg et al. (2003), em um estudo complementar sobre a letalidade embrionária de cepas de *Escherichia coli*, demonstraram que apenas as cepas que apresentaram mais de dois fatores de virulência causavam a mortalidade em um número maior de embriões, mesmo que isolados de aves saudáveis.

Assis e Santos (2001), comparando a patogenicidade de amostras de *Escherichia coli* produtoras e não produtoras de verotoxina (exotoxina), inoculadas em pintos de um dia, revelaram que as taxas de mortalidade das estirpes produtoras de verotoxina foram maiores (44,8%) do que quando se inocularam estirpes não produtoras de verotoxina (32,5%) mas, estatisticamente, a diferença não foi significativa. O efeito citotóxico, sozinho, não influenciou as taxas de mortalidade.

Certos clones de APEC podem ser específicos em casos de celulite, mas, muitas vezes, são idênticos a outras estirpes de *Escherichia coli* patogênicas aviárias (NGELEKA et al., 1996). As principais doenças em aves e os sorogrupos responsáveis estão no quadro a seguir.

Quadro 3: Principais doenças em aves provocadas por *Escherichia coli* e os sorogrupos responsáveis.

Doença	Sorogrupos	Referência
Doença Crônica Respiratória	O2, O21, O36, O45, O50, O78, O88 e O119	MENÃO et al., 2002
Salpingite	O1, O2, O5, O36, O45, O53, O78	MONROY et al., 2004
Colisepticemia	O2, O11 e O78 O1, O2 e O78	HARRY, 1965 EWERS et al., 2004
Celulite	O1, O2 e O78 O78	NGELEKA et al, 1996 LECLERC et al., 2003
Onfalite	O2, O21, O26, O45, O55, O58, O78, O88, O111, O119, O125, O152, O158	SILVA, 1993

2.8 GENE *iss*

As doenças causadas pela *Escherichia coli* em aves têm características extraintestinais (FERREIRA; KNÖBL, 2000) e, a exemplo das estirpes que causam doença no Homem, do patotipo ExPEC, possuem determinados mecanismos de virulência que permitem a sua sobrevivência aos efeitos líticos do soro. O gene *iss* serve como marcador de virulência das estirpes patogênicas nas aves, uma vez que a expressão desse gene freqüentemente prediz seus efeitos patogênicos (GIBBS et al., 2003; NOLAN et al., 2002). O gene *iss* também pode ser encontrado com freqüência em estirpes da classe Expec isoladas de fontes humanas. Fernandez-Bero et al. (1990) detectaram o gene *iss* em estirpes de *Escherichia coli* do sangue de humanos com meningite e também em estirpes isoladas de fezes de humanos com diarreia, porém em menores quantidades, comparado às estirpes isoladas do sangue. A maioria dos genes de resistência ao soro das cepas provenientes dos casos de diarreia, contudo, foi detectada no cromossoma bacteriano e não em plasmídios. Segundo Tortora et al. (1994) a *Escherichia coli* pode captar DNA de outras bactérias e o faz de forma mais competente através da conjugação, que utiliza plasmídios.

O gene *iss* tem sido localizado em vários plasmídios de grandes dimensões, que são capazes de carrear simultaneamente fatores de virulência e de resistência a antimicrobianos, como descrito por Johnson et al. (2002). Em seu estudo, esse autor localizou um plasmídio R, responsável pela resistência a múltiplos antimicrobianos, de aproximadamente 100 kilobases (kb) de extensão, que codificava a resistência contra os antimicrobianos tetraciclina e ampicilina, e vários fatores de resistência, entre eles o gene *iss*. Tivendale et al. (2004) descreveram a presença do gene *iss* em um plasmídio denominado de pMV01 (160kb), necessário para a colonização do trato respiratório por possuir o gene *tsh*, envolvido na ligação de *Escherichia coli* ao trato respiratório. O gene *iss* também foi descrito por Johnson et al. (2006) em um plasmídio denominado de ColV, que possuía, além do gene *iss*, mais 12 plasmídios de virulência, freqüentemente encontrados em APEC, sendo os fatores para aquisição de ferro considerados como importantes na patogenicidade das estirpes dessa classe.

Uma mesma amostra bacteriana pode conter mais de um tipo de plasmídio, como foi observado por Johnson et al. (2005), que descreveram a presença do plasmídio ColV e do plasmídio R. Ewers et al. (2005), comparando várias amostras de *Escherichia coli* - *Escherichia coli* não patogênica, APEC, EHEC, EPEC, ETEC, e um patotipo encontrado em casos de infecção do trato urinário (*Uropathogenic Escherichia coli* - UPEC), encontraram o

gene *iss* apenas nas cepas não patogênicas e UPEC. Nas cepas da classe APEC houve uma ocorrência de 100% do gene *iss* nas amostras isoladas.

Johnson et al. (2002) analisaram um plasmídeo R (101kb) de uma amostra APEC com genes que codificaram a resistência a oito grupos de agentes antimicrobianos (tetraciclina, sulfonamidas, aminoglicosídeos, trimetoprim e agentes beta-lactâmicos), metais pesados como o nitrato de prata e a dois desinfetantes (composto de amônia quaternária e cloreto de benzalcônio).

2.9 IMPORTÂNCIA DAS ESTIRPES DE *Escherichia coli* AVIÁRIAS COMO AGENTES ETIOLÓGICOS DE DOENÇAS ALIMENTARES

Da contagem total de bactérias que contaminam os produtos derivados de aves, apenas 10% são responsáveis por sua deterioração. Os 90% restantes são agentes zoonóticos. Esses agentes podem contaminar os produtos a partir de sua presença no animal vivo e continuar a fazê-lo durante o processamento (BOLDER, 2007). A contaminação da superfície externa das carcaças diminui após a escaldagem, o mesmo não acontecendo com os microrganismos do trato respiratório. Berrang et al. (2003) consideraram que existe algum nível de colonização do trato respiratório por vários microrganismos durante a produção, mas afirmaram que a contaminação desse sistema aumenta após a escaldagem. Buhr et al. (2005) confirmaram que o número de *Escherichia coli* no trato respiratório de frangos aumentou após a escaldagem e que esse microrganismo, embora ainda presente, foi isolado em menor quantidade quando as aves tiveram a traquéia obstruída.

Reconhece-se que as estirpes de *Escherichia coli* patogênicas para aves representam baixo risco de doença para o Homem e outras espécies animais (CAYA et al., 1999). Entretanto, as aves são susceptíveis à colonização com cepas patogênicas para o Homem e podem apresentar doença entérica ou apenas servirem como reservatório. Guy et al (2000), ao inocularem estirpes do patotipo EPEC em peruzinhos, não observaram nenhum sintoma aparente. Porém, quando inoculados com EPEC e coronavírus, as aves desenvolveram severa enterite, marcada depressão e aumento da mortalidade (79%-38/48). Akashi et al. (1993) e Joya et al. (1990) detectaram estirpes de *Escherichia coli* da classe ETEC em frangos, que foram responsáveis pela presença de diarreia nessas aves. Kariuki et al. (2002) detectaram cepas da classe EPEC e ETEC em galinhas aparentemente saudáveis. Essas cepas são

responsáveis por doença entérica no Homem e, segundo esse estudo, também podem ser consideradas potencialmente patogênicas para as aves. As cepas EPEC descritas foram assim classificadas pela presença de fatores de aderência, que as caracterizavam como uma cepa de classe EPEC típica. Segundo Kaper et al. (2004), somente os humanos são reservatórios da EPEC típica, e a forma atípica pode ser encontrada em humanos e animais.

Beery et al. (1985) demonstraram a habilidade da *Escherichia coli* O157:H7 em colonizar o trato intestinal de galinhas inoculadas pela via oral de forma experimental. Doyle e Schoeni (1987) isolaram *Escherichia coli* O157:H7 de carne fresca de diversas espécies animais vendidas no varejo, inclusive de aves. Johnson et al. (2005) isolaram *Escherichia coli* de 1648 itens alimentares coletados no varejo, com uma prevalência de 92% em produtos de origem aviária. Desses isolados, 46% pertenciam à classe ExPEC. Ewers et al. (2007) indicaram as amostras aviárias como possíveis fontes de genes e plasmídios típicos da classe ExPEC para humanos.

Os patótipos EPEC e ETEC detectados em aves são responsáveis diretamente pela doença no Homem, que pode ser contaminado ao ingerir produtos e subprodutos avícolas. Mas as amostras aviárias, com frequência, possuem plasmídios que abrigam um grande número de genes responsáveis não só pelo aumento da virulência das cepas de *Escherichia coli*, mas também pelo aumento da resistência das bactérias a vários antimicrobianos (DOETKOTT et al., 1996; STEHLING et al., 2003). Com o conhecimento da genética microbiana, entende-se hoje que esses fatores podem ser trocados entre as amostras presentes na microbiota das aves e na humana por mecanismos de recombinação, possibilitando o aparecimento de amostras resistentes a vários antimicrobianos. Johnson et al. (2007), ao compararem a presença de amostras aviárias e humanas quanto à resistência aos antimicrobianos, sugeriram que muitos isolados humanos resistentes tiveram origem nas amostras aviárias e emergiram em humanos por conjugação. Skyberg et al. (2003) destacaram que o fenômeno de aquisição de virulência através da conjugação pode ocorrer inclusive entre amostras patogênicas e comensais e, segundo Trabulsi e Toledo (1991), entre bactérias de espécies diferentes.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

Foram obtidas, em matadouro sob Inspeção Federal, 180 codornas da espécie *Coturnix coturnix coturnix*, da linhagem francesa CDR (Figura 1), com idades entre 40 e 43 dias, provenientes de duas diferentes unidades produtoras situadas na cidade de Videira, em Santa Catarina. As aves, segundo a ficha de acompanhamento do lote, tinham entre 40 e 43 dias. A criação foi realizada sobre cama de maravalha e as aves receberam apenas vacina contra a Doença de Marek no primeiro dia de vida e foram alimentadas com ração contendo coccidiostáticos. Ração sem a adição de medicamentos foi administrada cinco dias antes do abate e suspensa pelo menos 24 horas antes do abate, de acordo com a orientação do Serviço de Inspeção Federal.

3.2 COLETA DE DADOS E DE MATERIAL

Das 180 codornas, selecionadas ao acaso, 60 foram retiradas da linha de abate depois de condenadas pela Inspeção Federal, e 120 foram retiradas das caixas de transporte antes da pendura. Todas as codornas foram colocadas em caixas de papelão, em grupos de até oito aves (Figura 2), e levadas à sala de necropsia da empresa, para que fossem executados os procedimentos de pesagem, necropsia e coleta de material. As codornas foram pesadas

individualmente e examinadas quanto ao aspecto geral. As 120 aves retiradas das caixas de transporte foram eutanasiadas por decapitação, com tesoura de trinchar (FAO, 2006; AVMA, 2006), para possibilitar a coleta de sangue, e então necropsiadas. O sangue, após a coleta, foi acondicionado e identificado individualmente em frascos de vidro esterilizados e mantidos em posição horizontal para dessorar. Os soros obtidos foram transferidos para microtubos tipo “Eppendorf”, previamente esterilizados, e armazenados em “freezer” da empresa, a -70°C , até o transporte final, feito em caixas isotérmicas com gelo, sendo mantidos novamente em “freezer” até a realização dos testes sorológicos.



Figura 1: Codorna da espécie *Coturnix coturnix coturnix*, da linhagem francesa CDR.

Após a abertura da cavidade celomática, porções de traquéia, de aproximadamente dois centímetros, e sacos aéreos foram coletados e acondicionados individualmente em tubos de ensaio com tampa de rosca, contendo salina tamponada (“Phosphate Buffered Saline”-PBS) com pH 7.2, adicionado de 50% de glicerina, para possibilitar a manutenção tanto de micoplasmas quanto de *Escherichia coli*. Após a coleta, os tubos foram acondicionados em caixas isotérmicas com gelo, até o armazenamento sob congelamento em “freezers” da

empresa. Fragmentos de saco aéreo e traquéia também foram coletados para exame histológico, após a análise macroscópica dos órgãos. Os tecidos removidos para esse fim foram fixados em solução de formalina a 10%.



Figura 2: Grupo de codornas prontas para a pesagem individual.

3.3 AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES ANATOMOPATOLÓGICAS

3.3.1 Alterações macroscópicas

Todos os órgãos foram observados detalhadamente e as alterações macroscópicas detectadas foram registradas em fichas de coleta. O julgamento para a classificação das lesões das aves condenadas seguiu os critérios utilizados pelo MAPA, através da Portaria nº 210 em seu anexo IX (BRASIL, 1998).

3.3.2 Alterações microscópicas

As amostras mantidas em formalina foram encaminhadas ao Serviço de Anatomia Patológica Professor Jefferson Andrade dos Santos, da Universidade Federal Fluminense, para processamento pelas técnicas histológicas usuais. As lesões observadas foram fotografadas com máquina fotográfica digital.

3.4 SOROLOGIA PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA *Mycoplasma gallisepticum*

No laboratório de Ornitopatologia da Universidade Federal Fluminense, o soro das 120 aves, retiradas das caixas de transporte antes da entrada na linha de processamento, foi submetido à centrifugação, para torná-lo mais límpido, e a inativação em banho-maria a 56° C por 30 minutos. Os testes sorológicos feitos seguiram as técnicas recomendadas pelo PNSA (BRASIL, 2001), cujos resultados são expressos para galinhas e perus.

3.4.1 Soroaglutinação Rápida

Os soros inativados foram submetidos à Soroaglutinação rápida (SAR), em placa de vidro quadriculada, para a detecção de anticorpos contra *Mycoplasma gallisepticum*, utilizando-se antígeno comercial do laboratório BIOVET. Uma gota (0,05 mL) do antígeno e uma gota (0,05 mL) de cada soro bruto a ser testado foram colocadas no centro de cada um dos quadrados da placa de vidro. Soros e antígeno foram então misturados com o auxílio de palitos de madeira e depois a placa foi agitada com movimentos circulares. Reação positiva foi verificada após a formação de grumos, indicando a reação antígeno/anticorpo. Não foi necessária a diluição dos soros para a repetição da prova. Os antígenos foram testados para a presença de autoaglutinação utilizando-se uma gota de solução salina e uma gota de antígeno. Para a validação dos antígenos, soros positivos para *Mycoplasma gallisepticum* foram usados como controle. Os soros positivos, cedidos pelo laboratório de Ornitopatologia da

Universidade Federal Fluminense, foram obtidos a partir de aves reconhecidamente positivas para *Mycoplasma gallisepticum*.

3.4.2 Inibição da Hemaglutinação

Todos os soros, independente dos resultados da SAR, foram submetidos à prova de inibição da hemaglutinação (HI, da sigla em inglês para Hemagglutination Inhibition), para detecção de anticorpos contra *Mycoplasma gallisepticum*.

Para a realização do HI foi necessário, inicialmente, titular a solução antigênica para determinar a quantidade de unidades hemaglutinantes (UHA), o que foi feito a partir do teste de Hemaglutinação (HA). O antígeno utilizado nessa prova e no HI foi produzido pelo laboratório do Núcleo de Diagnóstico da Micoplasmosse (NUDMIC) da Universidade Federal Fluminense a partir de uma cepa padrão de *Mycoplasma gallisepticum*.

Uma solução de hemácias foi necessária para a revelação da reação antígeno-anticorpo.

3.4.2.1 Coleta e preparo de hemácias de aves

Uma alíquota de 1mL do anticoagulante citrato de sódio, a 3,8%, foi colocada em uma seringa de 5 mL. O sangue, retirado de aves doadoras, na quantidade suficiente para encher a seringa, foi homogeneizado e transferido para um tubo de centrífuga graduado, completando-se o seu volume com PBS até 14 mL. A solução foi centrifugada durante cinco minutos a 1500 rpm para lavagem das hemácias. O sobrenadante foi removido, completando-se o volume do tubo novamente com PBS, na mesma quantidade. A operação foi repetida por mais duas vezes. Após o término da lavagem das hemácias o tubo foi completado com PBS, sendo obtida uma solução a 10% (1 mL de hemácias em 9 mL de PBS), que foi estocada sob refrigeração por um período não superior a uma semana.

Para os testes de HA e HI, 1 mL da suspensão de hemácias a 10%, em estoque, foi adicionada a 9mL de PBS, de modo a se obter uma concentração de hemácias a 1%.

3.4.2.2 Titulação do antígeno de *Mycoplasma gallisepticum* pelo teste de Hemaglutinação

A solução antigênica a ser utilizada no teste de HI foi titulada imediatamente antes da execução da prova. O teste foi realizado em microplacas de 96 cavidades (12 colunas x 8 linhas), com fundo em “U”. Foram colocados 50 µL de PBS em todas as cavidades da microplaca, exceto as da primeira coluna, que receberam 80 µL. Às cavidades da primeira coluna foram adicionados 20 µL do antígeno bruto. O conteúdo dessas cavidades foi homogeneizado com o auxílio de ponteiras acopladas a uma pipeta multicanal. Após a homogeneização foram efetuadas diluições sucessivas, retirando-se 50 µL das cavidades da primeira coluna, que foram dispostos sucessivamente nas cavidades das colunas seguintes, homogeneizando-se seu conteúdo em cada etapa de modo a produzir diluições de 1:5 até 1:5120. Os 50 µL restantes da última cavidade foram desprezados. Para a revelação do teste foram utilizados 50 µL da suspensão de hemácias a 1%, colocados em todas as cavidades da microplaca. A microplaca foi agitada suavemente e deixada sob temperatura ambiente por 45 minutos. Após esse período procedeu-se à leitura do teste. O título encontrado correspondeu a uma UHA (1UHA), e foi obtido a partir da maior diluição do antígeno onde ocorreu a hemaglutinação total, ou seja, a não formação de botão no fundo da cavidade. Após esse procedimento procedeu-se ao cálculo da diluição a fim de se obter 4UHA, necessárias para a realização do teste de HI, utilizando a fórmula a seguir. Após o cálculo efetuado dilui-se o antígeno em PBS.

$$4 \text{ UHA} = \frac{\text{Título da maior diluição do antígeno onde ocorreu a hemaglutinação total}}{4}$$

$$\text{Exemplo: } 4 \text{ UHA} = \frac{160}{4} = 40 \text{ (dilui-se 1 mL de antígeno em 40 mL de PBS)}$$

3.4.2.3 Teste de HI

Todas as cavidades da microplaca foram preenchidas com 50µL de PBS e, como no teste de HA, as cavidades da primeira coluna receberam 80µL de PBS. Cada cavidade da primeira coluna recebeu 20 µL dos soros a serem testados, devidamente identificados. O

conteúdo dessas cavidades foi homogeneizado e, em seguida, foi realizada a diluição dos soros procedendo-se como ocorrido no HA. A seguir, foram adicionados a cada cavidade 50 µL da solução de antígeno de *Mycoplasma gallisepticum* padronizado com 4UH. Incubou-se em temperatura ambiente por 40 minutos. Após essa etapa 50 µL de uma suspensão de hemácias a 1% foram adicionados a cada cavidade. A leitura foi realizada após 45 minutos, tempo necessário para que as hemácias do controle, solução conseguida com hemácias e PBS, estivessem sedimentadas, formando um botão no fundo das cavidades. O título de anticorpos foi considerado onde ocorreu a maior diluição capaz de inibir completamente a hemaglutinação.

3.5 REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE PARA DETECÇÃO DE *Mycoplasma gallisepticum*

A Reação em Cadeia de Polimerase, conhecida pela sigla PCR, do inglês Polymerase Chain Reaction, foi realizada no Laboratório de Epidemiologia Molecular da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense, no Departamento de Saúde Coletiva e Saúde Pública Veterinária, conforme metodologia descrita por Nascimento et al. (1991). Os reagentes e soluções utilizados foram produzidos conforme descrito por Sambrook et al. (1989).

As amostras maceradas e estocadas em PBS com glicerol foram descongeladas e semeadas em meio de Frey Modificado, tal como descrito por Nascimento (2000), para reativação, e incubadas a 37°C, até a viragem da cor do meio, originalmente rosa, para amarelo. Esse material foi então utilizado nos procedimentos de extração de DNA. Cultivo fresco de *Mycoplasma gallisepticum* foi utilizado como controle da prova.

3.5.1 Extração do DNA

Do material semeado e crescido no caldo Frey foram retiradas alíquotas de 1000 µL e acondicionadas em tubos tipo “ependorf”, previamente esterilizados. Esse material foi então centrifugado por 30 minutos a 13.500 rpm em centrífuga refrigerada (ALC-PK 121R-Annita IIR-Processing e Control Interface) a 10°C. O sobrenadante foi descartado e foram

adicionados a cada tubo, na qual ficaram retidos aproximadamente 40 µL da amostra, 400 µL TE dextrose, 30 µL de proteinase K e 30 µL de dodecil sulfato de sódio a 10%. Esse material foi para um bloco térmico (Quimis-Q331) a 50°C durante 30 minutos e depois acondicionado em um recipiente com gelo por 15 minutos. A seguir, a purificação do DNA foi realizada pelo método fenol-clorofórmio. O fenol foi adicionado às amostras no volume de 500 µL, que foram homogeneizadas manualmente por 10 minutos e depois centrifugadas por 30 minutos a 13.500 rpm a 10°C. As amostras foram passadas para outros recipientes, adicionando-se a cada tubo 500 µL de clorofórmio e agitando-se manualmente por cinco minutos e centrifugando-se, posteriormente, por oito minutos a 13.500 rpm, a 10°C. As amostras foram passadas para outros tubos e precipitadas em 900 µL de etanol, levadas ao “freezer” (-20°C) e mantidas “over night”. Após esse período o material foi centrifugado a 13.500 rpm durante 20 minutos a 10 °C. Retirado o etanol, o material foi levado à estufa a 37°C, para secagem dos tubos, e ressuspenso em 100 µL de TE.

3.5.2 Amplificação do DNA

Para a reação de amplificação foram adicionados, a cada 15 µL de amostra de DNA obtida na etapa anterior, 55µL de água para PCR tratada com dietilpirocarbonato (DEPC), 10µL de tampão de PCR (10x), 5µL de MgCl₂, 5µL de mistura de dNTPs, 4µL do “primer” 5’ CGT GGA TAT CTT TAG TTC CAG CTG C 3’ (Prodimol), 4µL do “primer” 5’ GTA GCA AGT TAT AAT TTC CAG GCA T 3’ (Prodimol), e 2 µL de Taq DNA polimerase, totalizando um volume final de 100 µL, e duas gotas de óleo mineral esterilizado, para evitar a evaporação durante o processamento térmico.

As amplificações foram realizadas em um termociclador (Programmable Thermal Controller-PTC-100) sob as seguintes condições: 94°C por cinco minutos (T1), sendo seguido por 40 ciclos que compreendiam, a cada repetição, a desnaturação a 94°C por um minuto (T2), o anelamento dos “primers” a 57°C por um minuto (T3) e extensão a 68°C por um minuto (T4). Após esses ciclos seguiu-se um ciclo final de 70°C por 10 minutos (T5) e a manutenção das amostras por três minutos a uma temperatura de 4°C (T6).

3.5.3 Eletroforese em gel de agarose

A análise dos produtos amplificados foi realizada por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, em tampão Tris-Borato-EDTA (TBE), a 94 V durante aproximadamente 40 minutos. Após a corrida eletroforética, o gel de agarose foi corado com brometo de etídio, sob agitação suave durante 15 minutos. Para auxiliar a visualização dos “amplicons” de 481 pares de bases (pb), foi utilizado o marcador Ladder 100pb (PB-L Produtos Biológicos). O resultado foi observado sob luz ultravioleta em um transiluminador. (EB-20E-ultra-Lum - Inc. Carson, Califórnia).

3.6 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA DE *Escherichia coli*

As análises microbiológicas foram realizadas no Laboratório de Controle Microbiológico de Produtos de Origem Animal e no Laboratório de Ornitopatologia da Universidade Federal Fluminense. O isolamento e identificação bioquímica de *Escherichia coli* foram baseados na metodologia descrita por Quinn et al. (1998) e complementada segundo Toledo et al. (1982a) e Toledo et al. (1982b). As amostras de traquéias e sacos aéreos, acondicionadas em PBS, foram descongeladas e posteriormente maceradas com o auxílio de gral e pistilo, previamente esterilizados. Alíquotas de cada macerado foram retiradas com o auxílio de alça de platina e inoculadas em tubos de ensaio esterilizados contendo 3,0 mL de caldo tripticase e incubados a 37 °C por 24h. Após esse período alíquotas do caldo tripticase semeado anteriormente foram retiradas com o auxílio de alça de platina e semeadas em ágar MacConkey (Britânia) e ágar sangue (base Oxoide), e incubadas a 37 °C por 24h. Do crescimento no ágar MacConkey (Britânia) e no ágar sangue (base Oxoide), três colônias foram selecionadas de cada meio, sendo inoculadas individualmente em tubos contendo ágar TSI (Himedia) e incubadas a 37 °C por 24h. Quando os cultivos apresentaram comportamento típico com *Escherichia coli*, foram sucessivamente semeadas nos meios Sulfeto Indol Motilidade (SIM), Citrato (Difco), MILi (Motilidade Indol Lisina) (TOLEDO et al., 1982a) e meio de Rugai e Araújo modificado (EPM) (TOLEDO et al., 1982b) e incubadas à 37 °C por 24 horas em cada etapa. Os cultivos considerados positivos foram semeados em caldo tripticase e incubados a 37 °C por 24h. Após esse período foram adicionados às

amostras 3mL de glicerol esterilizado e estas foram homogeneizadas e estocadas em “freezer” para provas laboratoriais posteriores.

3.7 SOROTIPAGEM DAS ESTIRPES DE *Escherichia coli*

Os isolados identificados como *Escherichia coli* foram sorogrupados para a investigação daqueles pertencentes aos patotipos EPEC, EIEC e EHEC-O157, utilizando-se antisoros polivalentes e monovalentes (Probac do Brasil, Ltda). Os cultivos positivos em estoque foram semeados em ágar Casoy inclinado (Difco) e incubados a 37 °C por 24h. Para cada um deles foi feita uma diluição direta com água destilada esterilizada, em quantidade suficiente para que se obtivesse uma turbidez equivalente ao de uma solução padrão 1,0 da escala de Mac Farland em estoque (cerca de 10⁸ UFC/mL). O material suspenso foi retirado com o auxílio de uma alça de platina e depositado sobre uma placa de vidro quadriculada e, em seguida, misturado a uma gota do antígeno a ser testado. Primeiramente fez-se o teste com soro polivalente e, posteriormente, com a aglutinação evidente, as amostras foram testadas com soros monovalentes. Todos os soros utilizados foram testados para a presença de autoaglutinação utilizando-se uma gota de soro e uma gota de solução salina.

3.8 TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA DE CEPAS DE *Escherichia coli*

O teste de susceptibilidade a antimicrobianos foi conduzido de acordo com normas do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2006). Os isolados de *Escherichia coli* em estoque foram descongelados e semeadas em ágar Casoy inclinado e incubadas a 37°C por 24h. Para cada uma delas foi feita uma diluição direta com água destilada esterilizada, em quantidade suficiente para que se obtivesse uma turbidez equivalente ao de uma solução padrão 1,0 da escala de Mac Farland em estoque. Embebeu-se um suabe de algodão esterilizado na suspensão logo após o ajuste da turbidez do inóculo. O suabe foi girado várias vezes e apertado firmemente contra a parede interna do tubo, acima do nível do líquido. A superfície seca de uma placa contendo ágar Mueller-Hinton foi inoculada esfregando-se o suabe em todo o plano do ágar. Repetiu-se o procedimento esfregando-se outras duas vezes,

girando a placa aproximadamente 60° cada vez. Sobre a superfície do ágar foram então depositados, com o auxílio de pinça esterilizada, os discos contendo os seguintes antimicrobianos: Amoxicilina (AMO), Ampicilina (AMP), Ceftazidima (CAZ), Cefoxitina (CFO), Ciprofloxacina (CIP), Enrofloxacina (ENO), Gentamicina (GEN), Ácido Nalidíxico (NAL.), Polimixina B (POL), Cotrimoxazol (Sulfazotrin) (SUT) e Tetraciclina (TET). Após esse procedimento as placas inoculadas foram incubadas a 37 °C durante 24h. Após a incubação foi realizada a leitura com o auxílio de um halômetro, medindo-se o diâmetro da zona de inibição de crescimento e comparando-se com uma tabela com o padrão interpretativo em milímetros, classificando-se as amostras como sensíveis, resistentes ou intermediárias.

3.9 REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE PARA DETECÇÃO DO GENE *iss* em estirpes de *Escherichia coli*

A PCR para detecção do gene *iss* nos isolados de *Escherichia coli* foi realizada no Laboratório de Epidemiologia Molecular da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense, no Departamento de Saúde Coletiva e Saúde Pública Veterinária, conforme metodologia utilizada por Gonçalves (2005), que empregou o método de extração térmica do DNA.

As amostras estocadas em caldo tripticase com glicerol foram descongeladas e semeadas em caldo Brain Heart Infusion (BHI-Difco), para reativação, e incubadas a 37°C durante 24 horas. Esse material foi então utilizado nos procedimentos de extração de DNA. Duas amostras positivas para a presença do gene *iss* foram utilizadas como controle da prova.

3.9.1 Extração do DNA

Dos isolados de *Escherichia coli* semeados em caldo BHI foram retiradas alíquotas de 1,0 mL, que foram acondicionadas em tubos tipo “ependorf”, previamente esterilizados. Esse material foi então centrifugado a 13.500 rpm em centrífuga refrigerada (ALC-PK 121R-Annita IIR-Processing e Control Interface) a 10°C por quatro minutos. O sobrenadante foi

descartado e foi adicionado ao tubo 1 mL de solução salina a 0,85%. Esse material foi homogeneizado em um agitador de tubos (Phoenix AP56) e centrifugado novamente, utilizando-se o mesmo tempo e a mesma temperatura anteriores. Após essa etapa, o sobrenadante foi descartado e ao tubo foram adicionados 20 μ L de água Milli-Q. Os tubos foram levados para um bloco térmico (Quimis-Q331) a 95°C durante 10 minutos. Após esse período, o material foi novamente centrifugado, conforme citado acima, e utilizado para a etapa seguinte, a de amplificação do DNA.

3.9.2 Amplificação do DNA

Para a reação de amplificação foram adicionados a cada amostra de DNA, obtida na etapa anterior, 5 μ L de água Milli-Q e uma mistura de reação contendo: 21 μ L de água Milli-Q, 10 μ L de tampão de PCR (10x), 5 μ L de MgCl₂, 5 μ L de mistura de dNTPs, 1 μ L do “primer” 5'- GTG GCG AAA ACT AGT AAA ACA GC 3' (Prodimol) e 1 μ L do “primer” 5' – CGC CTC GGG GTG GAT AA 3' (Prodimol), que amplificam 760 pb, e 2 μ L de Taq DNA polimerase, totalizando um volume final de 50 μ L, e duas gotas de óleo mineral esterilizado, para evitar a evaporação durante o processamento térmico.

As amplificações foram realizadas em um termociclador (Programmable Thermal Controller-PTC-100) sob as seguintes condições: 94°C por cinco minutos (T1), sendo seguido por 30 ciclos que compreendiam, a cada repetição, a desnaturação a 94°C por um minuto (T2), a anelamento a 61°C por um minuto (T3) e extensão a 72°C por dois minutos (T4). Após esses ciclos seguiu-se um ciclo final de 72°C por dois minutos (T5) e a manutenção das amostras por três minutos a uma temperatura de 4°C (T6).

3.9.3 Eletroforese em gel de agarose

A análise dos produtos amplificados, com 760 pb, foi realizada por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, em tampão TBE, a 94 V durante aproximadamente 40 minutos. Após a corrida eletroforética, o gel de agarose foi corado com brometo de etídio, sob agitação suave

durante 15 minutos. Para auxiliar a visualização dos “amplicons”, gerados pelos “primers”, foi utilizado o marcador Ladder 100pb (PB-L Produtos Biológicos). O resultado foi observado sob luz ultravioleta em um transiluminador (EB-20E-ultra-Lum - Inc. Carson, Califórnia).

3.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

O presente estudo foi realizado pelo método epidemiológico transversal. Os dados obtidos foram apresentados na forma de gráficos e tabelas.

As associações entre causa e efeito foram analisadas utilizando-se o teste de Qui-quadrado e o “*Odds Ratio*” (THRUSFIELD, 1995) com base em um intervalo de confiança de 95%. A caquexia foi comparada às seguintes variáveis preditivas: aves positivas para *Mycoplasma gallisepticum* no teste de HI, presença de *Escherichia coli*, presença do gene *iss* em *Escherichia coli* e presença de *Escherichia coli* da classe EPEC.

4 RESULTADOS

4.1 AVALIAÇÃO DO PESO E DAS ALTERAÇÕES ANATOMOPATOLÓGICAS DAS CODORNAS

4.1.1 Alterações Macroscópicas

As codornas tinham o peso médio de 248,3 gramas, e nenhuma das aves apresentou sintomatologia respiratória na inspeção *ante-mortem*.

Das 120 aves coletadas, antes da entrada na linha de abate, 73 apresentaram alteração na coloração do fígado, sendo que destas, 53 apresentaram fígado amarelado de forma difusa e cinco apresentaram apenas pequenas áreas amareladas. Outras 14 apresentaram coloração amarronzada e um fígado tinha um aspecto “mosqueado”. Outras codornas ainda apresentaram contusão na coxa (1/120), hidropericárdio (1/120), petéquias no intestino (1/120), conjuntivite e aerossaculite (1/120), conforme a figura 3.

Das 60 codornas condenadas durante o processamento, oito apresentaram processos inflamatórios caracterizados pela presença de artrite (2), celulite (4), dermatite (1) e salpingite (1). A caquexia esteve presente em 19 aves. Contusões foram observadas em 21 aves, sendo 17 no peito e quatro nas coxas, e, na mesma categoria, três aves sofreram fraturas, sendo que uma das aves apresentou fratura e contusão concomitantemente. Isso totalizou o número de 23 aves na categoria contusão/fraturas. Coloração anormal do fígado ocorreu em 18 codornas, sendo que nove apresentavam-se amarelados de forma difusa, oito com coloração amarronzada e um com coloração esverdeada. O aspecto repugnante, caracterizado pelas síndromes hemorrágicas e coloração anormal das carcaças, foi caracterizado em quatro e onze aves, respectivamente. Duas codornas tiveram rompimento do trato intestinal, ocasionando a

contaminação das carcaças com fezes, e apenas uma apresentou ascite. Esses percentuais podem ser observados na figura 4.

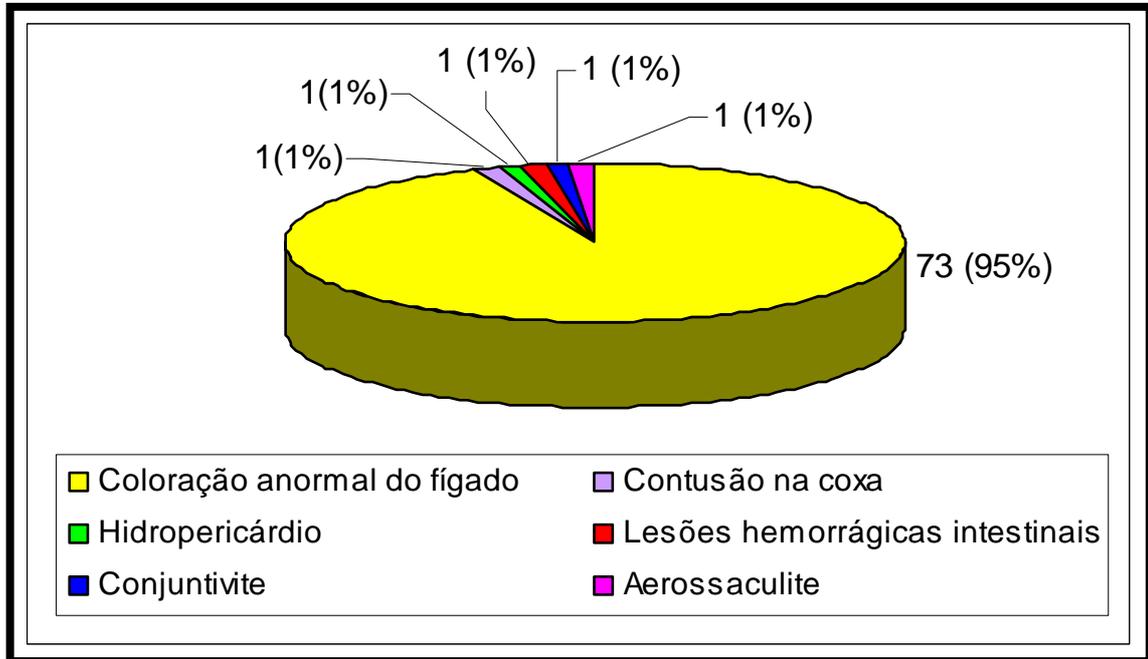


Figura 3: Alterações macroscópicas em codornas de corte retiradas da linha de processamento no momento da pendura.

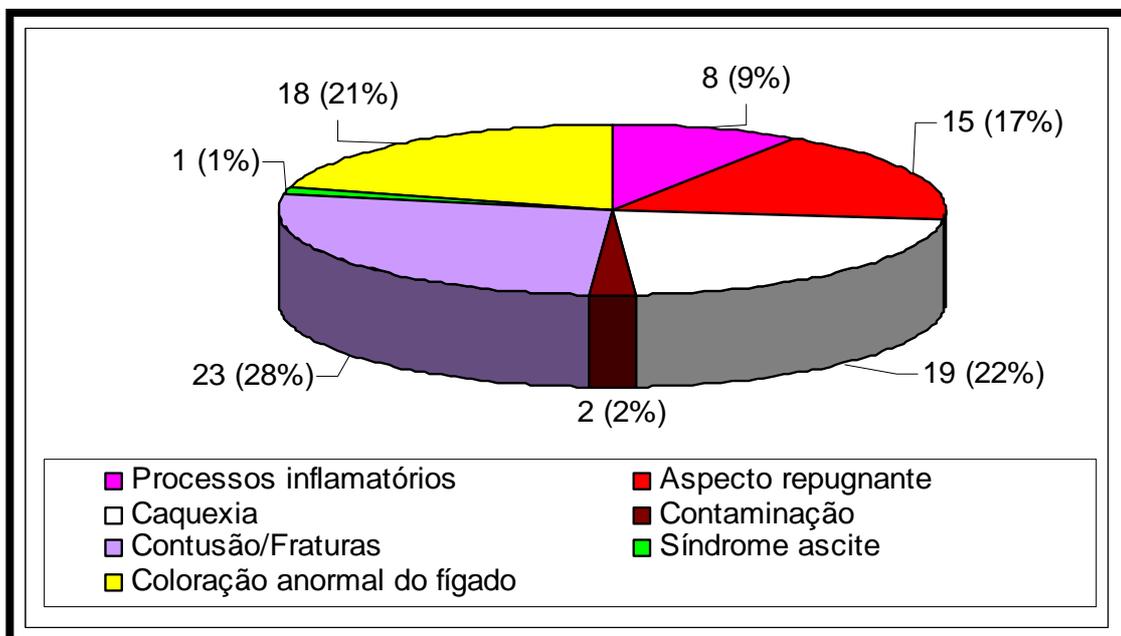


Figura 4: Alterações macroscópicas encontradas em codornas de corte condenadas pela Inspeção Sanitária.



Figura 5: Codorna descartada ao abate apresentando hematoma no peito.

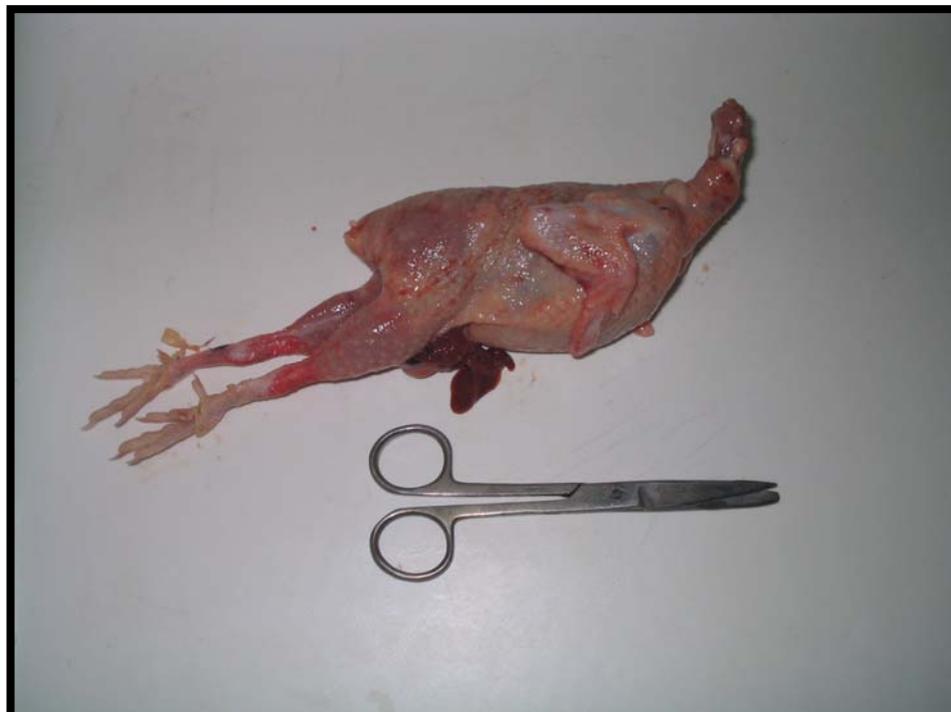


Figura 6: Codorna descartada ao abate apresentando alteração na coloração da carcaça por focos hemorrágicos.



Figura 7: Codorna descartada ao abate apresentando celulite no peito.

4.1.2 Alterações Microscópicas

As lesões microscópicas no trato respiratório das codornas não foram frequentes e ocorreram apenas em 6,7% (12/180). No grupo das aves coletadas antes da entrada na linha de abate apenas uma apresentou alteração microscópica no trato respiratório, representada pela presença de aerossaculite (Figura 6). As codornas condenadas durante o processamento apresentaram um maior número de alterações, caracterizadas por infiltrados mononucleares localizados ou difusos no pulmão (Figuras 9 e 10), no saco aéreo (Figura 8) ou na traquéia (Figura 11).

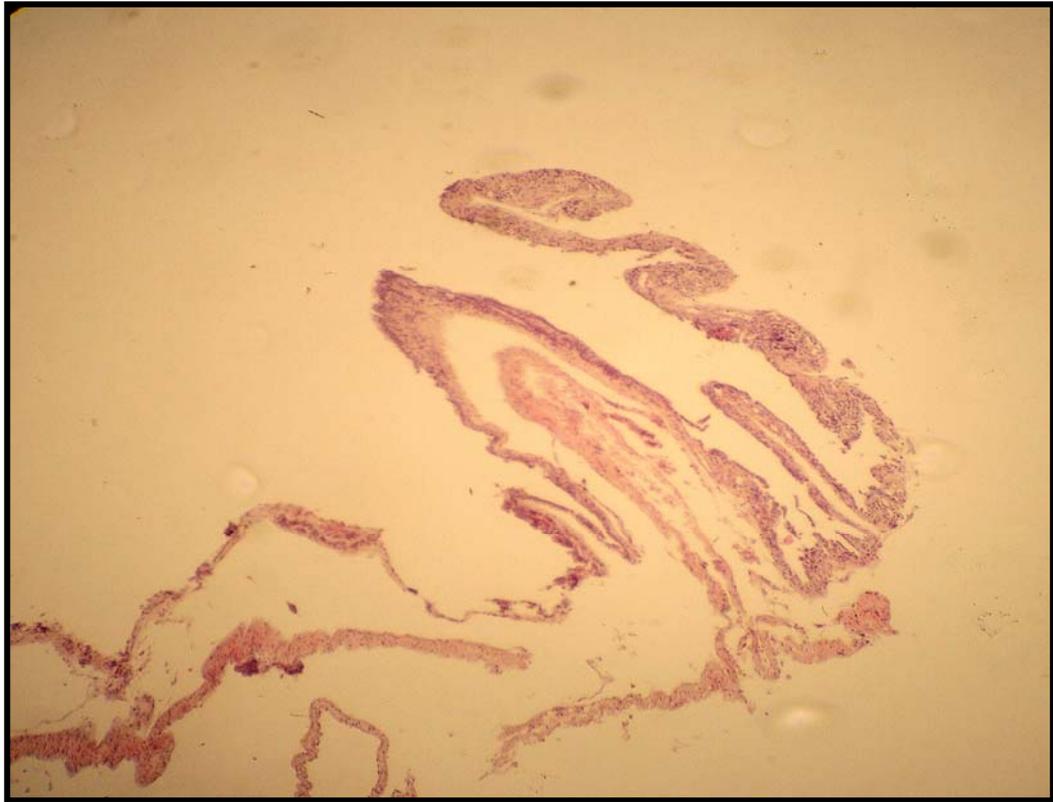


Figura 8: Codorna, saco aéreo. Acentuado espessamento com presença de células mononucleares. H.E.obj. 10x.

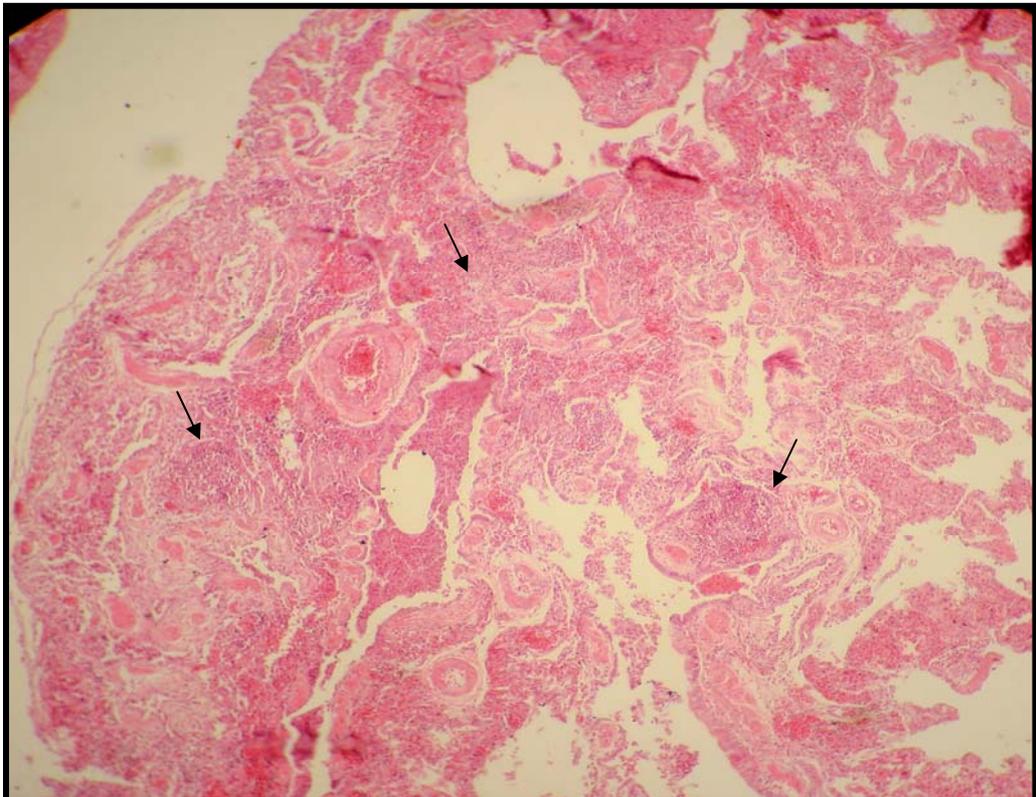


Figura 9: Codorna, pulmão. Processo inflamatório difuso mononuclear. H.E. obj. 10x.

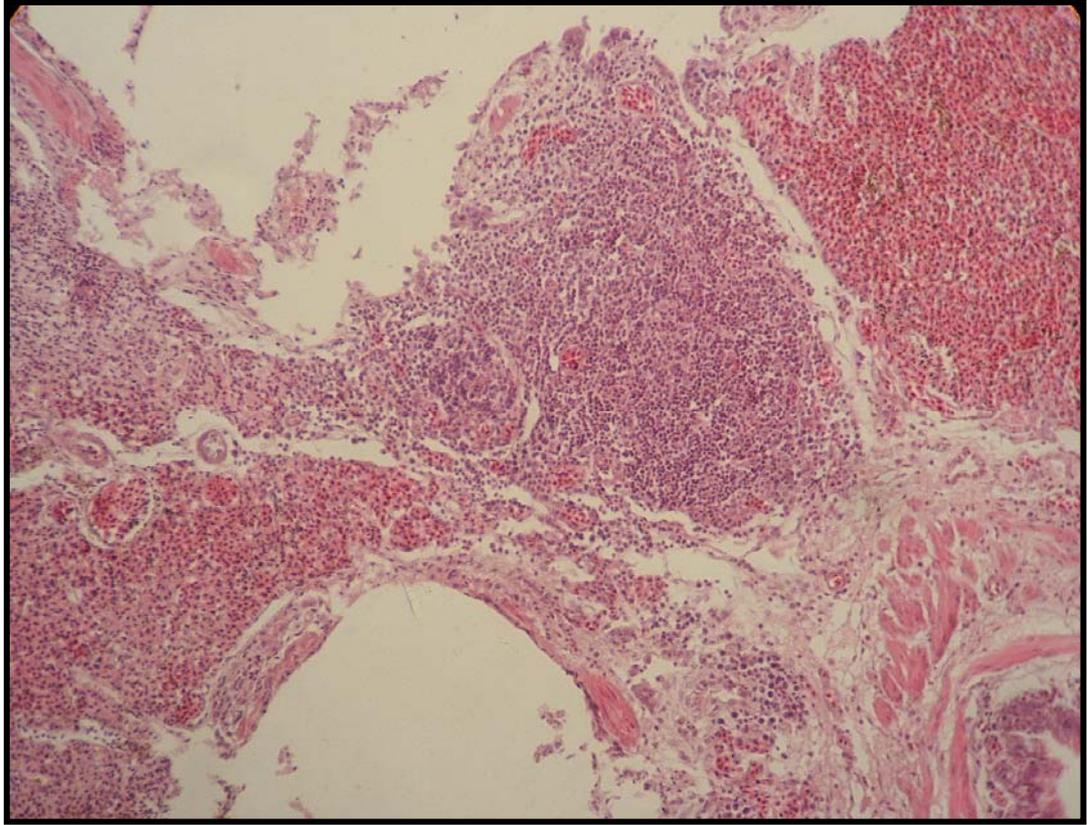


Figura 10: Codorna, pulmão. Processo inflamatório difuso mononuclear. HE. obj.40x.

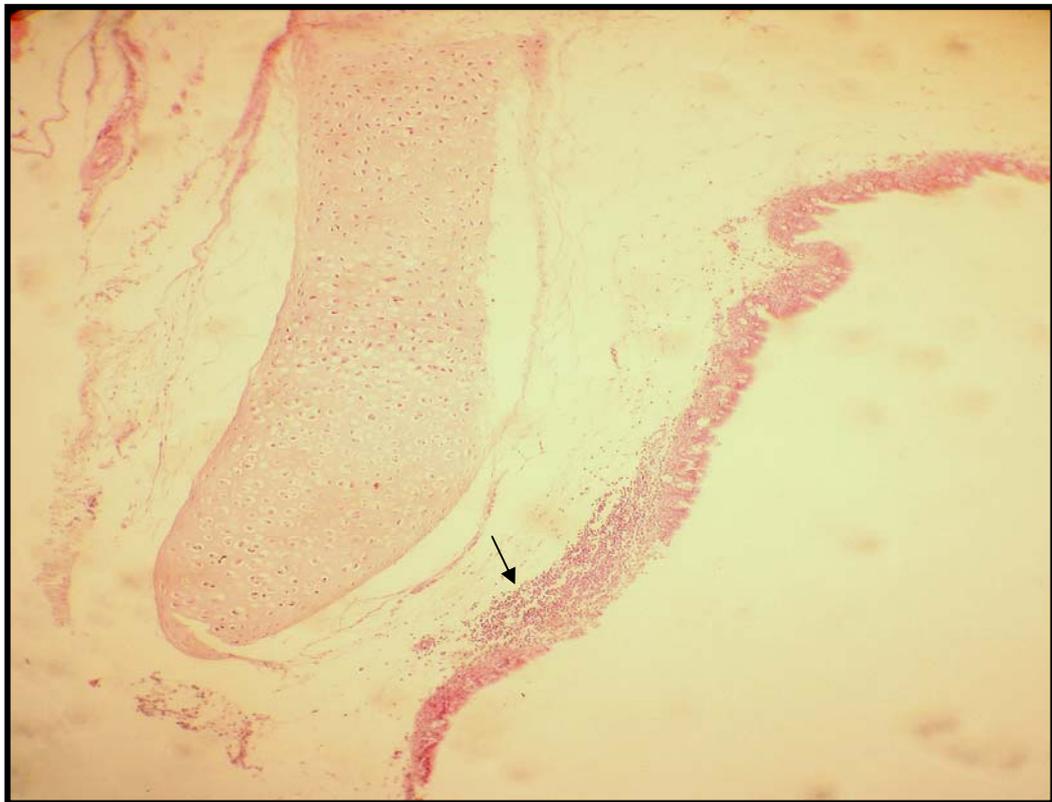


Figura 11: Codorna, traquéia. Traqueíte localizada na mucosa e submucosa. H.E. obj. 10x.

4.2 SOROLOGIA PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA *Mycoplasma gallisepticum*

4.2.1 Soroaglutinação Rápida

Dos 120 soros analisados nenhum foi positivo para *Mycoplasma gallisepticum* pela SAR.

4.2.2 Inibição da Hemaglutinação

No teste de HI, 28,3% (34/120) dos soros continham anticorpos contra *Mycoplasma gallisepticum* com títulos de 1:160 (20/120), 1:80 (4/120), que em galinhas e perus são considerados positivos, 1:40 (9/120) e 1:20 (1/120), considerados suspeito e negativo, respectivamente, também nestas espécies.

4.3 REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE PARA DETECÇÃO DE *Mycoplasma gallisepticum*

Nenhuma das amostras submetidas à identificação de *Mycoplasma gallisepticum* pela PCR foi positiva.

4.4 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE *Escherichia coli*

Não houve isolamento de *Escherichia coli* em nenhuma das 120 codornas retiradas antes da entrada na linha de processamento. Das 60 codornas condenadas pelos agentes da Inspeção Sanitária durante o processamento, apenas 16 aves (26,66%) apresentaram-se positivas quanto à presença de *Escherichia coli*. Foram obtidos isolados positivos apenas da traquéia, sendo encontradas 20 estirpes diferentes de *Escherichia coli*.

4.5 SOROTIPAGEM DAS ESTIRPES DE *Escherichia coli*

Das 20 estirpes obtidas após o isolamento estavam presentes sorogrupos pertencentes à classe EPEC (Tabela 4).

Tabela 4: Presença de sorogrupos do patotipo EPEC em isolados de *Escherichia coli* em traquéias de 16 codornas condenadas ao abate.

Sorogrupo	Traquéia
O26	1
O28	1
O86	1
O126	1
O127	3
O156	1
O158	1
Estirpes não tipáveis	11
Total	20

4.6 TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA DE CEPAS DE *Escherichia coli*

Todas as cepas de *Escherichia coli*, isoladas das traquéias de codornas condenadas ao abate, apresentaram diferentes níveis de susceptibilidade em relação aos seguintes antimicrobianos utilizados: Amoxicilina, Ampicilina, Ceftazidima, Cefoxitina, Ciprofloxacina, Enrofloxacina, Gentamicina, Ácido Nalidíxico, Polimixina B, Cotrimoxazol (Sulfazotrin) e Tetraciclina. Pôde-se observar que a maioria das cepas foi resistente à Tetraciclina (16/20), seguida pela Ceftazidima (13/20) e Ácido Nalidíxico (12/20). Apenas uma amostra foi resistente à Amoxicilina. O resultado completo do teste de sensibilidade pode ser visualizado na Tabela 5.

Tabela 5: Comportamento de 22 estirpes de *Escherichia coli*, isoladas de traquéias de 16 codornas condenadas ao abate, quanto à susceptibilidade antimicrobiana.

Antimicrobiano	nº (%) de cepas resistentes	nº (%) de cepas intermediárias	nº (%) de cepas sensíveis
Amoxicilina	1 (5%)	3 (15%)	16 (80%)
Ampicilina	0 (0%)	2 (10%)	18 (90%)
Ceftazidima	13 (65%)	7 (35%)	0 (0%)
Cefoxitina	0 (0%)	0 (0%)	20 (100%)
Ciprofloxacina	0 (0%)	0 (0%)	20 (100%)
Enrofloxacina	0 (0%)	0 (0%)	20 (100%)
Gentamicina	0 (0%)	0 (0%)	20 (100%)
Ác.Nalidíxico	12 (60%)	7 (35%)	1 (5%)
Polimixina B	0 (0%)	0 (0%)	20 (100%)
Cotrimoxazol	0 (0%)	0 (0%)	20 (100%)
Tetraciclina	16 (80%)	0 (0%)	4 (20%)

4.7 REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE PARA DETECÇÃO DO GENE *iss* em cepas de *Escherichia coli*

Entre as 20 estirpes de *Escherichia coli*, reativadas em caldo BHI, o gene *iss* foi detectado, através da técnica da PCR, em 11 amostras. Todos os cultivos foram provenientes da traquéia de aves aparentemente saudáveis perante o exame *ante mortem*, mas que foram condenadas ao abate por causas variadas. Entre as amostras positivas para o gene *iss*, algumas pertenciam à cepas da classe EPEC (tabela 6).

Tabela 6: Presença do gene *iss* em 22 estirpes de *Escherichia coli*, isoladas de traquéias de 16 codornas condenadas ao abate.

Sorogrupo	Presença do gen <i>iss</i>
O26	-
O28	1
O86	1
O126	-
O127	3
O156	-
O158	1
Amostras não tipáveis	5
Total de amostras positivas para o gen <i>iss</i>	11

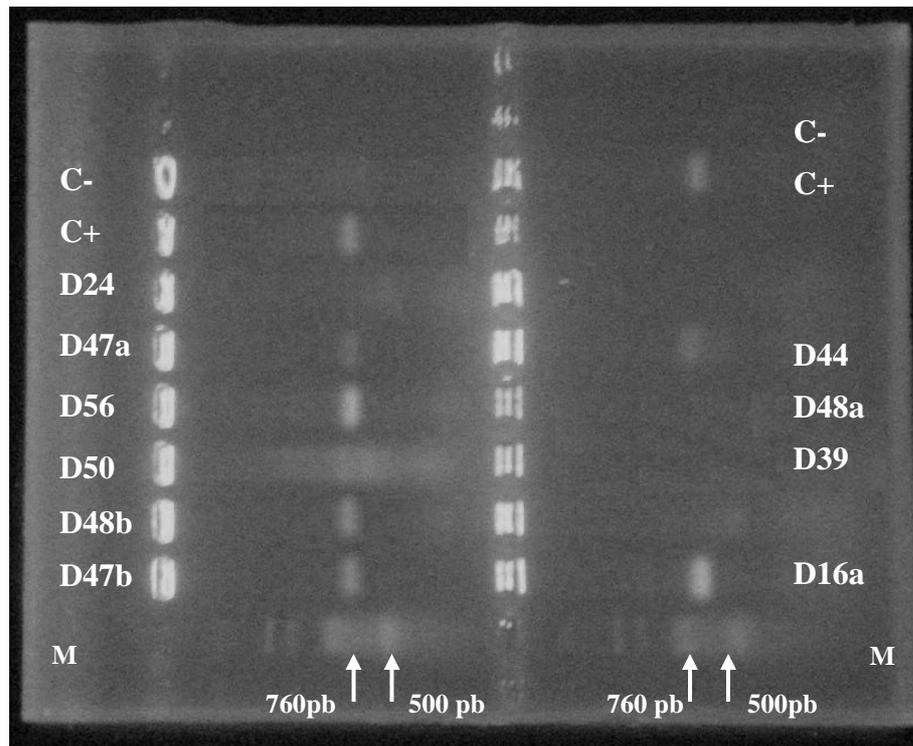


Figura 12: Resultado da PCR para o gene *iss* em estirpes de *Escherichia coli* isoladas de traquéias de codornas condenadas ao abate.

C+ controle positivo

C- controle negativo

D16a, D44, D47a, D47b, D48b, D50, D56: amostras positivas

D24, D48a, D39: amostras negativas

M = Marcador de DNA ladder 100 pb

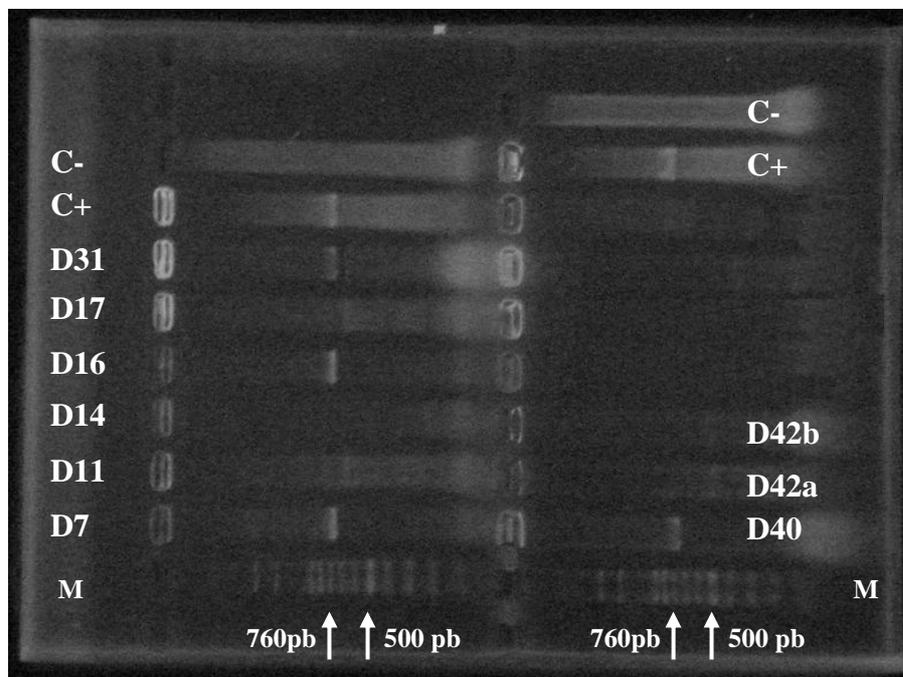


Figura 13: Resultado da PCR para o gene *iss* em estirpes de *Escherichia coli* isoladas de traquéias de codornas condenadas ao abate.

C+ controle positivo

C- controle negativo

D7, D16, D31, D40: amostras positivas

D11, D14, D17, D42a, D42b: amostras negativas

M = Marcador de DNA ladder 100 pb

4.8 ANÁLISE DOS DADOS

Após as análises estatísticas, utilizando-se o teste de Qui-quadrado, foi possível estabelecer a correlação da presença de *Escherichia coli* com o favorecimento da caquexia que afetou algumas aves (Tabela 7), sendo o risco para a presença de caquexia em aves em que a *Escherichia coli* foi isolada 4,37 vezes maior do que em aves sem *Escherichia coli*. Entretanto não houve correlação entre o patotipo EPEC (Tabela 8) e a presença do gene *iss* (Tabela 9) com a presença de caquexia.

Tabela 7: Relação entre a presença de caquexia em 60 codornas condenadas ao abate e a presença de *Escherichia coli*.

Presença de caquexia	Presença de <i>Escherichia coli</i>		Total
	Sim	Não	
Sim	9	10	19
Não	7	34	41
Total	16	44	60

Odds ratio = 4,37 Intervalo de Confiança = 1,299-1,472 p= 0,026

Tabela 8: Relação entre a presença de caquexia em 60 codornas condenadas ao abate e a presença de *Escherichia coli* do patotipo EPEC.

Presença de caquexia	Presença de <i>Escherichia coli</i> patotipo EPEC		Total
	Sim	Não	
Sim	3	6	9
Não	7	4	11
Total	10	10	20

Odds ratio = 0,28 Intervalo de Confiança = 0,04481-1,822 p= 0,3698

Tabela 9: Relação entre a presença de caquexia em 60 codornas condenadas ao abate e a presença do gene *iss* em *Escherichia coli*.

Presença de caquexia	Presença do gene <i>iss</i> em <i>Escherichia coli</i>		Total
	Sim	Não	
Sim	5	5	10
Não	6	4	10
Total	11	9	20

Odds ratio = 0,66 Intervalo de Confiança = 0,1134-3,920 p= 1,0000

De acordo com a regressão logística, utilizada para estimar a magnitude da associação entre a presença de codornas portadoras de anticorpos contra *Mycoplasma gallisepticum*, detectados através do teste de HI, e a variação de pesos encontrada, sugere-se que há uma correlação entre as duas variáveis (Tabela 10). É possível afirmar que a presença de anticorpos no teste de HI é um caráter preditivo para o baixo peso das codornas, entretanto o risco foi considerado pequeno ($p < 0,005$).

Tabela 10: Valor de regressão para o peso de 120 codornas retiradas antes da entrada na linha de processamento como variável dependente frente à variável preditiva presença de anticorpos contra *Mycoplasma gallisepticum* pelo teste do HI.

95% PCL LI-LS	Erro padrão	Valor de p
0,949-0,938	2,5096	0,0018 ($p < 0,005$)

5 DISCUSSÃO

A pesquisa de micoplasmas e *Escherichia coli* em traquéias e sacos aéreos de codornas de corte é de grande importância, pois fornece informações sobre a qualidade sanitária das carcaças. Neste trabalho nenhuma das 180 codornas analisadas apresentou sintomas sugestivos de doença respiratória e poucas apresentaram lesões macro ou microscópicas, mas 60 aves foram condenadas pela Inspeção Sanitária de acordo com a legislação, por apresentarem lesões nas carcaças (BRASIL, 1998).

Apesar de não se constituir em risco para o consumidor, por não ter caráter zoonótico, a presença de micoplasmas em codornas pode induzir a redução de peso das aves, causando prejuízos ao produtor e levando a erros tecnológicos durante o processamento, como relatado por Russel (2003), aumentando o risco de contaminação das carcaças com patógenos de importância para a saúde coletiva.

Os resultados divergentes nos testes sorológicos para pesquisa de anticorpos contra *Mycoplasma gallisepticum* levam a crer que as aves estavam em fase avançada da infecção, apresentando declínio de imunoglobulinas da classe IgM. Estes resultados se assemelham às afirmações de Feberwee et al (2005) e Nascimento (2000) de que a SAR detecta imunoglobulinas nos primeiros dias após a infecção e o teste de HI as detecta entre o décimo e décimo quarto dias após a infecção. Türkyilmaz et al. (2007) demonstraram ser o teste de SAR pouco sensível, sendo o teste de ELISA seguido do teste de HI os mais eficazes para a pesquisa de anticorpos contra *Mycoplasma gallisepticum* em codornas, quando o período de infecção não puder ser estabelecido. Além disso, o tempo decorrido entre a coleta do soro e as análises pela SAR ultrapassaram o período de uma semana, além da necessidade de congelamento das amostras, o que acentuou a ocorrência de resultados negativos por este teste.

O não isolamento de micoplasmas pode ter ocorrido devido ao uso de PBS para o acondicionamento das amostras, o que não beneficia a manutenção destes microrganismos pois, segundo Nascimento (2000), as amostras de tecidos ou suabes para a pesquisa de micoplasmas devem ser acondicionadas em caldo Frey.

A presença de *Escherichia coli* teve correlação significativa com a caquexia nas aves, sugerindo que a contaminação do trato respiratório por *Escherichia coli* nas codornas condenadas ocorreu a campo, embora possa ter sido exacerbada durante o processamento. Berrang et al. (2003) e Buhr et al (2005) também admitem a existência de um certo nível de contaminação do trato respiratório das aves por *Escherichia coli* durante a produção e afirmam que ocorre aumento nas contagens de *Escherichia coli* após o processamento.

Embora as estirpes patogênicas para aves não causem doença no Homem, a presença de *Escherichia coli* enteropatogênicas, encontradas neste estudo, acentuam a importância das codornas como fonte de agentes zoonóticos para o Homem e o risco da presença desses agentes na sanidade dos plantéis. Akashi et al. (1993), Joya et al. (1990) e Kariuki et al. (2002) relataram a presença de estirpes enteropatogênicas em aves comerciais que apresentaram diarreia. As amostras de *Escherichia coli* isoladas neste estudo apresentaram resistência a múltiplos antimicrobianos, semelhante ao que foi descrito por Roy et al (2006) em amostras isoladas de casos de colibacilose em codornas. Entretanto, apenas a Tetraciclina mostrou padrão de sensibilidade semelhante ao encontrado neste estudo. Johnson et al. (2007) localizaram, em estirpes de *Escherichia coli*, plasmídios de resistência aos antimicrobianos Tetraciclina e Ampicilina e, ao compararem a presença de amostras aviárias e humanas quanto à resistência aos antimicrobianos, sugeriram que muitos isolados humanos resistentes tiveram origem nas amostras aviárias e emergiram em humanos por conjugação.

Entre os isolados de *Escherichia coli* provenientes apenas da traquéia, o gene *iss* foi detectado, através da técnica da PCR, em 11 amostras. Embora todas as aves se apresentassem assintomáticas ao exame *ante-mortem*, a possibilidade de que estirpes de *Escherichia coli* patogênicas para as aves estivessem presentes não deve ser descartada. Ewers et al. (2005), comparando vários patótipos de *Escherichia coli* (*Escherichia coli* não patogênica, APEC, EHEC, EPEC, ETEC e UPEC) encontraram o gene *iss* nas estirpes não patogênicas e nas UPEC, sendo que nas cepas do patótipo APEC houve uma ocorrência de 100% do gene *iss*.

A presença do gene *iss* nas estirpes de *Escherichia coli* isoladas de codornas sadias é fato que merece ser considerado de grande importância, pois pode comprometer não só a saúde das aves, por ser considerado um marcador de patogenicidade, mas também afeta a qualidade sanitária das carcaças de codornas, esse gene está presente em vários tipos de

plasmídios, entre eles os que abrigam fatores de virulência e resistência a antimicrobianos. Como a *Escherichia coli* é bastante competente em captar DNA de outras células através da conjugação, pode estabelecer trocas entre bactérias da microbiota normal dos consumidores, conforme citado por Doetkott et al. (1996) e Stehling et al. (2003), adquirindo, assim, caráter zoonótico.

A presença do gene *iss*, nas estirpes de *Escherichia coli* isoladas de codornas sadias, pode comprometer não só a saúde das aves, por ser considerado um marcador de patogenicidade, mas também afeta a qualidade sanitária das carcaças de codornas, uma vez que esse gene se encontra em vários plasmídios, que carregam fatores de virulência e resistência a antimicrobianos, podendo pôr em risco a saúde do consumidor. Devido à troca desses fatores, por conjugação, entre os microrganismos encontrados nas carcaças de codornas e as bactérias da microbiota normal do consumidor, estas podem se tornar mais virulentas e resistentes a vários antimicrobianos. Sendo assim as codornas podem ser consideradas como participantes da cadeia epidemiológica das enfermidades diarreio gênicas.

6 CONCLUSÕES

Bactérias das espécies *Mycoplasma gallisepticum* e *Escherichia coli* estão presentes em codornas aparentemente saudáveis abatidas sob Inspeção Sanitária, interferindo no peso dessas aves.

A presença de anticorpos contra *Mycoplasma gallisepticum* e o isolamento de *Escherichia coli*, a despeito da alteração de peso, determinou apenas alterações microscópicas no trato respiratório das codornas.

As estirpes de *Escherichia coli*, encontradas neste estudo, pertenciam a sorotipos enteropatogênicos, para humanos e aves.

As estirpes de *Escherichia coli*, isoladas neste estudo e submetidas ao teste de susceptibilidade antimicrobiana, apresentaram resistência a vários antimicrobianos usados no tratamento de infecções de aves para consumo e do homem, podendo pôr em risco a saúde do consumidor, além de ter sido demonstrada a presença do gene *iss*, que sendo considerado um marcador de patogenicidade, é capaz de aumentar a virulência das cepas de *Escherichia coli* para as aves.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKASHI, N.; HITOTSUBASHI, S.; YAMANAKA, H.; FUJI, Y.; TSUJI, T.; MIYAMA, A.; JOYA, J.E.; OKAMOTO, K. Production of heat-stable enterotoxin in chicken clinical isolates of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters*, v.109, n.2, p.311-315, 1993.

ALMEIDA, M.I.M. Efeito de linhagem e de nível protéico sobre o desempenho e características de carcaça de codornas (*Coturnix* sp.) criadas para corte. Botucatu, 135f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2001.

ALMEIDA, M.I.M.; OLIVEIRA, E.G.; RAMOS, P.R.; VEIGA, N.; DIAS, K. Growth performance of meat male quails (*Coturnix* sp.) of two lines under two nutritional environments. *Archives of Veterinary Science*, v.7, n.2, p.103-108, 2002a.

ALMEIDA, M.I.M.; OLIVEIRA, E.G.; RAMOS, P.R.; VEIGA, N.; DIAS, K. Efeito de linhagem e nível protéico sobre as características de carcaça de machos de codornas (*Coturnix* sp.). In: SIMPÓSIO NACIONAL DE MELHORAMENTO ANIMAL, 4., 2002, Pirassununga. *Anais eletrônicos...* Pirassununga: Sociedade Brasileira de Melhoramento Animal, 2002b. Disponível em: <<http://www.sbmaonline.org.br/anais/iv/trabalhos/aves/ivt01a v.pdf>>. Acesso em 12 dezembro 2007.

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.

AMSON, G.V.; HARACEMIV, S.M.C.; MASSON, M.L. Levantamento de dados epidemiológicos relativos à ocorrências/surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTAs) no Estado do Paraná-Brasil, no período de 1978 a 2000. *Ciências Agrotécnicas*, v.30, n.6, p.1139-1145, 2006.

ARENAS, A.; VICENTE, S. LUQUE, I.; GOMES-VILLAMANDOS, J.C.; ASTORGA, R.; MALDONADO, A.; TARRADAS, C. Outbreak of septicaemic colibacillosis in japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Journal of Veterinary Medicine series B*, v.46, n.6, p.399-404, 1999.

ARIKI, J. Criação de codornas. In: Congresso de Produção e Consumo de Ovos, 2., 2000, Jaboticabal. Anais... Jaboticabal: Associação Paulista de Avicultura (APA), 2000. p.77-84

ARMENDARIS, P. Abate de aves – Dados de condenações – Serviço de Inspeção Federal. In: Simpósio de Sanidade Avícola da UFSM, 5., 2006, Santa Maria, RS. *Anais eletrônicos...* Santa Maria: UFSM, 2006. Disponível em: <www.cnpsa.embrapa.br/down.php?tipo=publicacoes&cod_publicacao=880>. Acesso em: 12 agosto de 2007.

ASSIS, A.C.B.; SANTOS, B.M. Pathogenicity *in vivo* and *in vitro* of *Escherichia coli* samples from avian origin. *Brazilian Journal of Poultry Science*, v.3, n.2, p. 181-184, 2001.

ATHAMNA, A.; ROSENGARTEN, R.; LEVISOHN, S.; KAHANE, I.; YOGEV, D. Adherence of *Mycoplasma gallisepticum* involves variable surface membrane proteins. *Infection and Immunity*, v.65, n.6, p.2468-2471, 1997.

AMERICAN VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION (AVMA) - AVMA Guidelines on euthanasia, 2006. Disponível em: <www.avma.org/issues/animal_welfare/euthanasia.pdf> Acesso em: 02 fevereiro 2006.

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.

BASEMAN, J.B.; COLE, R.M.; KRAUSE, D.C.; LEITH, D.K. Molecular basis for cytoadsorption of *Mycoplasma pneumoniae*. *Journal of Bacteriology*, v.151, n.3, p. 1514-1522, 1982.

BEERY, J.T.; DOYLE, M.P.; SCHOENI, J.L. Colonization of chicken cecae by *Escherichia coli* associated with hemorrhagic colitis. *Applied and Environmental Microbiology*, v.49, n.2, p.310-315, 1985.

BERRANG, M.E; MEINERSMANN, R.J.; BUHR, R.J.; REIMER, N.A.; PHILIPS, R.W.; HARRISON, M.A. Presence of *Campylobacter* in the respiratory tract of broiler carcasses before and after commercial scaldin. *Poultry Science*, v.82, n.12, p.1995-1999, 2003.

BIER, O. *Bacteriologia e Imunologia*. 23^a ed. São Paulo: Melhoramentos, 1984, 1234p.

BISCHOFF, J.; DOMRACHEV, M.; FEDERHEN, S.; HOTTON, C.; LEIPE, D.; SOUSSOV, V.; STERNBERG, R.; TURNER, S. *NCBI- Taxonomy Browser*. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Tree&id=9005&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>>. Acesso em: 15 julho 2007.

BOLDER, N.M. Microbial challenges of poultry meat production. *World's Poultry Science Journal*, v.63, n.3, p.401-411, 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria n.º 208, de 20 de dezembro de 1994. Aprova as normas de credenciamento e monitoramento de laboratórios de diagnóstico das micoplasmoses aviárias. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/>>

sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=2636>. Acesso em: 02 junho 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria n.º 210, de 10 de novembro de 1998. Aprova o Regulamento Técnico da Inspeção Tecnológica e Higiênico-sanitária de carne de aves. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/servlet/VisualizarAnexo?id=3162>>. Acesso em: 02 junho 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento – Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº44, de 23 de agosto de 2001. Aprova as normas técnicas para o controle e a certificação de núcleos ou estabelecimento avícola livres da micoplasmose aviária (*Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae*, *Mycoplasma meleagridis*). Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/servlet/VisualizarAnexo?id=3203>>. Acessado em: 02 de junho, 2007.

BRITO, B.G. Fatores de virulência de *Escherichia coli* de origem aviária – APEC. In: Simpósio de Sanidade Avícola, 2., 2000, Concórdia.. *Anais...* Concórdia: EMBRAPA, 2000. p. 56-69.

BRITO, B.G.; TAGLIARI, K.C.; BERBEL, M.M.; FREIRE, R.L. Produção de enterotoxina termoestável, hemolisinas, colicinas e fatores de colonização em amostras de *Escherichia coli* isoladas de leitões com diarreia no sudoeste do Paraná. *Scientia Agrária*, v.4, n.1, p. 15-20, 2003.

BUHR, R.J.; BERRANG, M.E.; CASON, J.A.; BOURASSA, D.V. Recovery of bacteria from broiler carcass respiratory tracts before and after immersion scalding. *Poultry Science*, v.84, n.11, p.1769-1773, 2005.

BURNS, K.E.; OTALORA, R.; GLISSON, J.R.; HOFACRE, L. Cellulitis in japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) *Avian Diseases*, v.47, n.1, p.211-214, 2003.

CARPENTER, T.E. ; MALLINSON, E.T. ; MILLER, K.F. ; GENTRY, R.F. ; SCHWARTZ, L.D. Vaccination with F-strain *Mycoplasma gallisepticum* to reduce production losses in layer chickens. *Avian Diseases*, v.25, n.2, p.404-409, 1981.

CASTRO, A.G.M. Enfermidades do sistema respiratório. In: BERCHIERI Jr., A.; MACARI, M. *Doenças das aves*. Campinas: FACTA, 2000. 505 p. cap.2, p.71-74.

CAYA, F.; FAIRBROTHER, J.M.; LESSARD, L.; QUESSY, S. Characterization of risk to human health of pathogenic *Escherichia coli* isolates from chicken carcasses. *Journal of Food Protection*, v.62, n.7, p.741-746, 1999.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). Disponível em: http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/etec_g.htm#whatis. Acesso em: 15 julho 2007.

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.

CHIRINOS, B.Z.; ICOCHEA, E.D.; GAVIDIA, C.; NOÉ, N.M. Evaluación de la prueba de Inhibición de la Hemaglutinación vs. ELISA para la detección de anticuerpos contra *Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma synoviae*. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Peru*, v.11, n.1, p.10-44, 2000.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests: Approved Standard – 9^a Edition, v.26, n.1. M2-A9. [ISBN 1-56238-586-0]. ISSN 0273-3099, 2006. Disponível em: <<http://www.clsi.org/source/orders/free/m2-a9F.pdf>>. Acesso em: 26 de julho de 2007.

CORREA, G.S.S.; SILVA, M.A.; F.I.C.; CORREA, A.B.; VENTURA, R.V.; FRIDRICH, A.B.; EULER, A.C.C.; SOUZA, J.E.R. Custo operacional variável por ave em três grupos genéticos de codornas de corte submetidas a dietas com diferentes níveis de proteína bruta e energia metabolizável. In: SIMPÓSIO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MELHORAMENTO ANIMAL., 5., 2004, Pirassununga. *Anais eletrônicos...* Pirassununga: Sociedade Brasileira de Melhoramento Animal., 2004. Disponível em: <www.sbmaonline.org.br/anais/v/trabal.hos/aves/av002.pdf>. Acesso em: 12 dezembro 2007.

DARINI, A.L.C. MAGALHÃES, V.D. ; CROTT, L.S.P. Ribotyping on molecular epidemiology of bacterial infections. *Medicina*, v.3, n.1, p.73-80, 1998.

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.

DIAB, H. *Nutrition Facts – Displaying all food in poultry products*. Nutrition Analyser. Disponível em: <http://www.nutritionanalyser.com/food_composition/?group=Poultry%20Products>. Acesso em: 15 julho 2007.

DOETKOTT, D.M.; NOLAN, L.K.; GIDDINGS, C.W.; BERRYHILL, D.L. Large plasmids of avian *Escherichia coli* isolates. *Avian Diseases*, v.40, n.4, p.927-930, 1996.

DOYLE, M.P.; SCHOENI, J.L. Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from retail fresh meats and poultry. *Applied and Environmental Microbiology*, v.53, n.10, p.2394-2396, 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

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

EWERS, C.; JANBEN, T.; KIEBLING, S.; PHILIPP, H.; WIELER, L.H. Molecular epidemiology of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from coliseptisemia in poultry. *Veterinary Microbiology*, v.104, n.1, p.91-101, 2004.

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.

EWERS, C.; WILKING, H.; KIESSLING, S.; AL.T, K.; ANTÃO, E.M.; LATURNUS, C.; DIEHL, I.; GLODDE, S.; HOMEIER, T.; BÖHNKE, U.; STEINRÜK, H.; PHILIPP, H.C.; WIELER, L.H. Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: how closely related are they? *International Journal of Medical Microbiology*, v.297, n.3, p.163-176, 2007.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). Animal Production and Health Manual, 2006. Disponível em: www.nwhc.usgs.gov/publications/field_manual/chapter_5.pdf>. Acesso em: 02 fev 2006.

FARINATI, A. Sideróforos y lactoferrina: ¿pro o contra durante las infecciones?. Disponível em: http://www.aam.org.archivos/171_sideroforos.pdf>. Acesso em: 13/09/2007.

FAULKNER, C.B.; SIMECKA, J.W.; DAVIDSON, M.K.; DAVIS, J.K.; SCHOEB, T.R.; LINDSEY, J.R.; EVERSON, M.P. Gene expression and production of tumor necrosis factor alpha, interleukin 1, interleukin 6, and gamma interferon in C3H/HeN and C57BL/6N mice in acute *Mycoplasma pulmonis* disease. *Infection and Immunity*, v.63, n.10, p.4084-4090, 1995.

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, n.2, p.163-176, 2005.

FEDDE, M.R. Relationship of structure and function of the avian respiratory system to disease susceptibility. *Poultry Science*, v.77, n.8, p.1130-1138, 1998.

FERNANDEZ-BERO, M.E.; KISSEL, V.; LION, H.; CABELLO, F.C. Virulence-related genes in CoIV plasmids of *Escherichia coli* isolated from human blood and intestines. *Journal of Clinical Microbiology*, v.28, n.4, p.742-746, 1990.

FERREIRA, A.J.P.; KNÖBIL, T. Colibacilose Aviária. In: BERCHIERI Jr., A.; MACARI, M. *Doenças das aves*. Campinas: FACTA, 2000, 505 p. Cap 4, p. 197-207.

FICKEN, M.D. Respiratory System. In: RIDDELL, C. *Avian Histopatology*. Pennsylvania: The American Association of Avian Pathologists, 1997. 234 p. cap. 6, p.89-109.

FIorentin, L.; MORES, M.A.Z.; TREVISOL, I.M.; ANTUNES, S.C.; COSTA, J.L.A.; SONCINI, R.A.; VIEIRA, N.D. Test profiles of broiler breeder flocks housed in farms with endemic *Mycoplasma synoviae* infection. *Brazilian Journal of Poultry Science*, v.5, n.1, p. 37-43, 2003.

FREIRE, R. *Imunologia dos Animais Domésticos: diagnóstico e controle*. Itaguaí: Universidade Rural, 1988, 141p.

FURLAN, R.L. Anatomia-Fisiologia. In: BERCHIERI Jr., A.; MACARI, M. *Doenças das aves*. Campinas: FACTA, 2000, 505 p. cap.2. seção 2.1, p.13-28

GABRIDGE, M.G.; ABRAMS, G.D.; MURPHY, W.H Lethal toxicity of *Mycoplasma fermentans* for mice. *The Journal of Infectious Diseases*, v.125, n.2, p. 153-160, 1972.

GARCIA, M.; IKUTA, N.; LEVISOHN, S.; KLEVEN, S.H. Evaluation and comparison of varios PCR methods for detection of *Mycoplasma gallisepticum* infection in chickens. *Avian Diseases*, v.49, n.1, p.125-132, 2005.

GESSULLI Perdigão investe em codornas. *Avicultura Industrial*, 09 agosto 2002. Disponível em: www.aviculturaindustrial.com.br/site/dinamica.asp?id=2331&tipo_tabela=produtos&categoria=codorna>. Acesso em: 09 julho 2007.

GIBBS, P.S.; MAURER, J.J.; NOLAN, L.K.; WOOLEY, E. Prediction of chicken embryo lethal.ity with the avian *Escherichia coli* traits complement resistance, colicin V production, and presence of increased serum survival. gene cluster (*iss*). *Avian Diseases*, v.47, n.2, p.370-379, 2003.

GONÇALVES, P.M.R. *Escherichia coli* com detecção do gene *iss* por PCR, micoplasmas e salmonelas na qualidade sanitária de frangos de corte ao abate. Niterói. 84f. Tese (Doutorado em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal) – Departamento de Tecnologia dos Alimentos (MTA) da Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2005.

GUY, J.S.; SMITH, L.G.; BRESLIN, J.J.; VAILLANCOURT, J.P.; BARNES, H.J. High mortality and growth depression experimentally produced in young turkeys by dual infection with enteropathogenic *Escherichia coli* and turkey coronavirus. *Avian Diseases*, v.44, n.1, p.105-113, 2000.

HARRINGTON, S.M.; DUDLEY, E.G.; NATARO, J.P. Pathogenesis of enteroaggregative *Escherichia coli* infection. *FEMS Microbiology Letters*, v.254, n.1, p.12-18, 2006.

HARRY, E.G. The association between the presence of septicaemia strains of *Escherichia coli* in the respiratory and intestinal tracts of chickens and the occurrence of colisepticaemia. *The Veterinary Record*, v.7, n.2, p. 35-40, 1965.

HAYTER, R.B.; BESCH, E.L. Airborne-particle deposition in the respiratory tract of chickens. *Poultry Science*, v.53, n.4, p.1507-1511, 1974.

HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; SNEATH, H.A.; STALEY, J.T.; WILLIAMS, S.T. Facultatively anaerobic Gram negative rods. In:___ *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9 ed, Bal.timore: William & Wilkins, 1994. 787 p. grupo 5, p.176-222.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Pesquisa Pecuária Municipal. (PPM) Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/pecua/default.asp?2=t&o=12>. Acesso em: 20 julho 2007.

JOHNSON, T.J.; GIDDINGS, C.W.; HORNE, S.M.; GIBBS, P.S.; WOOLEY, R.E.; SKYBERG, J.; OLAH, P, KERCHER, R.; SHERWOOD, J.S.; FOLEY, S.L.; NOLAN, L.K. Location of increased serum survival. gene and selected virulence traits on a conjugative R plasmid in an avian *Escherichia coli* isolate. *Avian Diseases*, v.46, n.2, p.342–352, 2002.

JOHNSON, J.R.; KUSKOWSKI, M.A.; SMITH, K.; O'BRIAN, T.T.; TATINI, S. Antimicrobial-resistant and extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in retail foods. *The Journal of Infectious Diseases*, v.191, n.7, p.1040-1049, 2005.

JOHNSON, J.R.; SANNES, M.R.; CROY, C.; JOHNSTON, B.; CLABOTS, C.; KUSKOWSKI, M.A.; BEMDER, J.; SMITH, K.E.; WINOKUR, P.L.; BELONGIA, E.A. Antimicrobial drug-resistant *Escherichia coli* from humans and poultry products, Minnesota and Wisconsin, 2002-2004. *Emerging Infections Diseases*, v.13, n.6, p. 838-845, 2007.

JOHNSON, T.J.; SIEK, K.E.; JOHNSON, S.J.; NOLAN, L.K. DNA sequence of a ColV plasmid and prevalence of selected plasmid-encoded virulence genes among avian *Escherichia coli* strains. *Journal of Bacteriology*, v.188, n.2, p.745-758, 2006.

JORDAN, F.T.W.; FORRESTER, C.A.; RIPLEY, P.H.; BURCH, D.G.S. In vitro and in vivo comparisons of valnemulin, tiamulin, tylosin, enrofloxacin, and lincomycin/spectinomycin against *Mycoplasma gallisepticum*. *Avian Diseases*, v.42, n.4, p.738-745, 1998.

JOYA, J.E.; TSUJI, T.; JACALNE, A.V.; ARITA, A.; TSUKAMOTO, T.; HONDA, T.; MIWATANI, T. Demonstration of enterotoxigenic *Escherichia coli* in diarrheic broiler chicks. *European Journal of Epidemiology*, v.61, n.1, p.88-90, 1990.

KAPER, J.B.; NATARO, J.P.; MOBLEY, H.L. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, v.2, n.2, p.123-40, 2004.

KARIUKI, S.; GILKS, C.; KIMARI, J.; MUYODI, J.; GETTY, B. HART, C.A. Carriage of potentially pathogenic *Escherichia coli* in chickens. *Avian Diseases*, v.46, n.3, p.721-724, 2002.

KLEVEN S.H. Mycoplasmosis. In: SAIF, Y.M.; BARNES, H.J.; FADLY, A.M.; GLISSON, J.R.; McDOULGALD, L.R.; SWAYNE, D.E. *Diseases of Poultry*. 11.ed. Iwoa: Iowa State Press, A Blackwell Publishing Company, 2003a, 1231 p., seção II, cap.22. p.719-721.

KLEVEN S.H. Mycoplasma synoviae infection. In: SAIF, Y.M. BARNES, H.J.; FADLY, A.M.; GLISSON, J.R.; McDOULGALD, L.R.; SWAYNE, D.E. *Diseases of Poultry*. 11.ed. Iwoa: Iowa State Press, A Blackwell Publishing Company, 2003b. 1231 p., seção II, cap.22. p.756-765.

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.

LAUERMAN, L.H.; REYNOLDS-VAUGHN, R.A. Immunoglobulin Fc receptors of *Mycoplasma synoviae*. *Avian Diseases*, v.35, n.1, p. 135-138, 1991.

LECLERC, B.; FAIRBROTHER, J.M.; BOULIANE, M.; MESSIER, S. Evaluation of the adhesive capacity of *Escherichia coli* isolates associated with avian cellulitis. *Avian Diseases*, v.47, n.1, p. 21-31, 2003.

LEY, D.H. Mycoplasma gallisepticum infection. In: SAIF, Y.M.; BARNES, H.J.; FADLY, A.M.; GLISSON, J.R.; McDOULGALD, L.R.; SWAYNE, D.E. *Diseases of Poultry*. 11.ed. Iwoa: Iowa State Press, A Blackwell Publishing Company, 2003. 1231 p., seção II, cap.22. p.722-744.

LEY, D.H.; McLAREN, J.M.; MILES, A.M.; BARNES, H.J.; MILLER, S.H.; FRANZ, G. Transmissibility of live *Mycoplasma gallisepticum* vaccine strains ts-11 and 6/85 from vaccinated layer pullets to sentinel poultry. *Avian Diseases*, v.41, n.1, p.184-194, 1997.

LOCKABY, S.B.; HOERR, F.J.; KLEVEN, S.H.; LAUERMAN, L.H. Pathogenicity of *Mycoplasma synoviae* in chicken embryos. *Avian Diseases*, v.43, n.2, p.331-337, 1999a.

LOCKABY, S.B.; HOERR, F.J.; LAUERMAN, L.H.; SMITH, B.F.; SAMOYLOV, A.M.; TOIVIO-KINNUCAN, M.A.; KLEVEN, S.H. Factors associated with virulence of *Mycoplasma synoviae*. *Avian Diseases*, v.43, n.2, p.251-261, 1999b.

MACARI, M.; GIVISIEZ, P.E.N. Fisiologia respiratória. In: ____ *Fisiologia Aviária aplicada a frangos de corte*. Jaboticabal: FUNEP/UNESP, 2002. 375 p. cap. 3. p. 37- 49.

MADRUGA, C.R.; ARAÚJO, F.R.; SOARES, C.O. *Imunodiagnóstico em Medicina Veterinária*. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2001, 360p.

MAROIS, C.; DUFOUR-GESBERT, F.; KEMPF, I. Polymerase chain reaction for detection of *Mycoplasma gallisepticum* in environmental samples. *Avian Pathology*, v.31, n.1, p.163-168, 2002.

MEAD, G.C. Microbiological quality of poultry meat: a review. *Brazilian Journal of Poultry Science*, v.6, n.3, p. 135 - 142 , 2004.

MENÃO, M.C.; FERREIRA, C.S.A.; CASTRO, A.G.M.; KNÖBL, T.; FERREIRA, A.J.P. Sorogrupos de *Escherichia coli* isolados de frangos com Doença Respiratória Crônica. *Arquivos do Instituto de Biologia*, v.69, n.4, p.15-17, 2002.

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.

MENSAH, G.A. e BRAIN, J.B. Deposition and clearance of inhaled aerosol in the respiratory tract of chickens. *Journal of Applied Physiology*, v53, n6, p.1423-1428, 1982.

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.

MOREIRA, E. Expansão à vista. *Safra – Revista do Agronegócio*, Goiânia-GO: ND Editora, ano VI, n.67, p.22-25, junho, 2005.

MONROY, M.A.R.; KNÖBL, T.; BOTTINO, J.A. Virulence characteristics of *Escherichia coli* isolates obtained from broiler breeders with salpingitis. *Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases*, v.28, n.1, p.1-15, 2004.

MURAKAMI, S.; MIYAMA, M.; OGAWA, A.; SHIMADA, J.; NAKANE, T. Occurrence of conjunctivitis, sinusitis and upper region tracheitis in japanese quail (*Coturnix coturnix*

japonica), possibly caused by *Mycoplasma gallisepticum* accompanied by *Cryptosporidium* sp. infection. *Avian Pathology*, v.31, n.4, p. 363-370, 2002.

NASCIMENTO, E.R. Micoplasmoses. In: BERCHIERI Jr., A.; MACARI, M. *Doenças das aves*. Campinas: FACTA, 2000, 505 p. cap.4, seção 4.4, p.217-224.

NASCIMENTO, E.R. NASCIMENTO, M.G.F.; POLO, P.A.; MENDONÇA, G.A.; FERRAZ, P.N. Diagnóstico de *Mycoplasma synoviae* por PCR em codornas. *Brazilian Journal of Poultry Science*, sup.1, p.61, 1998.

NASCIMENTO, E.R.; PEREIRA, V.L.A.; NASCIMENTO, M.G.F.; BARRETO, M.L. Avian Mycoplasmosis update. *Brazilian Journal of Poultry Science*, v.7, n.1, p.1-9, 2005.

NASCIMENTO, M.G.F; NASCIMENTO, E.R. Infectious sinusitis in coturnix quails in Brazil. *Avian Diseases*, v.30, n.1, p.228-230, 1986.

NASCIMENTO, E.R.; YAMAMOTO, R.; HERRICK, K.R.; TAIT, R.C. Polymerase Chain Reaction for detection of *Mycoplasma gallisepticum*. *Avian Diseases*, v.35, n.1, p.62-69, 1991.

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

NGELEKA, M.; HWAGA, J.K.P.; WHITE, D.G.; WHITTAM, T.S.; RIDDELL, C.; GOODHOPE, R.; POTTER, A.A.; ALLAN, B. *Escherichia coli* cellulitis in broiler chickens: clonal relations among strains and analyse of virulence-associated factors of isolates from diseased birds. *Infection and Immunity*, v.64, n.8, p.3118-3126, 1996.

NOLAN L.K., GIDDINGS, C.W.; HORNE, S.M.; DOETKOTT, C.; GIBBS, P.S.; WOOLEY, R.E.; FOLEY, S.L. Complement resistance, as determined by viable count and flow cytometric methods, and its association with the presence of iss and the virulence of avian *Escherichia coli*. *Avian Diseases*, v.46, n.2, p.386-392, 2002.

OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES (OIE) - World Organization for Animal Health. Animal diseases data - OIE listed diseases, 2007. Disponível em: <http://www.oie.int/eng/maladies/en_classification2007.htm?eld7> Acesso em: 12 dezembro 2007.

OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES (OIE) – World Organization for Animal Health. World Animal Health Information Database (WAHID). Disponível em:<<http://www.oie.int/wahidprod/public.php>>. Acesso em: 02 janeiro 2007.

OLIVEIRA, D.D.; FOLGUERAS – FLATSCHART, A.V.; FLATSCHART, R.B.; RESENDE, J.S.; ABREU, J.T.; MARTINS, N.R.S. ELISA indireto para detecção de IgG antívirus da doença de Newcastle em soro de codorna. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.59, n.5, p. 1344-1347, 2007.

OLIVEIRA, E.G.; ALMEIDA, M.I.M.; MENDES, A.A; VEIGA, N.; DIAS, K. Desempenho produtivo de quatro grupos genéticos de codornas (*Coturnix* sp.) para corte. *Archives of Veterinary Science*, v.10, n.3, p.33-37, 2005a.

OLIVEIRA, E.G.; ALMEIDA, M.I.M.; MENDES, A.A.; ROÇA, R.O.; VEIGA, N. Avaliação sensorial de carne de codornas para corte, abatidas aos 35, 56 e 77 dias de idade. *Veterinária e Zootecnia*, v.12, n.1/2, p.61-68, 2005b.

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

PÉREZ, F.P. *Coturnicultura: Tratado de cria y explotación industrial de codornices*. Zaragoza: Editorial Científico-Médica, 1966. 375 p.

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.

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.

QUINN, P.S.; CARTER, M.E.; MARVEY, B.; CARTER, G.R. *Clinical Veterinary Microbiology*. London: Wolfe Publishing, 1998, 648 p.

RAZIN, S.; YOGEV, D.; NAOT, Y. Molecular Biology and pathogenicity of Mycoplasmas. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v.62, n.4, p.1094-1156, 1998.

REINGOLD, J.; STARR, N.; MAURER, J.; LEE, M.D.; KUHNERT, P.; BOERLIN, P.; FREY, J. Identification of a new *Escherichia coli* hemolysin homolog in avian *Escherichia coli*. *Veterinary Microbiology*, v.66, n.2, p.125-134, 1999.

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

ROY, P.; PURUSHOTHAMAN, V.; KOTEESWARAN, A.; DHILLON, A.S. Isolation, characterization, and antimicrobial drug resistance pattern of *Escherichia coli* isolated from Japanese quail and their environment. *Journal of Applied Poultry Research*, v.15, n.3, p.442-446, 2006.

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*. New York/USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, 859 p.

SANTIN, E.; LIMA, F.S.; PAULILLO, A.C.; NAKAGHI, L.S.O.; MAIORKA, A. The use of electron microscopy in postvaccinal evaluation of tracheal epithelium of *Coturnix coturnix japonica*. *Ciência Rural*, v.33, n.1, p.121-124, 2003.

SANTOS, C.H.C; SILVA, E.N. Métodos de diagnósticos laboratoriais microbiológicos e sorológicos. In: BERCHIERI Jr., A.; MACARI, M. *Doenças das aves*. Campinas: FACTA, 2000, 505 p. cap.3, p.171-182.

SCALETSKY, I.C.A.; FABBRICOTTI, S.H.; SILVA, S.O.C.; MORAIS, M.B.; FAGUNDES-NETO, U. Hep-2 adherent *Escherichia coli* strains associated with acute infantile diarrhea, São Paulo, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, v.8, n.8, p.855-858, 2002.

SERVIN, A.L. Pathogenesis of Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, v.18, n.2, p.264-292, 2005.

SHARMA, J.M. The Avian Immune System. In: SAIF, Y.M. BARNES, H.J.; FADLY, A.M.; GLISSON, J.R.; McDOULGALD, L.R.; SWAYNE, D.E. *Diseases of Poultry*. 11.ed. Iwoa: Iowa State Press, A Blackwell Publishing Company, 2003. 1231 p., cap.4. p.3-60.

SILVA, G.M. Estudo dos fatores de patogenicidade e origens de amostras de *Escherichia coli* isoladas de pintos com um dia de idade (*Gallus gallus*, LINNAEUS, 1758) apresentando um quadro de onfalite. São Paulo, 1993. 138f. Tese (Doutorado em Patologia Experimental e Comparada) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, USP, São Paulo, 1993.

SILVA, P.L.; COELHO, H.E.; RIBEIRO, S.C.; OLIVEIRA, P.R.. Occurrence of coligranulomatosis in coturnix quail in Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. *Avian Diseases*, v.33, n.3, p.509-513, 1989.

SKYBERG, J.A.; HORNE, S.M.; GIDDINGS, C.W.; WOOLEY, R.E.; GIBBS, P.S.; NOLAN, L. Characterizing avian *Escherichia coli* isolates with multiplex polymerase chain reaction. *Avian Diseases*, v.47, n.4, p.1441-1447, 2003.

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.

SMITH, J.L.; FRATAMICO, P.M.; GUNTHER, N.W. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Foodborne Pathogens and Disease*, v.4, n.2, p.134-163, 2007.

SOUZA, E.C.; MARTINEZ, M.B.; TADDEI, C.R.; MUKAI, L. GICLIO, A.E.; RACZ, M.L.; SILVA, L.; EJZENBERG, B.; OKAY, Y. Perfil etiológico das diarreias agudas de crianças atendidas em São Paulo. *Jornal de pediatria*, v.78, n.1, p.31-38, 2002.

STEHLLING, E.G.; TOMOMASA, Y.; BROCCHI, M.; SILVEIRA, W.D. Characterization of a plasmid-encoded adhesin of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) strain isolated from a case of Swollen Head Syndrome (SHS). *Veterinary Microbiology*, v.95, n.2, p.111-120, 2003.

STEINLAGE, S.J.; FERGUSON, N.; SANDER, J.E. ; GARCIA, M. ; SUBRAMANIAN, S. ; LEITING, V.A. ; SILLEVEN, S.H. Isolation and characterization of a 6/85 like *Mycoplasma gallisepticum* from commercial laying hens. *Avian Diseases*, v.47, n.2, p.499-505, 2003.

TAMEHIRO, C.Y.; MURAKAMI, A.E.; BRITO, B.G.; TAGLIARI, K.C.; SAKAMOTO, M.I.; SOUZA, L.M.G. Níveis de vitamina E na dieta de codornas japonesas (*Coturnix*

coturnix japonica) sobre a resposta celular após inoculação com *Escherichia coli*. *Brazilian Journal of Poultry Science*, sup.7, p.218, 2005.

THRUSFIELD, M. *Epidemiologia Veterinária*. São Paulo: Roca, 1995, 558 p.

TIONG, S.K. Isolation of *Mycoplasma gallisepticum* from sinusitis of three quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Veterinary Record*, v.103, n.24, p. 539, 1978.

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

TOLEDO, M.R.F.; FONTES, C.F.; TRABULSI, L.R. MILi – Um meio para a realização dos testes de motilidade, indol e lisina descarboxilase. *Revista Microbiológica*, v.13, n.3, p. 230-235, 1982a.

TOLEDO, M.R.F.; FONTES, C.F.; TRABULSI, L.R. EPM – Modificação do meio de Rugai e Araújo para a realização simultânea dos testes de produção de gás a partir da glicose, H₂S, urease e triptofano desaminase. *Revista Microbiológica*, v.13, n.4, p.309-315, 1982b.

TORTORA, G.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. *Introducción a la Microbiología*. Zaragoza: Acríbia, 1994, p.792.

TOTH, T.E.; PYLE, R.H.; CACECI, T.; SIEGEL, P.B.; OCHS, D. Cellular defense of avian respiratory system: Influx and nonopsonic phagocytosis by respiratory phagocytes activated by *Pasteurella multocida*. *Infection and Immunity*, v.56, n.5, 1988.

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

TÜRKYILMAZ, S.; ÇÖVEN, F.; ESKIIZMIRLILER, S. Detection of antibodies produced in quail (*Coturnix coturnix japonica*) against *Mycoplasma gallisepticum* with different serological. tests. *Turkey Journal of Veterinary Animal. Science*, v.31, n.4, p.267-270, 2007.

VARNAM, A.H.; EVANS, M.G. Identification of foodborne pathogenic micro-organisms. In: _____. *Foodborne Pathogens: an illustrated text*. London: Manson Publishing, 1996, 557 p. cap.3, p.27-50.

VIEIRA, M.I. Codorna doméstica: muito ovo, ótima carne, bastante lucro. São Paulo. Ed. Nobel, 1988, 110p.

WHITFORD, H.W.; ROSENBUSCH, R.F.; LAUERMAN, L.H. *Mycoplasmosis in animals: Laboratory diagnosis*. Ames: Iowa State Press, 1994. 172 p.

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.

WILLIAMS, P.H.; CARBONETTI, N.H. Iron, siderophores, and pursuit of virulence: independence of aerobactin and enterochelin iron uptake systems'n. *Infection and Immunity*, v.51, n.3, p.942-947, 1986.