

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA  
CURSO DE MESTRADO**

**COLIFORMES TOTAIS E *Escherichia coli* EM AMOSTRAS DE  
CELULITE E FÍGADO DE FRANGO E IDENTIFICAÇÃO DE GENES  
DE VIRULÊNCIA**

**MAYKSON COSTA DE JESUS**

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA  
MARÇO-2015**

**COLIFORMES TOTAIS E *Escherichia coli* EM AMOSTRAS DE  
CELULITE E FÍGADO DE FRANGO E IDENTIFICAÇÃO DE GENES  
DE VIRULÊNCIA**

**MAYKSON COSTA DE JESUS**

NUTRICIONISTA

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2010

Dissertação submetida ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e Embrapa Mandioca e Fruticultura, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Microbiologia Agrícola.

Orientadora: Dr<sup>a</sup> Isabella de Matos Mendes da Silva

Co-Orientador: Mcs Ricardo Mendes da Silva

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA**

**MARÇO-2015**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA  
AGRÍCOLA  
CURSO DE MESTRADO**

**COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE  
MAYKSON COSTA DE JESUS**

---

Profª Drª Isabella de Matos Mendes da Silva  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRB  
(Orientadora)

---

Profª Drª Tatiana Pacheco Rodrigues  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRB

---

Prof. Dr Geógenes da Silva Gonçalves  
Faculdade de Tecnologia e Ciências

# ÍNDICE

**RESUMO**

**ABSTRACT**

**INTRODUÇÃO .....9**

**CAPITULO 1- Revisão de literatura.....12**

Resumo .....13

Abstract .....13

A Avicultura industrial e a inspeção de aves no Brasil .....15

A celulite aviária como indicadora de contaminação sistêmica .....16

A importância do fígado na cadeia produtiva de frangos de corte.....18

Coliformes totais e *Escherichia coli* como indicadores de qualidade sanitária de produtos avícolas .....20

**REFERÊNCIAS.....26**

**CAPÍTULO 2 .....32**

Elevada prevalência de Coliformes Totais e *Escherichia coli* patogênica em amostras de celulite de frango e corte.....33

Resumo .....33

Abstract .....34

Introdução .....35

Metodologia.....36

Quantificação de coliformes totais e *Escherichia coli* .....37

Pesquisa de genes de virulência de patótipos de *Escherichia coli* .....37

Resultados e Discussão.....	39
Conclusão .....	44
Referências .....	45
<b>CAPÍTULO 3.....</b>	<b>51</b>
Qualidade sanitária de fígados de frangos de um matadouro avícola e genes de virulência de <i>Escherichia coli</i> .....	52
Resumo. ....	52
Abstract. ....	53
Introdução .....	54
Metodologia.....	56
Quantificação de coliformes totais e <i>Escherichia coli</i> .....	56
Pesquisa de genes de virulência de patótipos de <i>Escherichia coli</i> .....	56
Resultados e Discussão.....	58
Conclusão .....	61
Referências .....	62
<b>Considerações Finais .....</b>	<b>69</b>

## RESUMO

### **JESUS, M.C. Coliformes totais e *Escherichia coli* em amostras de celulite e fígado de frango e identificação de genes de virulência de patótipos de *Escherichia coli***

A produção mundial de frango vem crescendo acentuadamente no decorrer dos anos. Apesar dos avanços empregados na produção, as enfermidades cutâneas constituem uma das principais causas que levam a rejeição parcial ou total das carcaças de frango em matadouros. Salienta-se que o tecido lesado representa uma porta de entrada para uma infecção sistêmica, atingindo órgãos internos, como coração e fígado. Este trabalho teve como objetivo determinar a população de Coliformes Totais e *Escherichia coli* (*E. coli*) em amostras de celulite e fígado de frangos, além de pesquisar os genes de virulência para os patótipos de *E.coli*, EHEC (*stx*), EPEC (*bfpA*) e APEC (*iss*). Foram selecionadas da linha de produção 100 carcaças com lesões cutâneas, entre os meses de agosto de 2013 a janeiro de 2014. A determinação da população de Coliformes Totais e *Escherichia coli* (*E. coli*) foi realizada por meio de método rápido de contagem em placas Petrifilm™ (3M Company), utilizando a placa Petrifilm EC. Para a caracterização genotípica, as colônias características de *E.coli* foram inoculadas em microtubo contendo o caldo Brain Heart Infusion (BHI), sendo posteriormente adicionado glicerol a 15 % e as amostras armazenadas a -20° C para posterior extração de DNA, o qual padronizado a uma concentração de 50 nmol/μL. Para a realização da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), partindo das cepas de *Escherichia coli* isoladas das celulites e fígado de frango, pesquisaram-se os genes de virulência associados aos patótipos APEC, EHEC e EPEC. Os Coliformes Totais foram detectados em 96 % das amostras na celulite, com população entre 3,4 a 9,5 log UFC/g. No fígado foi constatada a prevalência de Coliformes Totais de 74%, com contagem entre 1,0 a 4,78 log UFC/g. Em 84 % das amostras de celulite foi verificada a presença de *E.coli*, com população entre 2,0 a 9,0 log UFC/g. Nas amostras de fígado, *E. coli* foi isolada em 45 % dos casos, com população entre 1,0 a 4,73 log UFC/g. As reações dos genes *stx* e *bfpA* não amplificaram. O gene *iss* obteve

uma prevalência de 85,7% nos isolados de *E.coli* da celulite e 64,4% dos isolados do fígado. A população elevada de Coliformes Totais nas amostras de celulite e fígado determina que falhas higiênico-sanitárias graves ocorrem na produção dos frangos, possivelmente nos aviários. Considerando a elevada prevalência de *E. coli* nas amostras de celulite avaliadas, o consumo da carne de frango caracteriza-se como risco à saúde pública. Em relação a contagem desta bactéria nos fígados, as amostras estavam aptas para o consumo segundo a legislação vigente. A identificação do gene *iss* na grande maioria dos isolados de *E.coli* oriundos de celulite e fígado, sugere que esse gene possui grande importância na patogenicidade para aves, podendo representar um risco para os comensais, haja vista o potencial zoonótico da bactéria.

**Palavras chave:** Lesão Cutânea, Segurança dos Alimentos, Aves, *Escherichia coli*, Inspeção Sanitária

## ABSTRACT

### **JESUS, M.C. Total coliforms and *Escherichia coli* in cellulitis and poultry liver samples and identification of virulence genes in *Escherichia coli* pathotype**

Chicken world production has increased sharply over the years. Despite advances used in the production, skin diseases are a major cause leading to partial or full rejection of chicken carcasses in slaughterhouses. It should be noted that the injured tissue represents a gateway to a systemic infection, affecting internal organs such as heart and liver. This study aimed to determine the population of Total Coliforms and *Escherichia coli* (*E. coli*) in cellulite and liver samples of chickens, besides researching for virulence genes to pathotypes of *E. coli*, EHEC (*stx*), EPEC (*bfpA*) and APEC (*iss*). Were selected the production line 100 carcasses with skin lesions, and sampled cellulitis and liver lesions to perform the microbiological and molecular analyzes. The population of coliforms and *E. coli* was performed by rapid method to count Petrifilm™ Plates (3M Company) using Petrifilm EC card. For genotypic characterization of the characteristics of *E. coli* colonies were inoculated into microtube containing Brain Heart Infusion broth (BHI) and then added 15% glycerol and the samples stored at -20° C for later DNA extraction, which standardized to a concentration of 50 nmol/μL. To perform the Polymerase Chain Reaction (PCR), starting strains of *E. coli* isolated from cellulitis and chicken liver, researched up them virulence genes associated with pathotypes APEC, EHEC and EPEC. The Total Coliforms were detected in 96% of samples in cellulite, with a population between 3,4 to 9,5 log UFC / g. In the liver was found the prevalence of Total Coliforms 74%, with counts between 1,0 to 4,78 log UFC/g. In 84% of cellulite samples was verified the presence of *E. coli*, with population between 2,0 to 9,0 log UFC/g. Liver samples in *E. coli* was isolated in 45% of cases, with population between 1,0 to 4,73 log UFC/g. The reactions of *stx* genes and *bfpA* not amplified. The *iss* gene obtained a prevalence of 85,7% in *E. coli* isolates of cellulite and 64,4% of the isolates of the liver. The high population of Total Coliforms in cellulitis and liver samples determines that serious hygienic



sanitary failures occur in the production of chickens, possibly in aviaries. Considering the high prevalence of *E. coli* in samples evaluated cellulite, consumption of chicken meat is characterized as the risk to public health. Regarding the count of these bacteria in the liver, the samples were suitable for consumption according to current legislation. The identification of the *iss* gene in most isolates of *E. coli* come from cellulite and liver, suggesting that this gene plays important role in pathogenicity for birds, which may represent a risk to the diners, considering the zoonotic potential of bacteria.

Keywords: Cutaneous Lesions, Food Security, Kid Poultry, Pathogenic *Escherichia coli*, Sanitary Inspection

## INTRODUÇÃO

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

A grande necessidade de investimentos na produção alimentícia alavancou a avicultura brasileira. A alta qualidade proteica, baixo custo em relação a outros tipos de carnes, melhoramento genético, melhoramento da alimentação, instalações e processamento, são alguns dos fatores que contribuem para esse crescimento (JACOBSEN; FLÔRES, 2008).

O Brasil é o terceiro maior produtor de frango do mundo, ficando atrás apenas de Estados Unidos da América e China, e o maior exportador de carne de frango do mundo, tendo exportado 3.918.000 toneladas, no ano de 2013. Seu consumo mesmo ano foi em média de 41,8 kg por pessoa (ABEF, 2015).

Entre os criadores de frango no Brasil, o estado do Paraná lidera o *ranking* seguido por Santa Catarina e, posteriormente, Rio Grande do Sul (ABEF, 2015). A Bahia ocupa a décima colocação em relação aos produtores brasileiros, porém foi o segundo maior produtor do nordeste no ano de 2010, com uma produção de 240.000 toneladas de frango (ABA, 2015).

A alta produtividade da avicultura brasileira se deve à característica de ser uma atividade economicamente eficiente, com altos índices zootécnicos (viabilidade, conversão alimentar e ganho de peso). Esses fatores associados ao baixo custo de produção, boa qualidade dos produtos e um elevado *status* sanitário, permitem uma alta competitividade da carne de frango brasileira (JACOBSEN; FLÔRES, 2008).

Apesar da grande e crescente produção avícola brasileira nos últimos anos, a sanidade das aves ainda é considerada um problema da produção. As

enfermidades cutâneas constituem uma das principais causas que levam a rejeição parcial ou total das carcaças de frango em matadouros, o qual gera grande prejuízo (SANTANA et al., 2008).

Mesmo com todo o investimento tecnológico utilizado na avicultura que garanta a sanidade dos produtos, falhas podem gerar contaminação ou inadequação do consumo deste tipo de carne. A produção veloz e intensa demanda uma maior e melhor fiscalização, uma vez que pequenas falhas podem gerar prejuízos à saúde dos consumidores em todo o mundo (BARROS et al., 2012).

Dentre as falhas de manejo observadas está a contaminação dos frangos associada a arranhões na pele no período de crescimento, que pode gerar a celulite (XAVIER, et al., 2010). A lesão é caracterizada por uma inflamação purulenta no tecido subcutâneo, principalmente na sobrecoxa e abdômen (BARNES; NOLAN; VAILLANCOUT, 2003). Salienta-se que o tecido lesado representa uma porta de entrada para uma infecção sistêmica, atingindo órgãos internos, como coração e fígado (VIEIRA et al., 2006).

O fígado constitui um órgão susceptível a contaminação e proliferação de várias espécies microbianas devido à sua característica metabólica (BARCELOS et al., 2006). Existe relato da presença da *E. coli* associada a processos infecciosos nesse órgão e ocasionando celulite em aves aparentemente saudáveis (VIEIRA et al., 2014).

Esse micro-organismo é responsável por infecções entéricas e extra-intestinais, sendo considerado um agente etiológico de infecções invasivas no homem e animais (RON, 2006). Desta forma, sua presença em celulite de frango representa um risco à saúde coletiva, uma vez que o mesmo pode ser disseminado na cadeia produtiva (BARROS et al., 2013; VIEIRA et al., 2006).

Este trabalho foi dividido em três capítulos, a revisão de literatura está representada no primeiro capítulo, abordando aspectos importantes acerca da

avicultura, a inspeção de aves e seus contaminantes e sobre os Coliformes Totais e a *E.coli*.

O segundo e terceiro capítulos, em forma de artigo, relatam os resultados da pesquisa de Coliformes Totais, *E. coli* e genes de virulência da *E. coli*, em amostras de celulite e fígado de frango.

## **CAPITULO 1**

**Revisão de Literatura:** A avicultura industrial e a inspeção de aves no Brasil

**Resumo-** Apesar da grande e crescente produção avícola brasileira nos últimos anos, a sanidade das aves ainda é considerada um problema da produção. As enfermidades cutâneas constituem uma das principais causas que levam a rejeição parcial ou total das carcaças de frango em matadouros. Dentre as enfermidades cutâneas destaca-se a celulite, que é uma lesão caracterizada por uma inflamação purulenta no tecido subcutâneo, principalmente na sobrecoxa e abdômen. Salienta-se que o tecido lesado representa uma porta de entrada para uma infecção sistêmica, atingindo órgãos internos, como coração e fígado. O fígado constitui um órgão susceptível a contaminação e proliferação de várias espécies microbianas devido à sua característica metabólica. Estudos relatam a presença da *Escherichia coli* (*E. coli*) associada a processos infecciosos nesse órgão e ocasionando celulite em aves aparentemente saudáveis. Esse microorganismo é responsável por infecções entéricas e extra-intestinais, sendo considerado um agente etiológico de infecções invasivas no homem e animais. A infecção localizada ou sistêmica causada pela *E.coli* em aves, pode ser chamada de Colibacilose. As cepas patogênicas podem acarretar doenças no hospedeiro por meio de muitos fatores de virulência, como adesinas, sistema de captação de ferro, capsula, resistência ao soro, toxinas, evasinas e invasinas. Dentre os fatores de virulência da *E. coli* patogênica para aves (APEC), o gene *iss*, determina a patogenicidade de espécie *E.coli* para aves, sendo geralmente encontrado em celulite aviária. Sua presença nas lesões confere um risco do surgimento de doenças em seres humanos, relacionadas ao consumo do frango.

## **ABSTRACT**

Food consumption has increased sharply over the years. The concern of accelerated food production, due to high demand from the world population growth, boosted investments in the food industry. This great need leveraged the Brazilian poultry industry. Brazil is the third largest chicken producer in the world, behind only the United States of America and China, and the largest exporter in

the world chicken meat. Bahia occupies the tenth place in relation to Brazilian producers. Despite the large and growing Brazilian poultry production in recent years, the health of the birds is still considered a problem in production. Skin diseases are a major cause leading to partial or full rejection of chicken carcasses in slaughterhouses. Among skin diseases stands out cellulite, which is a disease characterized by a purulent inflammation of the subcutaneous tissue, especially in the thigh and abdomen. Please note that the injured tissue represents a gateway to a systemic infection, affecting internal organs such as heart and liver. The liver is an organ susceptible to contamination and proliferation of various microbial species due to its metabolic trait. Studies have reported the presence of *Escherichia coli* (*E. coli*) associated with infectious processes that organ and causing cellulite in apparently healthy birds. This micro-organism is responsible for enteric infections and extra-intestinal and is considered an etiologic agent of invasive infections in humans and animals. Thus, their presence in cellulite and chicken liver is a risk to public health, since it can be spread in the production chain. The localized or systemic infection caused by *E. coli* in birds, can be called Colibacillosis and implications associated with this pathogen include colisepticemia, respiratory diseases, swollen head syndrome, coligranuloma, peritonitis, cellulitis, salpingitis and others. Pathogenic strains can cause disease in the host by means of many virulence factors, including adhesins, iron uptake system, capsule, serum resistance, toxins, invasins and evasinas. Among the virulence factors of pathogenic *E. coli* to birds (APEC), the *iss* gene determines the kind of pathogenic *E. coli* to birds, usually found in avian cellulitis. Its presence confers a risk of lesions of the disease onset in humans, related to the consumption of chicken.

## **A Avicultura industrial e a inspeção de aves no Brasil**

Assim como qualquer atividade que se expande, a avicultura, principalmente a industrial, passa por vários desafios, entre eles a necessidade de produção de excelente qualidade. Fatores como tipos de criação e manejo comprometem a qualidade do frango de corte e induz a condenação parcial ou total das carcaças (ANDRADE et al., 2006).

A portaria 210, de 10 de novembro de 1998, do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento do Brasil, foi criada para regulamentar a inspeção tecnológica e higiênico-sanitária de carne de aves, descrevendo o esquema de trabalho do Serviço de Inspeção Federal, para o abate e a industrialização das aves. Nesta inspeção são realizados exames macroscópicos de carcaça e vísceras e, quando necessário, palpação ou cortes. A etapa de inspeção pode ser realizada por profissionais treinados, mas a determinação final do destino da carcaça ou vísceras é exclusivamente responsabilidade do médico veterinário (BRASIL, 1998).

Salienta-se que durante a criação das aves ocorrem falhas que são evidenciadas na inspeção *post-mortem*. Após a escaldagem e depenagem, a observação de descoloração e engrossamento da pele, além da inflamação do tecido subcutâneo, podem caracterizar a inadequação da carcaça (NORTON et al., 1999). A condenação parcial da carcaça de frango é determinada pela presença de inflamação local ou de algum órgão e a condenação total ocorre se existir inflamação de caráter sistêmico em carcaça ou vísceras (BRASIL, 1998)

A inflamação geralmente é decorrente da contaminação microbiana, sendo que o número de micro-organismos pode ser influenciado pelas condições higiênicas do abate e processamento, sendo as próprias aves responsáveis pela contaminação inicial (CARVALHO et al., 2005).

Em um estudo desenvolvido por Vieira et al., (2014), foi verificada a presença da *E. coli* em amostras de celulite e fígado de frango em 11 das 50 amostras analisadas. Guastalli et al., (2010), verificaram contaminação pela mesma bactéria em aves com um dia de idade.



A bactéria *E. coli* tem sido isolada concomitantemente da celulite e de pelo menos um outro órgão, como fígado e coração (VIEIRA et al., 2014). A contaminação pode ser determinada clinicamente pela presença de alguns fatores ambientais, como gases irritantes (principalmente a amônia), umidade da cama, poeira e variação climática (ANDREATTI FILHO, 2006).

Rodrigues et al (2008) afirmam que a possível contaminação do fígado ocorre devido à exposição das vísceras (eventração) de forma inadequada, indicando falhas na condição higiênica de manipulação, o que confere risco a saúde do consumidor.

Um estudo realizado por Silva et al. (2012), em dois matadouros do Recôncavo da Bahia, constataram que 28 das 62 amostras de fígado analisadas estavam contaminadas por *E. coli*, e destas, 18 não possuíam alteração macroscópica estando, desta forma, aptos para o consumo, considerando a legislação sanitária vigente.

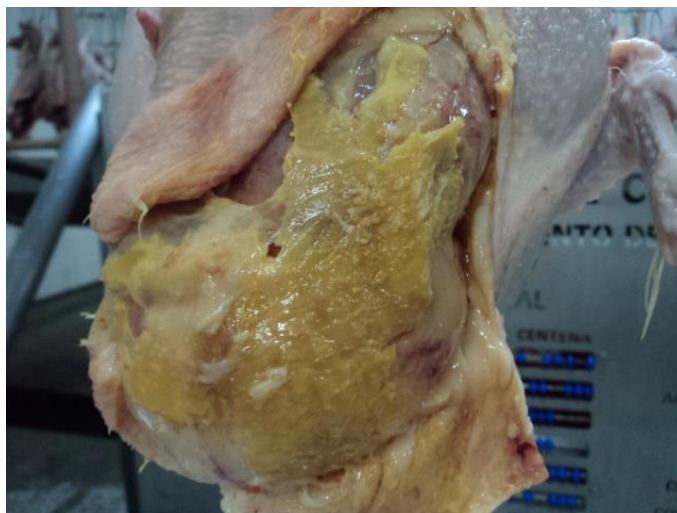
### **A celulite aviária como indicadora de contaminação sistêmica**

A celulite é caracterizada pela inflamação purulenta, aguda e difusa, que ocorre no tecido subcutâneo profundo formando placas fibrinocaseosas, sendo a principal determinante da contaminação sistêmica do frango. Essa inflamação é localizada principalmente na região do abdômen e sobrecoxa, devido a arranhões sofridos durante o seu desenvolvimento (BARNES; NOLAN; VAILLANCOUT, 2003). A celulite funciona como a porta de entrada de micro-organismos, favorecendo a contaminação de vários órgãos como fígado, coração, sacos aéreos e ossos (VIEIRA et al., 2006).

As lesões sofridas durante o crescimento permitem a penetração dos micro-organismos. Uma vez instalados, os invasores são fagocitados pelo sistema imunológico do hospedeiro, porém não são plenamente eliminados, visto que o organismo das aves não dispõe de um arsenal bioquímico adequado, induzindo,

deste modo, a infecção e posterior formação da celulite (BRITO et al., 2002) (Figura 1).

Figura 1: Lesão de celulite localizada na região ventral do frango de corte, oriundo de matadouro avícola do Recôncavo Sul da Bahia



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

Ao analisar a presença de *E. coli* como agente causal da celulite aviária em frangos de corte inspecionados em um matadouro de São Paulo, Andrade et al. (2006) encontraram 76,6% de contaminação por *E. coli*. Corroborando com esse achado, Vieira et al. (2006) encontraram 100% de contaminação por *E. coli* em celulite de frango proveniente de um matadouro do Rio de Janeiro sob Inspeção Estadual.

## A importância do fígado na cadeia produtiva de frangos de corte

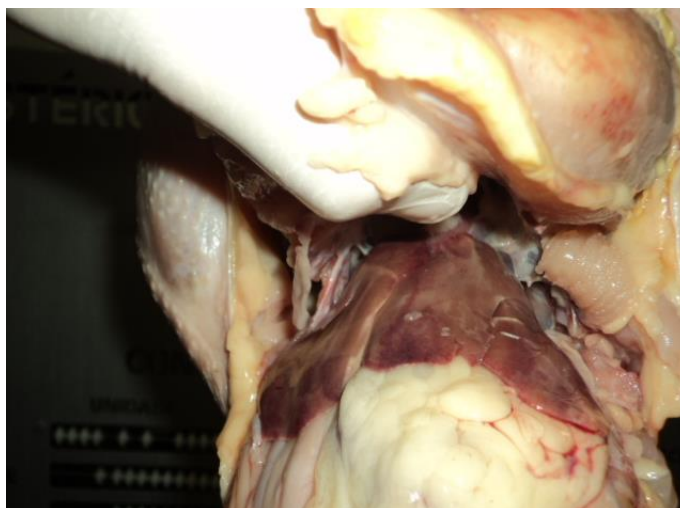
Devido ao menor preço em comparação a carne bovina e uma boa qualidade proteica de sua carne, o frango e seus miúdos, como o fígado, vêm se tornando cada vez mais presentes a mesa da população em geral (ESPOSITO et al., 2009).

O fígado é o maior órgão globuloso do abdômen do frango, possui coloração marrom escuro e consistência firme quando a ave é adulta e uma coloração amarelada em aves jovens. Esse órgão é dividido em dois lóbulos, o lado direito possui um maior volume e o esquerdo possuindo uma divisão secundária. Esse órgão possui inúmeras funções como, metabólica, desintoxicação, biossíntese e digestão (SAVIANE, 2009).

Devido seu caráter metabólico, o conhecimento das características do fígado é de fundamental importância para determinar a qualidade da carne das aves, pois algumas lesões podem indicar importantes informações sobre processos patológicos (RANDALL; REECE, 1996).

As lesões hepáticas (Figura 2) podem fornecer informações a respeito de ocorrência de doenças sistêmicas. Inúmeras alterações podem acometer o fígado devido a doenças infecciosas, toxicoses, distúrbios circulatórios e neoplasias (HOERR, 1996).

Figura 2: Fígado de frango oriundo de matadouro avícola do Recôncavo sul da Bahia apresentando áreas pálidas, características de lesão hepática.



Em necropsia de aves, quando a cavidade abdominal é aberta, o fígado é o primeiro e maior órgão visto. Esse órgão usualmente é utilizado para realizar análises que determinam a condenação total da carcaça de frango, caso exista uma lesão suspeita de contaminação por micro-organismos patogênicos (RANDALL; REECE, 1996). Segundo a RDC nº 210 de 1998, aspecto visual (cor, tamanho e forma) e de consistência e odor, são analisados como critérios de descarte deste órgão (BRASIL, 1998).

Tais condenações, sendo carcaça ou vísceras, visam zelar pela saúde pública, visto que produtos de origem animal, incluindo frango e seus subprodutos são importantes fontes de enfermidades transmitidas por alimentos (JAY, 1994).

A Resolução RDC 12, de 2 de janeiro de 2001 determina o limite máximo permitido de Coliformes a 45° C de 10<sup>5</sup> UFC por grama para que o fígado de frango seja considerado apto para o consumo humano (BRASIL, 2001). Salienta-se que a bactéria *E. coli* representa o principal Coliforme Termotolerante, conforme Franco e Landgraf (2008).

Em um estudo desenvolvido por Vieira et al. (2014), com celulite e fígado de frangos de um matadouro, foi encontrada a presença da *E.coli* em 50,98% das amostras de fígado analisadas. Resultado semelhante foi encontrado por Silva et al. (2012), que ao analisar a contaminação por *E.coli* em fígados de dois matadouros do Recôncavo da Bahia, encontrou uma contaminação em 28 dos 62 fígados analisados.

Guastalli et al., (2010), ao analisarem a presença da *E.coli* em fígados de aves de postura com um dia de idade, encontraram contaminação em 15 dos 32 lotes analisados e concluíram que aves portadoras de *E.coli* patogênicas, podem funcionar de veículo para o ambiente e comprometer a saúde de outras aves no mesmo aviário. Essa bactéria é responsável por quadros clínicos, como septicemia e óbito em pintos (BARNES; VAILLANCOURT; GROSS, 2003).

Barcelos et al. (2006), em um estudo realizado com 100 fígados de frango, sendo 90 condenados por apresentarem alterações e 10 liberados por ausência

de alteração, isolaram *E.coli* em 24 das 90 amostras condenadas e 2 das 10 amostras liberadas.

### **Coliformes Totais e *Escherichia coli* como indicadores de qualidade sanitária de produtos avícolas**

Segurança e qualidade de alimento é uma atual preocupação mundial. A presença de perigos (químicos, físicos e microbiológicos) em alimentos, pode representar riscos potencialmente capazes de causar efeitos nocivos à saúde humana (VEIGA et al., 2009).

Para a determinação da qualidade de alimentos, alguns fatores, como a verificação da presença de micro-organismos, são imprescindíveis (CUNHA; SILVA, 2006). Segundo Franco e Landgraf (2008), a avaliação microbiológica é um parâmetro na determinação da qualidade do alimento e sua negligência pode gerar riscos a saúde pública.

Os principais grupos de micro-organismos encontrados em alimentos são os fungos e as bactérias (SCAPIN, 2011) e sua presença pode ser devido a microbiota intrínseca ao alimento ou oriundos de contaminação posterior. Sendo assim, o tipo e a carga microbiana permitem determinar a qualidade microbiológica dos mesmos (CUNHA; SILVA, 2006).

Alguns micro-organismos são denominados indicadores e considerados relevantes na avaliação da segurança e da qualidade microbiológica dos alimentos. Estes microrganismos, quando presentes em um alimento, podem fornecer informações sobre as condições sanitárias e a possibilidade de contaminação por patógenos (SILVA, 2002).

De acordo com Oliveira e Salvador (2011), dentro do grupo de micro-organismos indicadores da qualidade microbiológica de alimentos, destacam-se os Coliformes Totais e Termotolerantes. O grupo dos Coliformes é constituído por membros da família Enterobacteriaceae, incluindo *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp. e *Escherichia* spp. (FRANCO; LANDGRAF, 2008)

Embora a legislação brasileira vigente não determine parâmetros para a avaliação deste grupo de bactérias, a determinação da contaminação por

Coliformes Totais em alimentos é importante, visto que a sua presença esta relacionada com a qualidade higiênico-sanitária do produto, (PENTEADO; ESMERINO, 2011).

Dentro do grupo dos Coliformes Totais, existe o grupo dos Coliformes Termotolerantes ou a 45° C, que recebem essa denominação devido à capacidade de desenvolver e fermentar lactose com produção de gás à temperatura de 44° C - 45° C. São constituídos pelos gêneros *Escherichia*, *Enterobacter* e *Klebsiella*, tendo como principal representante a espécie *E. coli*, visto que é mais abundante e a única de origem fecal. Considerando que a bactéria *E. coli* está presente em vários alimentos, a determinação deste micro-organismo pode indicar contaminação fecal recente e eventual presença de organismos patogênicos. (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

*E. coli* é uma bactéria Gram negativa, anaeróbia facultativa, pertencente à família Enterobacteriaceae, encontrada na microbiota de humanos e animais. Geralmente as cepas são encontradas confinadas no lúmen intestinal, porém em hospedeiros imunosuprimidos, ou quando as barreiras gastrointestinais são transpostas, podem causar doenças infecciosas. Além disso, algumas cepas mutagênicas podem causar doenças em hospedeiros saudáveis (NAKAZATO et al., 2009).

A maioria das cepas de *E.coli* se multiplica em baixas temperaturas (4-5° C), sendo a temperatura ótima em torno de 37° C, existindo relatos de sobrevivência por mais de nove meses em temperatura de congelamento (-20° C) (DOYLE; SCHOENI, 1987). Temperaturas entre 60° C e 70° C por 30 minutos são capazes de inativar a maioria das cepas. Em relação ao pH, elas são consideradas neutrófilas, crescendo numa faixa entre 4,5 a 9,0 (BARNES; NOLAN; VAILLANCOUT, 2003).

Para a caracterização dos sorotipos de *E.coli*, algumas estruturas antigênicas são consideradas. Para a identificação do antígeno somático "O", são relacionados os lipopolissacarídeos da estrutura da membrana plasmática, os antígenos flagelares "H" são relacionados com as proteínas do flagelo, os antígenos capsulares "K" estão relacionados com os polissacarídeos da cápsula,

importantes no processo de aderência e colonização do hospedeiro. O sorogrupo da cepa é identificado através do antígeno “O”, enquanto o sorotipo é identificado utilizando a combinação dos antígenos “O” e “H” (FRANCO; LANDGRAF, 1996).

A virulência de cepas de *E.coli* está associada a variedades cromossomais e genes plasmidais que codificam variedades de fatores de aderência intestinal, *pili*, antígenos capsulares, flagelos, enterotoxinas termolábeis e termoestáveis, produção de colicina, presença de aerobactina, resistência sérica, entre outros. Estes fatores de virulência são importantes indicadores de patogenicidade (EWERS et al., 2004).

Através da associação entre os fatores de virulência, as manifestações clínicas e a epidemiologia do hospedeiro, as linhagens de *E.coli* consideradas patogênicas foram agrupadas em *E. coli* enteroagregativa (EaggEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* que adere difusamente (DAEC), *E. coli* uropatogênica (UPEC), *E. coli* de meningite neonatal (NMEC) e *E. coli* patogênica para aves (APEC) (KAPER, 2005).

A infecção localizada ou sistêmica causada por APEC pode ser chamada de Colibacilose e as implicações incluem colisepticemia, doença respiratória, síndrome da cabeça inchada, coligranuloma, peritonite, celulite, salpingites entre outras. Contudo, o aparecimento de lesões ou implicações não pode inferir uma infecção por *E. coli*, visto que outras bactérias oportunistas podem se comportar de forma semelhante a *E.coli* (BARNES; NOLAN; VAILLANCOUT, 2008).

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

Dentre os fatores de patogenicidade da APEC, o gene *iss*, determina a patogenicidade de espécie *E.coli* para aves, sendo geralmente encontrado em celulite aviária. Sua presença nas lesões confere um possível risco de

patogenicidade para os seres humanos, desde que o frango contaminado seja consumido (BARROS et al., 2013),

Vários trabalhos relatam a presença do gene *iss* como sendo um dos mais prevalentes em aves doentes (EWERS et al., 2004; DISSANAYAKE; OCTAVIA; LAN, 2014; MOHAMED; SHEHATA; RAFEEK, 2014; RODRIGUEZ-SEIK et al., 2005). Além de conferir resistência sérica ao sistema imune do hospedeiro, esse gene também é capaz de carrear fatores de resistência a antimicrobiano (JOHNSON et al., 2002). Apesar da possibilidade da existência da doença sem a presença deste gene, a sua presença em *E. coli* oriunda de aves com colibacilose pode ser considerado como um marcador de patogenicidade para o patotipo APEC (NOLAN et al., 2002).

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

Rocha et al., (2008) ao analisar a presença de *iss* em frangos com sintomas de problemas respiratório sugestivos de colibacilose, detectaram o gene em 73,8% das amostras. Vale ressaltar que no estudo descrito acima as bactérias foram isoladas do sistema respiratório.

Ewers et al. (2009), isolaram a *E. coli* de aves doentes e encontraram a presença do gene *iss* em 88,2% e afirmaram que atualmente a resistência sérica é considerado como um atributo que determina a virulência da cepa. Em 2004, Ewers et al., já haviam encontrado uma grande prevalência deste gene, 82,7%, em aves com colisepticemia.

Mohamed, Shehata e Rafeek (2014) ao realizarem a comparação entre a presença do gene *iss* em aves doentes e aves aparentemente saudas, encontraram uma positividade em aves doentes de 72,2% contra 0% em aves saudas. Desta forma, afirmam que é notória a presença da *E. coli* nos sistemas de criação de ave convencionais.

A presença da *E. coli* também é observada em outro tipo de animal, neste caso o bovino, especificamente o trato intestinal, o qual é o principal reservatório



da *E.coli* enterohemorrágica (EHEC), este patotipo provoca a Síndrome Hemolítica Urêmica (HUS), diarreia sanguinolenta e diarreia não sanguinolenta. Os primeiros surtos provocados por esse patotipo foi associado ao hambúrguer mal cozido. Posteriormente, vários alimentos foram associados com a doença, com maçã, alface e leite não pasteurizado. O sorotipo O157:H7 é um dos mais importantes da América Latina (VARMA et al., 2003).

O fator de virulência principal para o patotipo EHEC é o *Stx*, responsável pela capacidade de produção da verotoxina (VT). A toxina é produzida no cólon, e pode, através da corrente sanguínea, alcançar o rim e induzir um processo inflamatório nas células renais. Este dano pode agravar para HUS, caracterizada por trombocitopenia, insuficiência renal aguda e anemia hemolítica. No intestino delgado, induz apoptose em células epiteliais. No cólon ele provoca dano local, resultando em diarreia sanguinolenta, colite hemorrágica, perfuração intestinal e necrose (JONES et al., 2000).

Em um estudo desenvolvido por Silva et al. (2011), ao analisar a presença de genes de patogenicidade para os patotipos, APEC (*iss*), EHEC (*stx*), EPEC (*bfpA*) e ETEC(*elt* e *stf*), oriundos de fígados de frangos, encontrou o gene *stx* em 13,3% (4/30). Resultado semelhante foi encontrado por Lee et al.(2009), que encontraram 7,3% de 39 amostras com contaminação por EHEC.

Vandekerchove et al. (2005) avaliaram as características associadas a virulência da APEC utilizando grupos de genes responsáveis pela expressão de adesina, característica de invasão, resistência ao soro, absorção de ferro, produção de colicina e produção de toxina. Dentre os genes analisados, foi utilizado o *stx*, porém não foi encontrado esse gene nos isolados.

Em 2009, Ewers et al., estudaram o potencial zoonótico da *Escherichia coli* patogênica extra-intestinal (ExPEC) isoladas do meio ambiente e intestino de galinhas, ao autores utilizaram o *stx* como um dos 46 genes analisados. Assim como Ghanbarpour, Salehi, Oswald (2010), que utilizaram o *stx* em seu trabalho sobre a filogenia da *E.coli* isolada de celulite. Em ambos os trabalhos não foi verificada a presença desse gene.

Outro patotipo que causa doença intestinal é o EPEC, refere-se a *Escherichia coli* enteropatogênica, que não produz enterotoxina, porém causa lesão histopatológica através da ligação íntima e desvanecimento das microvilosidades dos enterócitos, conseqüentemente pode levar a uma disfunção na absorção intestinal (NATARO; KAPER, 1998)

Os principais sintomas da doença causada pela EPEC são diarreia aquosa e desnutrição, podendo implicar em meningite e inflamação do trato urinário (CHEN; FRANKEL, 2005).

Para que a bactéria possa desenvolver a doença é preciso que alguns fatores de virulência sejam expressos. Knutton et al. (1998) propõe que a patogenicidade da EPEC ocorre em quatro fases, durante a primeira, ocorre a expressão em sua superfície de alguns componentes, como a adesina *bfpA*, que ao entrar na segunda fase é uma das responsáveis pela aderência ao epitélio intestinal. Harti, Iravati e Asmara (2006), afirmam que os genes *eae*, *espA* e *bfpA*, podem ser utilizados para marcadores da detecção do patotipo EPEC.

O gene *bfpA* foi investigado por Silva et al. (2011), ao analisar a presença deste em fígados de frango oriundos de dois matadouros do Recôncavo da Bahia, porém o mesmo não foi encontrado. Resultado positivo para o *bfpA* foi encontrado por Krause, Zimmermann e Beutin (2005), que constataram a presença desse gene de 2,3% das amostras de frangos.

Harti, Iravati e Asmara (2006), ao procurar os genes *eae*, *bfpA*, *espA* em isolados de *E.coli* provenientes de fezes de crianças com diarreia no Centros de Saúde Pública em Yogyakarta (Indonésia), encontrou o gene *bfpA* em 20 de um total de 49 isolados, representando um grave problema de saúde pública.

## REFERÊNCIAS

ABA. Associação Baiana de Avicultura. Apresenta informações sobre a produção da avicultura da Bahia. Disponível em: < <http://www.avicultura-ba.com.br/perfil-agricola-na-bahia/>> Acessado em: 10 de fevereiro de 2015.

ABEF. Associação Brasileira de Produtores e Exportadores de Frangos. Apresenta informações sobre a produção da avicultura do Brasil. Disponível em:< <http://www.ubabef.com.br/files/publicacoes/8ca705e70f0cb110ae3aed67d29c8842.pdf> > Acessado em: 10 de fevereiro de 2015.

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

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

BARCELLOS, A.S. **Avaliação macroscópica, histopatológica e bacteriológica de fígados de frangos (*Gallus gallus*) condenados no abate pela inspeção sanitária**. 2005. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2005.

BARCELLOS, A.S. et al. Macroscopia, histopatologia e bacteriologia de fígados de frangos (*Gallus gallus*) condenados no abate. **Cienc. Rural**, Santa Maria, v.36, n.2, p.561-567, mar.-abr., 2006.

BARNES, H.J.; VAILLANCOURT, J.P.; GROSS, W.B. Colibacilosis In: SAIF, Y.M. **Disease of poultry**. 11.ed. Ames: Iowa State University Press, 2003. p.631-656.

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

BARROS, L. S. S. et al. A Avicultura brasileira e sua afinidade com a celulite aviária. **Arquivos de Pesquisa Animal**. Cruz das Almas, v.1, n.2, p.78-97, 2012.

BARROS, L. S. S. et al. Escherichia coli from cellulitis lesions in broilers. **Food Measure.**, New Nork .v.7, p.40-45, march, 2013.

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

BRASIL, Ministério da Saúde. Resolução-RDC n.12, de 2 de janeiro de 2001. Aprovar o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 2001.

BRASIL, Portaria nº 210, de 26 de novembro de 1998. Aprova o Regulamento Técnico da Inspeção Tecnológica e Higiênico Sanitária da Carne de Aves. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 1998.

BRITO, et al. Celulite cervical em frangos de corte causada por *Escherichia coli*. **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 23, n. 1, p. 81-84, jan./jun. 2002.

CARVALHO, A.C.F.B. et al,. Presença de microrganismos mesófilos, psicotróficos e coliformes em diferentes amostras de produtos avícolas. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.72, n.3, p.303-307, jul.-set., 2005.

CHEN, H. D.; FRANKEL, G. Enteropathogenic *Escherichia coli*: unravelling pathogenesis. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v.29, p.83-98, 2005.

CUNHA, M. A.; SILVA, M. R. Métodos de detecção de microrganismos indicadores. **Saúde & Ambiente em Revista**, Duque de Caxias, v.1, n.1, p.09-13, jan-jun, 2006.

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

DOYLE, M.; SCHOENI, J.L. Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from Retail Fresh Meats and Poultry. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.53, n.10, p.2394-2396, out.1987.

ESPOSITO, A.B.M. et al. Avaliação de miúdos de *Gallus domesticus* como fonte proteica. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v.10, n.2, Jul.-Dez., 2009.

EWERS, C. et al. Intestine and environment of the chicken as reservoirs for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains with zoonotic potential. **Applied and Environmental Microbiology**. Washington, v.75, n.1, p. 184-192, Jan., 2009.

EWERS, C. et al. Molecular epidemiology of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from colisepticemia in poultry. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.104, p.91-102, 2004.

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

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

GUASTALLI, E.A.L. et al. Índice de patogenicidade, produção de hemolisina e sorogrupo de Amostras de *Escherichia coli* isoladas de aves de postura comercial. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.77, n.1, p.153-157, jan.-mar., 2010.

HARTI, A. S.; IRAVATI, S.; ASMARA, W. Detection of *eae*, *bfpA*, *espA* Genes on Diarrhoeagenic Strains of *Escherichia coli* Isolates. **Indonesian Journal of Biotechnology**, Yogyakarta, v. 11, n. 1, p.889-893, june, 2006.

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

HUJA, S., et al. Genomic Avenue to Avian Colisepticemia. **Mbio**. Washington, V.6, p.1-13, jan.-fev.,2015.

JACOBSEN, G. **Condenações por síndrome ascítica em frangos abatidos sob Inspeção Federal entre 2002 e 2006 no estado do Rio Grande do Sul e sua repercussão econômica**. 2007. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007.

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

JANBEN, T. et al. Virulence-associated genes in avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from internal organs of poultry having died from colibacillosis. **Int. J. Med. Microbiol.** v. 291, p. 371-378, 2001.

JAY, J.M. **Microbiologia moderna de los alimentos**. 3. Ed. Zaragoza: Acríbia, 1994. 804p.

JOHNSON, T. J., et al. Location of increased serum survival gene and selected virulence traits on a conjugative R plasmid in an avian *Escherichia coli* isolate. **Avian Diseases**. Jacksonville, v. 46, n. 2, p. 342-352, apr-jun, 2002.

JONES, N. L. et al. *Escherichia coli* Shiga toxins induce apoptosis in epithelial cells that is regulated by the Bcl-2 family. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**. Bethesda, v.278, p.811-819, 2000.

KAPER, J.B. Pathogenic *Escherichia coli*. **Int. J. Med. Microbiol.**, v.295, p.355-356, 2005.

KNUTTON, S. et al. A novel EspA-associated surface organelle of enteropathogenic *Escherichia coli* involved in protein translocation into epithelial cells. **The EMBO Journal**, Oxford, v.17, n.8, p.2166–2176, 1998.

KRAUSE, G.; ZIMMERMANN, S.; BEUTIN, L. Investigation of domestic animals and pets as a reservoir for intimin- (eae) gene positive *Escherichia coli* types. **Veterinary microbiology**. Amsterdam, v.106, p.87-95, 2005.

LEE, G.Y., et al. Prevalence and classification of pathogenic *Escherichia coli* isolated from fresh beef, poultry, and pork in Korea. **International Journal of Food Microbiology**. Amsterdam, v.134, n.196-200, 2009.

MOHAMED, M. A.; SHEHATA, M.A.; RAFEEK, E. Virulence genes content and antimicrobial resistance in *Escherichia coli* from broiler chickens. **Veterinary Medicine International**. Cairo, v.2014, nov., 2014.

NAKAZATO, G. et al. Virulence factors of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). **Pesq. Vet. Bras.**, Rio de Janeiro, v.29, n.7, p.479-486, julho, 2009.

NATARO, J. P; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **clinical microbiology reviews**, Washington, v.11, n.1, p.142-201, jan., 1998.

NOLAN, L. K. et al. 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**. Kennett Square, v. 46, n. 2, p. 386-392. April, 2002.

NORTON, R. A.; MACKLIN, K. S. MCMURTREY, B. L. Evaluation of scratches as an essential element in the development of avian cellulitis in broiler chickens. **Avian diseases**, v.43, n.2, p.320-325, apr.-jun., 1999.

OLIVEIRA, F. A.; SALVADOR, F. C. Determinação da contaminação microbiológica da carne de frango comercializada na cidade de Apucarana e Califórnia – PR. **Revista F@pciência**, Apucarana, v.8, n.15 p.159-171, 2011.

PENTEADO, F. R.; ESMERINO, L. A. Avaliação da qualidade microbiológica da carne de frango comercializada no município de Ponta Grossa – Paraná. **Biol. Health Sci.**, Ponta Grossa, 17, 1, p. 37-45, 2011.

RANDALL, C.J.; REECE, R.L. **Color atlas of avian histopathology**. Turin : Mosby-Wolfe, 1996, 232p.

ROCHA, A.C.G.P., et al. Genes associated with pathogenicity of avian *Escherichia coli* (APEC) isolated from respiratory cases of poultry. **Pesq. Vet. Bras.** Rio de Janeiro, V.28, n.3, p.183-186, mar., 2008.

RODRIGUES, A.C.A. et al. Análise e monitoramento de pontos críticos no abate de frangos utilizando indicadores microbiológicos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.7, p.1948-1953, out., 2008.

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

ROJAS, T.C.G., et al. *In silico* phylogenetic and virulence gene profile analyses of avian pathogenic *Escherichia coli* genome sequences. **Pesq. Vet. Bras.** Rio de Janeiro, v.34, n.2, p.129-133, fev., 2014.

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

SANTANA, A.P. et al. Causes of condemnation of carcasses from poultry in slaughterhouses located in State of Goiás, Brazil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.9, p.2587-2592, dez, 2008.

SAVIANE, G. **Anatomia das vias sanguíneas e biliares e histologia do fígado de avestruz (*Struthio camelus*, linnaeus 1758)**. 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências), Programa de Pós-Graduação em Anatomia de Animais Domésticos e Silvestres, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

SCAPIN, D. **Avaliação da qualidade microbiológica de alimentos antes e após a implementação de boas práticas de fabricação em agroindústrias da região extremo oeste catarinense**. 2011. 28p. Trabalho de conclusão de curso (Especialista em Microbiologia industrial e de alimentos), Universidade do Oeste de Santa Catarina, São Miguel do Oeste, 2011.

SILVA, I.M.M. et al. Caracterização genotípica dos isolados de *Escherichia coli* provenientes de frangos de corte. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte, v.63, n.2, p.333-339, abril, 2011.

SILVA, I.M.M. et al. Presença de *Escherichia coli* em fígados de frangos provenientes de matadouros avícolas. **Rev. Bras. Saúde Prod. Anim.**, Salvador, v.13, n.3, p.694-700 jul./set., 2012.

SILVA, M. C. **Avaliação da qualidade microbiológica de alimentos antes e após a implementação de boas práticas de fabricação em agroindústrias da região extremo oeste catarinense**. 2002. 75p. Dissertação (Mestrado em Ciências), Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

SMITH, J. L.; FRATAMICO, P. M.; GUNTHER, W. N. Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*. **Foodborne Pathogens and Disease**. Knoxville, v. 4, n. 2, 2007.

VANDEKERCHOVE, D., et al. Virulence-associated traits in avian *Escherichia coli*: Comparison between isolates from colibacillosis-affected and clinically healthy layer flocks. **Veterinary Microbiology**. Amsterdam, n.108, p.75-87, 2005.

VARMA, J. K. et al. An outbreak of *Escherichia coli* O157 infection following exposure to a contaminated building. **Jama**. New York, v.290, n. 20, p.2709-2712, nov., 2003.

VEIGA, A. et al. **Perfil de risco dos principais alimentos consumidos em Portugal**. Autoridade de Segurança Alimentar e Económica, Portugal, 2009.

VIEIRA, T. B. **Caracterização de *Escherichia coli* isolados de miúdos e carcaça com celulite por rapd e detecção dos genes *iss* e *fela* por pcr**. 2010. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2010.

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

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

XAVIER, D.B. et al. Number of flocks on the same litter and carcass condemnations due to cellulitis, arthritis and contact foot-pad dermatitis in broilers. **British Poultry Science**, n.51, n.5, p.586-591, October, 2010.



## **CAPÍTULO 2**

**Elevada prevalência de Coliformes Totais e *Escherichia coli* patogênica em amostras de celulite de frango de corte**

## **Elevada prevalência de Coliformes Totais e *Escherichia coli* Patogênica para Aves em amostras de celulite de frango de corte**

Maykson Costa de Jesus<sup>(1)</sup>, Ricardo Mendes da Silva<sup>(1)</sup>, Marcílio Delan Baliza Fernandes<sup>(2)</sup>, Kelly Menezes Macedo<sup>(1)</sup>, Vaneza Leal Cardoso<sup>(1)</sup>, Jerusa da Mota Santana<sup>(3)</sup> e Joaquim Evêncio-Neto<sup>(4)</sup>, Isabella de Matos Mendes da Silva<sup>(2)</sup>

1 - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia- Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. Rua Rui Barbosa, 710 - Campus Universitário CEP 44380-000, Cruz das Almas/BA. mayk\_costa@hotmail.com, ricardomendes@ufrb.edu.br kmenezes13@hotmail.com, vaneza.leal@hotmail.com

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

3 – Universidade Federal da Bahia - Instituto de Saúde Coletiva. Rua Basílio da Gama, s/n, Canela, CEP 40110-040, Salvador/BA. jersanutri@gmail.com

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

**Resumo** – Objetivou-se determinar a população de Coliformes Totais de *Escherichia coli* e identificar os genes de virulência *stx*, *iss* e *bfpA* nas cepas de *E. coli* isoladas de celulites em um matadouro do Recôncavo da Bahia. No período de agosto de 2013 a janeiro de 2014, foram coletadas 100 lesões de celulite, sendo verificada a população de Coliformes Totais e *E. coli*, pelo método rápido de contagem Petrifilm™ (3M Company), (AOAC 998.8). As amostras de *E. coli* foram analisadas quanto a presença dos genes *iss*, *stx* e *bfpA*, utilizando a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Em 96 % das amostras analisadas, houve a presença de Coliformes Totais, com a população entre 3,4 a 9,5 log UFC/g. Constatou-se também a presença da *E. coli* em 84 % das amostras de celulite, com

população entre 2,0 e 9,0 log UFC/g. Os genes *stx* e *bfpA* não foram identificados e o gene *iss* foi encontrado em 85,7 % dos isolados. Considerando a elevada prevalência de *Escherichia coli* nas amostras de celulite avaliadas, sugere-se que o consumo da carne do frango com a população elevada dessa bactéria é caracterizado como risco à saúde pública, visto que essa espécie de bactéria possui sorotipos com grande potencial patogênico para o homem.

**Palavras-chave:** APEC, Gene *iss*, Inspeção

### **High prevalence of Total Coliforms and *Escherichia coli* Pathogenic for poultry in broiler cellulite samples**

**Abstract** – The objective was to determine the population of Total Coliforms of *E. coli* and identify virulence genes *stx*, *iss* and *bfpA* in *E. coli* strains of cellulite coming from a slaughterhouse in Reconcavo southern Bahia. In the period august 2013 to january 2014, 100 cellulitis lesions before evisceration aseptically were collected, verified the population of Total Coliforms and *E. coli*, the quick method of counting Petrifilm™ (3M Company), (AOAC 998.8). Samples of *E. coli* were analyzed for the presence of genes *iss*, *stx* and *bfpA* using the Polymerase Chain Reaction (PCR). In 96% of the samples analyzed, there was the presence of Total Coliforms, with the population between 3,4 to 9,5 log UFC/g. It was also the presence of *E. coli* in 84 % of cellulite samples, with population between 2,0 and 9,0 log UFC/g. The *stx* genes and *bfpA* were not identified and the *iss* gene was found in 85,7 % of the isolates. Considering the high prevalence of *Escherichia coli* in samples evaluated cellulite, it is suggested that the consumption of chicken meat with a high population of this bacterium is characterized as risk to public health, since this species of bacterium has great potential pathogenic serotypes for humans.

**Keywords:** APEC, *iss* gene, inspection

## Introdução

A celulite aviária é caracterizada por uma inflamação subcutânea, principalmente na coxa e abdômen (Barnes et al., 2003). Esta inflamação pode levar a condenações parcial ou total da carcaça. A condenação parcial é determinada pela presença de inflamação local ou de algum órgão e a condenação total ocorre se existir inflamação de caráter sistêmico em carcaça ou vísceras (Brasil, 1998).

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

Nos humanos, a bactéria *Escherichia coli* (*E. coli*) é capaz de causar uma variedade de infecções intestinais e extra-intestinais, como diarreia, infecção do trato urinário, septicemia, peritonite e meningite (Kaper et al., 2004). Os agentes causadores de diarréia são classificadas com base em propriedades de virulência em *E. coli* enterotoxigenicas (ETEC), *E. coli* enteropatogenica (EPEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* verotexigênica (VTEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) e *E. coli* enteroagrativa (EaggEC) (Nataro & Kaper, 1998).

Cepas de APEC podem apresentar o gene *iss* (Increased Serum Survival), que determina a resistência aos efeitos líticos do soro. Este gene pode ser considerado como fator de virulência, visto que, dentre os genes de virulência existentes, o *iss* é frequentemente encontrado em aves doentes (Rocha et al., 2008).

Dentre os genes de virulência relacionados aos patótipos de humanos, destacam-se o gene de patogenicidade *stx*, responsável pela produção de uma citotoxina, podendo causar dano local no cólon, estando associado a EHEC, e também o *bfpA*, encontrado no patótipo EPEC, responsável pela codificação da fimbria, estrutura que desempenha inúmeras funções de patogenicidade, como adesão, auto agregação, formação de biofilme, transferência horizontal de genes, motilidade e virulência (Kaper et al., 2004).

Atualmente, estudos afirmam a semelhança entre a ExPEC humana e aviária, sugerindo um potencial zoonótico da APEC, gerando grande preocupação com a saúde pública (Manges & Johnson, 2012; Pitout, 2012). Rojas et al. (2014) constataram grandes semelhanças entre algumas linhagens de ExPEC aviária e humana, aumentando a probabilidade de uma cepa conseguir colonizar hospedeiros humanos e aves.

Considerando o potencial zoonótico da *Escherichia coli* patogênica para aves, associado à escassez de trabalhos relacionando os genes de virulência de cepas de *E. coli* em celulites de frangos de corte, objetivou-se quantificar a população de Coliformes Totais e *Escherichia coli* e identificar os genes de virulência *stx*, *iss* e *bfpA* nas cepas de *Escherichia coli* isoladas de celulites de frangos oriundos de um matadouro avícola do Recôncavo Sul da Bahia.

### **Metodologia**

No período de agosto de 2013 a janeiro de 2014 foram coletadas 100 amostras de celulite de frangos de corte de um matadouro avícola do Recôncavo Sul da Bahia, sob inspeção estadual. As carcaças foram retiradas da linha de inspeção antes da etapa da eventração, sendo as amostras coletadas de forma asséptica, com o auxílio de lâmina de

bisturi estéril e acondicionadas em coletores estéreis, identificadas e transportadas em caixa isotérmica contendo gelo químico até o Laboratório de Pesquisa em Microbiologia do Núcleo de Segurança Alimentar e Nutricional (SANUTRI) do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (CCS/UFRB), sendo imediatamente executadas as análises microbiológicas.

### **Quantificação de Coliformes Totais e *Escherichia coli***

A determinação da população de Coliformes Totais e *Escherichia coli* foi realizada por meio de método rápido de contagem em placas Petrifilm™ (3M Company), utilizando a placa Petrifilm EC, conforme recomendações do fabricante (AOAC 998.8). A contagem de colônias características foi realizada com auxílio de um contador de colônias modelo CP600 Plus (Phoenix®), calculando-se o número de log UFC/g (SILVA et al., 2007).

### **Pesquisa de genes de virulência de patótipos de *Escherichia coli***

Inicialmente foram isoladas até três colônias típicas de *Escherichia coli* oriundas da placa Petrifilm EC™ (3M Company). Cada colônia foi inoculada, com o auxílio da alça de platina, em microtubo contendo o caldo Brain Heart Infusion (BHI), sendo incubado a  $35\pm 1$  °C por  $24\pm 2$  h. Após esse período, foi adicionado 2 mL de glicerol a 15 % e as amostras foram congeladas a 20 °C negativos para posterior extração do DNA.

No processo de extração de DNA, as amostras foram reativadas em caldo BHI e incubadas a  $35\pm 1$  °C por  $24\pm 2$  h. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 13500 rpm. Após esta etapa, o sobrenadante foi descartado e acrescentado 800 µL de água deionizada, sendo realizada a homogeneização e centrifugação nas mesmas

condições descritas anteriormente. Ao término, novamente descartou-se o sobrenadante sendo adicionado 80 µL de água deionizada com posterior homogeneização. Após essa etapa, as amostras foram submetidas a 96 °C por 10 minutos em banho-maria. Após esta etapa, as amostras foram centrifugadas por 20 segundos a 13500 rpm, sendo retirado 2µL do sobrenadante e colocado em microtubo contendo 18 µL de água deionizada. As amostras de DNA foram estocadas a 20° C negativos até o momento da análise.

A concentração do DNA genômico foi quantificada por meio de espectofotômetro BioPhotometer D30 (Eppendorf™). A concentração final foram ajustadas utilizando água ultrapura (Hexapur™) para padronização em 50 ng/10µL

O DNA genômico extraído das cepas de *Escherichia coli* isoladas das celulites de frango foram submetidos à Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para identificação de genes de virulência associados aos patotipos APEC (*iss*), EHEC (*stx*) e EPEC (*bfpA*). As reações de PCR foram preparadas em tubos de polipropileno de 0,2 mL, sob condições assépticas, tendo como volume final 25 µL (tabela 01). Para os controles positivos foram utilizadas cepas padrões cedidas pela Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) do Rio de Janeiro, APEC (ATCC 25922), EHEC (ATCC 43895) e EPEC (CDC O111ab). As reações de amplificação foram realizadas em termociclador do tipo Mastercycler (Amplitherm™).

Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose 2% após corrida eletroforética à 60V e 37mA durante 100 minutos (GSR® 1000STD), corados com brometo de etídio (10 mg/mL). Os resultados foram observados em transiluminador ultravioleta (Loccus®).

A análise estatística foi realizada por meio do *software* SPSS versão 17.0. Realizou-se análise descritiva, sendo media e desvio padrão para as variáveis quantitativas,

e porcentagem para as variáveis qualitativas. Para comparar as médias das bactérias segundo categorias de aviários, utilizou-se o teste estatístico Anova (Análise de variância) e o teste de Tuckey para comparações múltiplas. Consideraram-se os resultados estatisticamente significantes quando o valor de p fosse menor ou igual a 0,05.

### **Resultados e Discussão**

As amostras foram originadas de nove aviários, conforme tabela 02. O peso das aves estudadas variou de 1,100 kg a 3,992 kg, cinco (5 %) aves apresentaram ascite e quatro (4 %) caquexia, sendo que uma delas apresentou caquexia e petéquias simultaneamente. As amostras de celulite apresentaram coloração amarelada (71%) ou esbranquiçada (29 %), pesando entre 2 e 18 g. As lesões foram encontradas nas aves principalmente em região ventral. As lesões eram firmes, cartilaginosas ou adiposas.

Corroborando com os achados do presente estudo, Barros et al., (2013), encontraram aves acometidas por celulite aviária pesando entre 1,050 e 2,867 kg, dois frangos apresentaram caquexia e um frango pericardite, as celulites pesavam de 0,9 a 1,7g, das quais 85% foram retiradas do lado esquerdo da ave.

Vieira et al., (2014), encontraram lesões de celulite em regiões caudo-lateral (direita, esquerda ou simultâneo) e as lesões se apresentavam amareladas e firmes ao corte. O tamanho das lesões variou de 1 a 20 cm. Os autores afirmaram que os achados macroscópicos permitem a identificação e julgamento do destino das carcaças, e o tamanho das lesões não podem ser levados em consideração para o julgamento do destino das mesmas, visto que, mesmo em pequenas lesões existe o processo de colissepticemia.



Foi evidenciada a presença dos Coliformes Totais em 96 % das amostras, com população entre 3,4 a 9,5 log UFC/g. Salienta-se que a elevada prevalência deste grupo de bactérias pode estar associada a inadequações higiênico-sanitárias no manejo de criação destas aves.

De acordo com Evans & Sayers (2000), habitação em bom estado de conservação, uso adequado de sanitizantes, limpeza e desinfecção de recipientes para o abastecimento de água, são medidas importantes para evitar a proliferação e posterior contaminação microbiana dos frangos nos aviários. Considerando os resultados da população de Coliformes Totais, suspeita-se que não estão sendo utilizadas práticas higiênicas satisfatórias nos aviários que originaram as amostras analisadas.

A bactéria *E. coli* estava presente em 84 % das amostras de celulite, com população entre 2,0 a 9,0 log UFC/g. Acredita-se que o manejo inadequado nos aviários, a reutilização da cama sem tratamento adequado e por longos períodos ou possível presença desta bactéria em ração e água do abastecimento podem estar relacionados a alta prevalência da *E. coli* nos frangos analisados.

Resultados semelhantes foram encontrados por Vieira et al. (2014) que isolaram *E. coli* em 96 % das lesões, assim como Barros et al. (2013) que isolaram a bactéria em 82,5 % das amostras e Brito et al., (2011), que encontraram o micro-organismo em 96,43 % das celulites. Segundo Mohamed et al. (2014) é notória a presença da *E. coli* nos sistemas de criação de aves convencionais.

Apesar da *E. coli* ser a bactéria mais isolada das lesões de celulite, outras bactérias também têm sido identificadas (Vaillancourt & Barnes, 2008). Brito et al., (2011), com o

objetivo de determinar a etiologia da celulite aviária, isolaram vários micro-organismos presentes na celulite, sendo *E. coli* a bactéria mais isolada com 96,43 %, seguida por *Citrobacter* sp (10,71 %), *Proteus vulgaris* (7,14 %), *Staphylococcus* sp (3,57 %), *Streptococcus* sp (3,57 %), *Candida albicans* (3,57 %), *Pseudomonas aeruginosa* (3,57 %), *Klebsiella* sp (3,57 %), *Serratia* sp (3,57 %), *Penicillium* sp (3,57 %) e *Aspergillus* sp (3,57 %).

Leclerc et al., (2003) sugeriram que algumas cepas de *E. coli* possuem uma maior capacidade de aderir a camadas profundas do tecido, podendo explicar a maior prevalência desta bactéria em rebanhos afetados por celulite. Desta forma, acredita-se que as outras bactérias não sejam o agente etiológico da celulite, mas estejam relacionadas à infecção bacteriana secundária, como oportunistas. Na análise descritiva para as amostras quantitativas (número de amostras por aviários), a média e o desvio padrão são encontrados na tabela 02. Segundo o teste Anova, não houve diferença estatisticamente significativa entre os aviários ( $F = 1,44$ ; Sig. = 0,189, dados não apresentados) para a população de *E. coli*.

O gene *bfpA* não foi amplificado nos isolados de *E. coli* oriundos das amostras de celulite. Corroborando com esse achado, Silva et al., (2011) também não identificaram o gene em isolados de frangos. Um percentual baixo (2,3 %) foi identificado por Krause et al., (2005). Ochoa et al., (2008), ressalta que a EPEC é considerada como um dos patógenos mais importantes relacionados com diarreia infantil.

Não foi identificado também o gene *stx* nas cepas analisadas, o qual está relacionado a EHEC. Resultados semelhantes foram encontrados por Knobl et al., (2011),

Ghanbarpour et al., (2010) e Ewers et al., (2009) que não identificaram o gene *stx* em amostras de *E.coli* isoladas de aves. Entretanto, Silva et al. (2011) e Lee et al. (2009) identificaram esse gene em 13,3 % e 7,3 % das amostras, respectivamente.

Por outro lado, o gene *iss* foi identificado em 72 dos 84 isolados de *E. coli* (85,7 %). (Figura 01). Nos aviários esse gene foi encontrado na grande maioria dos isolados de *E.coli*, nos aviários E, F, G, H e I foi encontrado uma positividade para o gene *iss* em 100% dos isolados, a exceção ocorreu no aviário A, onde foi encontrado apenas 20%, conforme gráfico 01.

Devido a baixa prevalência do gene *iss* no aviário A, existe a hipótese da presença de outros patótipos de *E. coli* presentes nas lesões de celulite, visto que não foram analisados todos os patótipos neste trabalho, não podendo descartar a presença de linhagem não patogênica.

Achados semelhantes foram encontrados por Mohamed et al. (2014), que detectaram alta prevalência do gene *iss* (72,2 %) nos isolados de *E. coli* coletados em frangos, assim como Barbieri et al. (2013), que identificaram 79,2 %, Ewers et al. (2009), que encontraram 88,2 % e Rocha et al., (2008), que detectaram em 73,8 % dos isolados.

Resultados discordantes foram encontrados por Knobl et al., (2012), que revelaram a presença do gene *iss* em apenas 13 (26 %) das 50 amostras analisadas.

Huja et al., (2015) afirmam que o gene *iss* é essencial para a capacidade de sobrevivência do micro-organismo no soro do hospedeiro. Ewers et al. (2009) revelam que atualmente a resistência sérica é considerada como um atributo que determina a virulência da cepa. Vandekerchove et al., (2005) ainda ressalta que, em combinação com vários genes

de patogenicidade, a presença deste gene é prevalente para o desenvolvimento da colibacilose, principalmente em surtos com alta taxa de mortalidade.

Considera-se a presença do gene *iss* nos isolados de *E. coli* das amostras de celulite um risco a saúde pública, haja vista o potencial patogênico da APEC (Barros et al., 2013). Além disso, vários estudos afirmam que linhagens de APEC possuem um risco potencial zoonótico, por existir uma semelhança com cepas ExPEC que causam patologias em humanos (Rojas et al., 2014, Ewers et al., 2009).

Em estudo desenvolvido por Frömmel et al. (2013), com 20 isolados de *E. coli* uropatogênica (UPEC) e 19 isolados de *E. coli* intestinal de pessoas saudáveis, o gene *iss* foi identificado em 45 % e 26 % das amostras, respectivamente. Assim como Santos et al., (2009) que detectaram o gene *iss* em 21,62 % (16/74) dos isolados de *E. coli* provenientes de bacteremia de pacientes internados no Hospital São Paulo (HSP), na cidade de São Paulo, Brasil.

### **Conclusão**

A contagem elevada de Coliformes Totais nas amostras de celulite determina que falhas higiênico-sanitárias graves ocorreram na produção dos frangos de corte, possivelmente por falhas de manejo nos aviários.

Considerando a elevada prevalência de *Escherichia coli* nas amostras de celulite avaliadas, com população acima de 4 log UFC/g, sugere-se que o consumo da carne do frango com a população elevada dessa bactéria caracteriza-se como risco à saúde pública, visto que essa espécie de bactéria possui sorotipos com grande potencial patogênico para o ser humano.

A identificação do gene *iss* na maioria dos isolados de *E.coli* oriundos de celulite aviária sugere que esse gene possui grande importância na patogenicidade da *Escherichia coli* para aves.

Desta forma, é necessária a intensificação das ações de higiene nos aviários, incluindo o respeito ao vazio sanitário, troca da cama e cuidado no armazenamento e oferta da água e ração para as aves, bem como a revisão da legislação sanitária que trata dos critérios para o descarte das carcaças que apresentarem lesões de celulite nas linhas de produção, visando à produção do alimento seguro.

### **Agradecimentos**

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

### **Referências**

BARBIERI, N.L.; OLIVEIRA, A.L.; TEJKOWSKI, T.M; PAVANELO, D.B; ROCHA, D.A; MATTER, L.B.; CALLEGARI-JACQUES, S.M.; BRITO, B.G.; HORN, F. Genotypes and pathogenicity of cellulitis isolates reveal traits that modulate APEC virulence. **Plos One**, v.8, aug., 2013.

BARNES, H.J.; VAILLANCOURT, J.P.; GROSS, W.B. Colibacillosis In: SAIF, Y.M. **Disease of poultry**. 11.ed. Ames: Iowa State University Press, 2003. p.631-656.

BARROS, L.S.S.; SILVA, R.M.; SILVA, I.M.; BALIZA, M.D.; VIRGÍLIO, F.F. *Escherichia coli* from cellulitis lesions in broilers. **Food Measure**, v.7, p.40-45, 2013.

BRITO, K. C. T.; JAENISCH, F. R. F.; BRITO, B. G. de. **Etiologia de la celulites em polos.** In: CONGRESO LATINOAMERICANO DE AVICULTURA , 22., 2011, Buenos Aires. Memorias del congreso. Buenos Aires: ALA/CEPA/CAPIA, 2011. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/54754/1/etiologia-de-la-celulitaes.pdf>> acessado em: 14 fev. 2015.

BRASIL, Portaria nº 210, de 26 de novembro de 1998. Aprova o Regulamento Técnico da Inspeção Tecnológica e Higiênico Sanitária da Carne de Aves. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 1998.

EVANS, S.J.; SAYERS, A.R. A longitudinal study of *Campylobacter* infection of broiler flocks in Great Britain. **Preventive Veterinary Medicine**, v.46, p.209-223, 2000.

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

FRÖMMEL, U.; LEHMANN, W.; RÖDIGER, S.; BÖHM, A.; NITSCHKE, J.; WEINREICH, J.; GROß, J.; ROGGENBUCK, D.; OLAF ZINKE, O.; ANSORGE, H.; VOGEL, S.; KLEMM, P.; WEX, T.; SCHRÖDER, C.; WIELER, L.H.; SCHIERACKA, P. Adhesion of Human and Animal *Escherichia coli* Strains in Association with Their Virulence-Associated Genes and Phylogenetic Origins. **Applied and Environmental Microbiology**, v.79, n.19, p.5814-5829, October, 2013.

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

HAMMERUM, A.M., HEUER, O.E. Human Health Hazards from Antimicrobial-Resistant *Escherichia coli* of Animal Origin. **Food Safety**, v.48, p.916-921. 2009.

HUJA, S.; OREN, Y.; TROST, E.; BRZUSZKIEWICZ, E.; BIRAN, D.; BLOM, J.; GOESMANN, A.; GOTTSCHALK, G.; HACKER, J.; RON, E.Z.; DOBRINDT, U. Genomic Avenue to Avian Colisepticemia. **Mbio**, Washington, v.6, p.1-13, jan.-fev., 2015.

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

KNÖBL, T.; MORENO, A.M.; PAIXÃO, R.; GOMES, T.A.T.; VIEIRA, M.A.M.; LEITE, D.S.; BLANCO, J.E.; FERREIRA, A.J.P. Prevalence of Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC) Clone Harboring *sfa* Gene in Brazil. **The Scientific World Journal**, p.1-7, 2012.

KNÖBL, T.; SAIDENBERG, A.B.S.; MORENO, A.M.; GOMES, T.A.T.; VIEIRA, M.A.M.; LEITE, D.S.; BLANCO, J.E.; FERREIRA, A.J.P. Serogroups and virulence genes of *Escherichia coli* isolated from psittacine birds. **Pesq. Vet. Bras.**, v.31, n.10, p.916-921, out., 2011.

KRAUSE, G.; ZIMMERMANN, S.; BEUTIN, L. Investigation of domestic animals and pets as a reservoir for intimin-(eae) gene positive *Escherichia coli* types. **Veterinary microbiology**, Amsterdam, v.106, p.87-95, 2005.

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

LEE, G.Y.; JANG, H.I.; IN GYUN HWANG, I.G.; RHEE, M.S. Prevalence and classification of pathogenic *Escherichia coli* isolated from fresh beef, poultry, and pork in Korea. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.134, n.196-200, 2009.

MANGES, A.R., JOHNSON, J.R., 2012. Food-Borne Origins of *Escherichia coli* Causing Extraintestinal Infections. **Food Safety**, v.55, p.712-719, 2012.

MELLATA, M. Human and Avian Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*: Infections, Zoonotic Risks, and Antibiotic Resistance Trends. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.10, p.916-932, 2013.

MOHAMED, M.A.; SHEHATA, M.A.; RAFEEK, E. Virulence Genes Content and Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli* from Broiler Chickens. **Veterinary Medicine International**, p.1-6, 2014.

NATARO, J. P; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v.11, n.1, p.142-201, jan., 1998.

OCHOA, T.J; BARLETTA, F.; CARMEN CONTRERAS, C.; MERCADO, E. New insights into the epidemiology of enteropathogenic *Escherichia coli* infection. **Trans R Soc Trop Med Hyg.**, v.102, n.9, p.852–856, sep., 2008.

PITOUT, J.D.D. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: a combination of virulence with antibiotic resistance. **Frontiers in Microbiology**, v.3, p.1-7, 2012.

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

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

SCHREMMER, C.; LOHR, J. E.; WASTLHUBER, U.; KÖSTERS, J.; RAVELSHOFER, K.; STEINRÜCK, H.; WIELER, L.H. Enteropathogenic *Escherichia coli* in *Psittaciformes*. **Avian Pathology**, v.28, p.349-354, 1999.

SANTOS, A.C.M.; ZIDKO, A.C.M.; PIGNATARI, A.C.C.; GALES, A.C.; SILVA, R.M. A virulência de *Escherichia coli* patogênica extra-intestinal (ExPEC) em relação à idade e ao sexo do hospedeiro. **O Mundo da Saúde**, São Paulo, v.33, n.4, p.392-400, 2009.

SILVA, I.M.M.; EVENCIO-NETO, J.; SILVA, R.M.; LUCENA-SILVA, N.; MAGALHAES, J.; BALIZA, M. Caracterização genotípica dos isolados de *Escherichia coli* provenientes de frango de corte. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte, v.63, n.2, p.333-339, abril, 2011.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A.; TANIWAKI, M.H.; SANTOS, F.R.S. dos; GOMES, R.A.R.; OKAZAKI, M.M. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 3. Ed. São Paulo: Livraria Varela, 2007.

VAILLANCOURT, J.; BARNES, H.J. Coliform Cellulitis (Inflammatory Process). In: BARNES, H. J. et al., **Disease of Poultry**, Ames: Blackwell Publishing, 2008. p. 732-737.

VANDEKERCHOVE, D.; VANDEMAELE, F.; ADRIAENSES, C.; ZALESKA, M.; HERNALSTEENS, J.P.; BAETS, L. De; BUTAYE, P.; IMMERSEEL, F.V.; WATTIAU, P.; LAEVENS, H.; MAST, J.; GODDEERIS, B.; PASMANS, F. Virulence-associated traits in avian *Escherichia coli*: Comparison between isolates from colibacillosis-affected and clinically healthy layer flocks. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, n.108, p.75-87, 2005.

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



## Tabelas e figura

**Tabela 01. Componentes utilizados na realização da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para amplificação dos genes *iss*, *stx* e *bfpA* em amostras de celulite de frangos oriundos de um matadouro avícola do Recôncavo Sul da Bahia**

<b>Componentes</b>	<b>Volume (µL)</b>	<b>Concentração</b>
Água deionizada	15,2	-
PCR buffer	5	0,2 µMol
dNTP mix	0,5	0,02 µMol
MgCl <sub>2</sub>	1,5	1,5 µMol
Taq DNA polimerase	0,27	-
Iniciador I	1,6	-
Iniciador II	1,6	-
DNA-molde	1	50 ng/10µL
<b>Total</b>	<b>25</b>	<b>-</b>

Fonte: dados da pesquisa

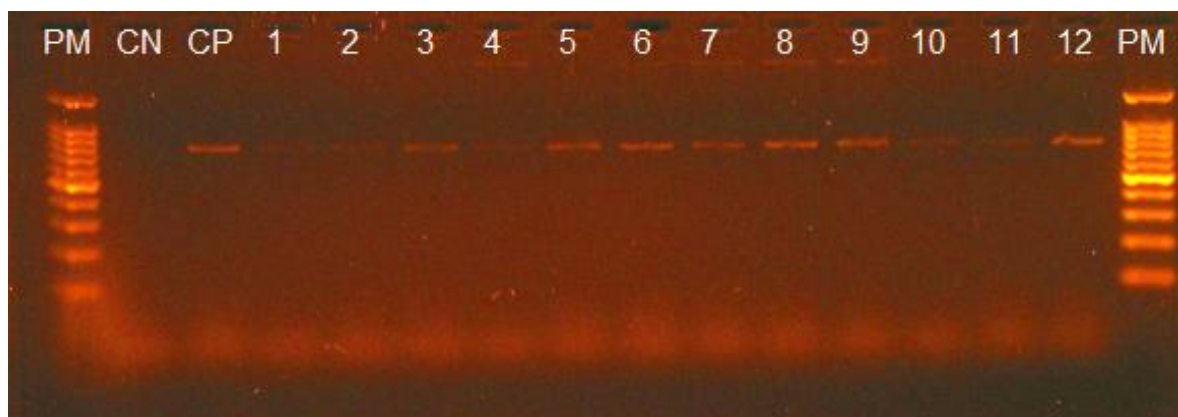
**Tabela 02: Número de amostras por aviários, média e desvio Padrão da população de *Escherichia coli* em amostras de celulite de frangos oriundos de um matadouro avícola do Recôncavo Sul da Bahia.**

<b>Aviários</b>	<b>N (Número de amostras)</b>	<b>Média da contagem de <i>Escherichia coli</i> (log UFC/g)</b>	<b>Desvio Padrão</b>
<b>A</b>	<b>5</b>	<b>5,34</b>	<b>1,409</b>
<b>B</b>	<b>5</b>	<b>6,02</b>	<b>1,618</b>

<b>C</b>	<b>39</b>	<b>4,85</b>	<b>2,911</b>
<b>D</b>	<b>16</b>	<b>5,17</b>	<b>2,261</b>
<b>E</b>	<b>6</b>	<b>4,59</b>	<b>3,647</b>
<b>F</b>	<b>11</b>	<b>4,35</b>	<b>2,381</b>
<b>G</b>	<b>8</b>	<b>5,56</b>	<b>2,352</b>
<b>H</b>	<b>4</b>	<b>7,37</b>	<b>0,226</b>
<b>I</b>	<b>6</b>	<b>7,64</b>	<b>0,428</b>
<b>Total</b>	<b>100</b>	<b>5,24</b>	<b>2,570</b>

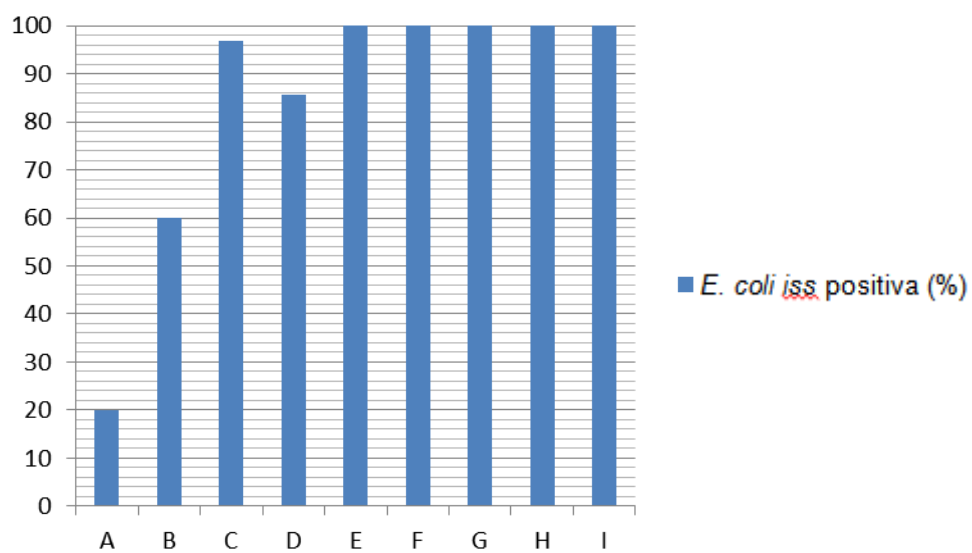
Fonte: dados da pesquisa

**Figura 01: Gel de agarose a 2% da PCR para gene *iss*. Tamanho do fragmento 760pb, PM- Peso Molecular 100pb, CN- controle negativo, CP- controle positivo, amostras positivas 1 -12.**



Fonte: Acervo pessoal

**Gráfico 01: Porcentagem do gene *iss* por *Escherichia coli* em amostras de celulite de frangos por aviário.**



Fonte: dados da pesquisa

## **CAPÍTULO 3**

**Qualidade sanitária de fígados de frangos de um matadouro  
avícola e genes de virulência de *Escherichia coli***

Artigo a ser submetido a Revista Pesquisa Agropecuária Brasileira

## **Qualidade sanitária de fígados de frangos de um matadouro avícola e genes de virulência de *Escherichia coli***

Maykson Costa de Jesus<sup>(1)</sup>, Isabella de Matos Mendes da Silva<sup>(2)</sup>, Ricardo Mendes da Silva<sup>(2)</sup>, Marcílio Delan Baliza<sup>(2)</sup>, Kelly Menezes Macedo<sup>(1)</sup>, Vaneza Leal Cardoso<sup>(1)</sup>, Jerusa da Mota Santana<sup>(3)</sup>, Joaquim Evêncio-Neto<sup>(4)</sup>

1 - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia- Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. Rua Rui Barbosa, 710 - Campus Universitário CEP 44380-000, Cruz das Almas/BA. mayk\_costa@hotmail.com, kmenezes13@hotmail.com, vaneza.leal@hotmail.com

2 - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia- Centro de Ciências da Saúde. Avenida Carlos Amaral, 1015 - Cajueiro, Santo Antônio de Jesus – Bahia, CEP: 44.570-000. isbellamatos@yahoo.com.br, riccomendes@ig.com.br, marcilibaliza@ufrb.edu.br

3 – Universidade Federal da Bahia - Instituto de Saúde Coletiva. Rua Basílio da Gama , s/n , Canela , CEP 40110-040 , Salvador/BA. jerusanutri@gmail.com

4. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manuel de Medeiros, S/N, Dois Irmãos, CEP 50.171-900. evencio@ufrpe.br

**Resumo-** Objetivou-se determinar a população de Coliformes Totais de *Escherichia coli* e identificar os genes de virulência *stx*, *iss* e *bfpA* nas cepas de *Escherichia coli* isoladas de fígados de frangos em um matadouro avícola do Recôncavo Sul da Bahia, entre os meses de agosto de 2013 e janeiro de 2014. Foram coletadas 100 amostras de fígado antes da evisceração no matadouro. Os órgãos foram retirados de forma aséptica, sendo verificada a população de Coliformes Totais e *E. coli*, pelo método rápido de contagem Petrifilm™ (3M Company) (AOAC 998.8), com identificação dos patótipos APEC (*iss*), EHEC (*stx*) e EPEC (*bfpA*), nos isolados de *E. coli*, utilizando a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Foi constatada a presença de Coliformes Totais e *E. coli* em 96% e 84% das amostras de

fígado analisadas, respectivamente. A população de Coliformes Totais variou entre 1 a 4,7 log UFC/g e a população de *E. coli* variou entre 1,0 a 4,73 log UFC/g, sendo que nenhuma amostra apresentou população acima do limite máximo estabelecido pela RDC 12/2001. Apesar das amostras estarem aptas para o consumo, a alta prevalência de Coliformes Totais nos fígados analisados indicam praticas inadequadas de higiene no processo produtivo das aves.

**Palavras chave:** Miúdos de frango, *Escherichia coli*, Segurança dos alimentos, Inspeção Sanitária.

### **Sanitary quality of chicken livers from a poultry slaughterhouse and virulence genes of *Escherichia coli***

**Abstract-** The objective was to determine the population of Total Coliforms of *Escherichia coli* and identify the genes *stx* virulence, *iss* and *bfpA* in isolated strains of *E. coli* chicken livers coming from a chicken slaughterhouse Reconcavo southern Bahia, between the months of august 2013 and january 2014. 100 samples of liver before evisceration in the slaughterhouse were collected, the organs were removed aseptically, and verified the population of Total Coliforms and *E. coli*, the quick method of counting Petrifilm™ (3M Company) (AOAC 998.8), with identification pathotypes of APEC (*iss*), EHEC (*stx*) and EPEC (*bfpA*) in *E. coli* isolates using the Polymerase Chain Reaction (PCR). Confirmed the presence of Total Coliforms and *E. coli* in 96% and 84% of liver samples collected, respectively. The population of Total Coliform ranged from 1,0 to 4,7 log UFC/g *E. coli* population ranged from 1,0 to 4,73 log UFC/g, and none had a population in excess of the ceiling established by RDC 12 / 2001. Although the samples

are suitable for consumption, the high prevalence of Total Coliforms in livers analyzed indicate inadequate hygiene practices in the production process of birds.

**Keywords:** Chicken Kid, *Escherichia coli*, Food Safety, Sanitary Inspection

## Introdução

A bactéria *Escherichia coli* é um dos micro-organismos mais estudados em nível mundial. O sequenciamento genético das principais espécies patogênicas de interesse abriu uma lacuna para exploração e descobertas de informações que estavam ocultas. O grande potencial de causar impactos negativos na agricultura e o potencial de causar doenças graves em animais e em seres humanos justificaram essa grande busca de novas descobertas (Johnson et al., 2007).

Cepas de *Escherichia coli* patogênica extra-intestinal (ExPEC), possuem alguns atributos de virulência que lhes conferem resistência para sobreviver em diferentes nichos fora do seu habitat normal, que é o intestino de aves e mamíferos (Mellata, 2013). Algumas cepas pertencentes ao grupo ExPEC tem sido isoladas de alimentos crus, como a carne de aves, caracterizando-se como patógenos veiculados por alimentos (Abreu et al., 2010).

Além da carne de frango, miúdos como o fígado são importantes alimentos relacionados à contaminação de humanos. Salienta-se que o fígado é susceptível a contaminação e proliferação de várias espécies de micro-organismos devido a sua característica metabólica. Dentre os micro-organismos associados ao fígado, destaca-se a bactéria *Escherichia coli*, haja vista que estudos relatam a presença deste patógeno em aves aparentemente saudáveis, associada a processos infecciosos nesse órgão (Barcelos et al., 2006).

Cepas de *E.coli* patogênicas para aves (APEC), podem apresentar o gene *iss* (*Increased Serum Survival*), que determina a resistência aos efeitos líticos do soro. Este gene pode ser considerado como fator de virulência, visto que, dentre os genes de virulência existentes, o *iss* é frequentemente encontrado em aves doentes (Rocha et al., 2008).

Nos seres humanos, a bactéria *Escherichia coli* é capaz de causar uma variedade de infecções intestinais e extra-intestinais, como diarreia, infecção do trato urinário, septicemia, peritonite e meningite (Kaper et al., 2004). As agentes causadoras de diarreia são classificadas com base em propriedades de virulência em *E. coli* enterotoxigenicas (ETEC), *E. coli* enteropatogenica (EPEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* verotexigênica (VTEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) e *E. coli* enteroagrativa (EaggEC) (Nataro & Kaper, 1998).

Considerando a diversidade dos patótipos de *E. coli* existentes, Bergeron et al., (2012) ressaltaram que a carne de frango funciona como um veículo de *Escherichia coli*, que está associada a diversas patologias em seres humanos. Rojas et al. (2014) constataram grandes semelhanças entre algumas linhagens de ExPEC aviária e humana, desta forma determinando um potencial zoonótico da *Escherichia coli* patogênica para aves.

Desta forma, considerando o potencial zoonótico da *Escherichia coli* patogênica para aves, associado à escassez de trabalhos relacionando os genes de virulência de cepas de *E. coli* em fígado de frangos de corte, objetivou-se verificar a qualidade sanitária dos fígados de frangos provenientes de de um matadouro avícola do Recôncavo Sul da Bahia.



## **Metodologia**

No período de agosto de 2013 a janeiro de 2014 foram coletados 100 fígados de frango em um matadouro avícola do Recôncavo Sul da Bahia, sendo as amostras originárias de nove aviários, conforme tabela 01. As carcaças foram retiradas de forma asséptica antes da eventração, com o auxílio de lâmina de bisturi estéril, sendo acondicionadas em coletores estéreis, identificadas e transportadas em caixa isotérmica contendo gelo químico até o Laboratório de Pesquisa em Microbiologia do Núcleo de Segurança Alimentar e Nutricional (SANUTRI) do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (CCS/UFRB), sendo imediatamente executadas as análises microbiológicas.

### **Quantificação de Coliformes Totais e *Escherichia coli***

A determinação da população de Coliformes Totais e *Escherichia coli* foi realizada por meio de método rápido de contagem em placas Petrifilm™ (3M Company), utilizando a placa Petrifilm EC, conforme recomendações do fabricante (AOAC 998.8). A contagem de colônias características foi realizada com auxílio de um contador de colônias modelo CP600 Plus (Phoenix®), calculando-se o número de log UFC/g (SILVA et al., 2007).

### **Pesquisa de genes de virulência de patótipos de *Escherichia coli***

Inicialmente foram isoladas até três colônias típicas de *Escherichia coli* oriundas da placa Petrifilm EC™ (3M Company). Cada colônia foi inoculada, com o auxílio da alça de platina, em microtubo contendo o caldo Brain Heart Infusion (BHI), sendo incubado a  $35\pm 1$  °C por  $24\pm 2$  h. Após esse período, foi adicionado 2 mL de glicerol a 15 % e as amostras foram congeladas a 20 °C negativos para posterior extração do DNA.

No processo de extração de DNA, as amostras foram reativadas em caldo BHI e incubadas a  $35\pm 1$  °C por  $24\pm 2$  h. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 13500 rpm. Após esta etapa, o sobrenadante foi descartado e acrescentado 800  $\mu\text{L}$  de água deionizada, sendo realizada a homogeneização e centrifugação nas mesmas condições descritas anteriormente. Ao término, novamente descartou-se o sobrenadante sendo adicionado 80  $\mu\text{L}$  de água deionizada com posterior homogeneização. Após essa etapa, as amostras foram submetidas a 96 °C por 10 minutos em banho-maria. Após esta etapa, as amostras foram centrifugadas por 20 segundos a 13500 rpm, sendo retirado 2  $\mu\text{L}$  do sobrenadante e colocado em microtubo contendo 18  $\mu\text{L}$  de água deionizada. As amostras de DNA foram estocadas a 20° C negativos até o momento da análise.

A concentração do DNA genômico foi quantificada por meio de espectrofotômetro BioPhotometer D30 (Eppendorf™). A concentração final foram ajustadas utilizando água ultrapura (Hexapur™) para padronização em 50 ng/10 $\mu\text{L}$

O DNA genômico extraído das cepas de *Escherichia coli* isoladas das celulites de frango foram submetidos à Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para identificação de genes de virulência associados aos patótipos APEC (*iss*), EHEC (*stx*) e EPEC (*bfpA*). As reações de PCR foram preparadas em tubos de polipropileno de 0,2 mL, sob condições assépticas, tendo como volume final 25  $\mu\text{L}$  (tabela 01). Para os controles positivos foram utilizadas cepas padrões cedidas pela Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) do Rio de Janeiro, APEC (ATCC 25922), EHEC (ATCC 43895) e EPEC (CDC O111ab). As reações de amplificação foram realizadas em termociclador do tipo Mastercycler (Amplitherm™).

Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose 2% após corrida eletroforética à 60V e 37mA durante 100 minutos (GSR® 1000STD), corados com brometo

de etídio (10 mg/mL). Os resultados foram observados em transiluminador ultravioleta (Loccus<sup>®</sup>).

A análise estatística foi realizada por meio do *software* SPSS versão 17.0. Realizou-se análise descritiva, sendo média e desvio padrão para as variáveis quantitativas, e porcentagem para as variáveis qualitativas. Para comparar as médias das bactérias segundo categorias de aviários, utilizou-se o teste estatístico Anova (Análise de variância) e o teste de Tuckey para comparações múltiplas. Consideraram-se os resultados estatisticamente significantes quando o valor de p fosse menor ou igual a 0,05.

### **Resultados e Discussão**

Considerando a análise microbiológica das amostras de fígado, foram evidenciadas a presença das bactérias do grupo Coliformes Totais em 74 % das amostras, com variação entre 1 a 4,78 log UFC/g e uma média de 2,46 log UFC/g. Resultados semelhantes foram evidenciados por Carvalho et al., (2005), que encontraram uma população de Coliformes Totais em miúdos, fígado e moela, com variação de 3,04 a 3,32 log NMP/g e média 3,18 log NMP/g.

Embora a legislação brasileira vigente não determine parâmetros para a avaliação deste grupo de bactérias, a determinação da população de Coliformes Totais está relacionada com a qualidade higiênico-sanitária do produto, sendo um importante grupo de micro-organismos indicadores (Penteado & Esmerino, 2011).

Apesar da elevada população de Coliformes Totais, salienta-se que 100 % das amostras avaliadas estavam aptas para o consumo humano, haja vista que a população de

*E. coli* está abaixo do limite máximo de 5 log UFC/g permitido pela Resolução RDC 12/2001 (Brasil, 2001).

A bactéria *E. coli* foi isolada em 45 % das amostras de fígados, com população entre 1,0 a 4,73 log UFC/g e média 2,11 log UFC/g. Achados semelhantes foram encontrados por Carvalho et al., (2005), que analisaram fígado e moela de frango quanto a presença de *E. coli* e evidenciaram uma contagem entre 3,1 e 6,0 log NMP/g, destas apenas 2,1 % estavam em desacordo com a resolução RDC 12/2001.

Corroborando com achados do presente estudo, Vieira et al., (2014) isolaram a *E.coli* em 50,98 % das amostras de fígado, assim como Silva et al. (2012), que verificaram a presença em 45,5 % dos fígados. Dados discordantes foram observados por Barcelos et al. (2006), que isolaram *E. coli* em apenas 26 % das amostras analisadas.

Utilizando o teste Anova, pode-se constatar que houve diferenças estatisticamente significantes na contagem da *E.coli* segundo o tipo de aviário. O aviário H foi evidenciado como o que apresentou maior contagem de *E.coli* quando comparado aos demais ( $F = 2,901$ ; Sig. = 0,006, dados não apresentados).

A determinação da *E.coli* em alimentos pode indicar contaminação fecal recente e eventual presença de micro-organismos patogênicos (Franco & Landgraf, 2008).

De acordo com Evans & Sayers (2000), habitação em bom estado de conservação, uso adequado de sanitizantes, limpeza e desinfecção de recipientes para o abastecimento de água são medidas importantes para evitar a proliferação e posterior contaminação microbiana dos frangos nos aviários. A falta de higiene adequada nos aviários, em especial o aviário H, pode ter contribuído para essa diferença na contagem de *E.coli*.

Considerando a análise molecular, o gene *bfpA* não foi identificado nos isolados de *E.coli*. Corroborando com esse achado Silva et al. (2011) também não detectaram o gene em isolados de fígado de frangos provenientes de matadouros do Recôncavo da Bahia. Um baixo porcentual foi identificado por Krause et al. (2005), que identificaram o gene *bfpA* em apenas 2,3 % das amostras de frangos. Ressalta-se que a EPEC é considerada um dos patógenos mais importantes relacionados com diarreia infantil (Ochoa et al., 2008).

Não foi identificado também o gene *stx* nas cepas analisadas, característico da EHEC. Resultados semelhantes foram encontrados por Knobl et al. (2011) que não observaram o gene *stx* em amostras de *E.coli* isoladas de aves. Entretanto, Silva et al., (2011) e Lee et al., (2009) identificaram esse gene em 13,3% e 7,3% das amostras, respectivamente.

Por outro lado, o gene *iss* foi detectado em 29 dos 45 isolados de *E.coli*, (64,4 %). Este gene está amplamente distribuído entre os aviários, sua prevalência foi observada entre 25 e 100% dos isolados de *E.coli* por aviário, sendo que os aviários A, H e I foram os mais prevalentes conforme gráfico 01. Resultados semelhantes foram evidenciados por Vieira et al. (2014), que identificaram o gene *iss* em 50% das amostras.

Por outro lado, resultados divergentes foram revelados por Knobl et al. (2011), que ao analisarem os fígados de aves, que foram a óbito, apresentando enterite e septicemia submetidas ao Hospital de Medicina Veterinária da Faculdades Metropolitanas Unidas (FMU), São Paulo, Brasil, os autores verificaram um percentual de 12,5% do gene *iss* nos isolados do fígado.

Dissannayake et al. (2014) salientam que o gene *iss* está estritamente relacionados aos casos de APEC. Segundo Huja et al., (2015), o gene *iss* é essencial para a capacidade de sobrevivência do micro-organismo no soro. Johnson et al., (2008) classificam esse gene como um dos principais genes relacionados com a detecção da *E.coli* patogênica para aves.

Apesar das amostras de *E. coli* avaliadas estarem próprias para o consumo humano, a elevada prevalência do gene *iss* nos isolados de *E. coli* é preocupante, haja vista que vários trabalhos evidenciam o potencial risco de *E.coli* patogênica para aves causarem doenças em seres humanos, constituindo um risco zoonótico (Barros et al., 2013; Rojas et al., 2014). Johnson et al., (2006) e Skyberg et al., (2006) evidenciaram a doença em mamíferos causada por APEC em experimentos laboratoriais.

Em um estudo desenvolvido por Frömmel et al., (2013), com 20 isolados de *E. coli* uropatogênica (UPEC) e 19 isolados de *E.coli* intestinal de pessoas saudáveis, foram encontrados 45 % e 26 % de amostras positivas para o gene *iss*, respectivamente. Assim como Santos et al., (2009) constatou a presença do gene *iss* em 21,62 % (16/74) dos isolados de *E.coli* provenientes de bacteremia de pacientes internados no Hospital São Paulo (HSP), em São Paulo, SP.

Conforme Vieira et al. (2014), a constatação da presença do gene *iss* em miúdos de frango, representa um risco relativo à saúde pública, visto que esse alimento representa uma fonte importante de enfermidades transmitida via cadeia alimentar.

### **Conclusão**

A elevada população de Coliformes Totais nas amostras de frango analisadas determina a ocorrência de falhas higiênico-sanitárias durante a fase de criação das aves.

A identificação do gene *iss* na maioria dos isolados de *E.coli* oriundos de fígados de frango sugere que esse gene possui grande importância na patogenicidade da *Escherichia coli* para aves.

Apesar da população de *E. coli* nas amostras analisadas estar abaixo do limite máximo permitido pela legislação sanitária vigente, a elevada prevalência do gene *iss* revela o risco de consumo do fígado de frango, pela possibilidade deste veicular a APEC, a qual pode causar doenças nos seres humanos, comprometendo a qualidade sanitária do alimento.

Diante dos resultados observados, torna-se necessária a realização de estudos adicionais, principalmente no que se refere a qualidade microbiológica de fígado de frango em relação a legislação brasileira vigente.

### **Agradecimentos**

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior pela concessão de bolsa de estudos e financiamento do desenvolvimento do estudo. Ao Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia pela disponibilização do espaço e equipamentos para o desenvolvimento do trabalho. À Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) do Rio de Janeiro pela disponibilização das cepas padrão utilizadas como controle positivo e ao matadouro avícola que cedeu as instalações e permitiu a coleta das amostras.

### **Referências**

ABREU, D.L.C.; FRANCO, R.M.; NASCIMENTO, E.R.do; PEREIRA, V.L.A.; ALVES, F.M.X.; ALMEIDA, J.F. Perfil de sensibilidade antimicrobiana e detecção do gene *iss* pela reação em cadeia da polimerase na tipificação de *Escherichia coli* patogênica em codornas

de corte sob inspeção sanitária. **Pesq. Vet. Bras.** Rio de Janeiro, v.30, n.5, p.406-410, maio, 2010.

BARCELOS, A.S.; FLÔRES, M.L.; KOMMERS, G.D.; NASCIMENTO, V.P. do; SEGABINAZI, S.D.; ANTONIAZZI, T.; BASSAN, J.D.L. Macroscopia, histopatologia e bacteriologia de fígados de frangos (*Gallus gallus*) condenados no abate. **Cienc. Rural**, Santa Maria, v.36, n.2, p.561-567, mar.-abr., 2006.

BARROS, L.S.S.; SILVA, R.M.; SILVA, I.M.; BALIZA, M.D.; VIRGÍLIO, F.F. *Escherichia coli* from cellulitis lesions in broilers. **Food Measure**, v.7, p.40-45, 2013.

BERGERON, C.R.; PRUSSING, C.; BOERLIN, P.; DAIGNAULT, D.; DUTIL, L.; REID-SMITH, R.J.; GEORGE G. ZHANEL, G.G.; MANGES, A.R. Chicken as reservoir for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in humans, Canada. **Emerging Infectious Diseases**, v.18, n. 3, march, 2012.

BRASIL, Ministério da Saúde. Resolução-RDC n.12, de 2 de janeiro de 2001. Aprovar o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 2001.

CARVALHO, A.C.F.B.; CORTEZ, A.L.L.; SALOTTI, B.M.; BÜRGER, K.P.; VIDAL-MARTINS, A.M.C. Presença de microrganismos mesófilos, psicrótróficos e coliformes em diferentes amostras de produtos avícolas. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.72, n.3, p.303-307, jul.-set., 2005.

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

EVANS, S.J.; SAYERS, A.R. A longitudinal study of campylobacter infection of broiler flocks in Great Britain. **Preventive Veterinary Medicine**. v.46, p.209-223, 2000.

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

FRÖMMEL, U.; LEHMANN, W.; RÖDIGER, S.; BÖHM, A.; NITSCHKE, J.; WEINREICH, J.; GROß, J.; ROGGENBUCK, D.; OLAF ZINKE, O.; ANSORGE, H.; VOGEL, S.; KLEMM, P.; WEX, T.; SCHRÖDER, C.; WIELER, L.H.; SCHIERACKA, P. Adhesion of Human and Animal *Escherichia coli* Strains in Association with Their Virulence-Associated Genes and Phylogenetic Origins. **Applied and Environmental Microbiology**, v.79, n.19, p.5814-5829, October, 2013.

HUJA, S.; OREN, Y.; TROST, E.; BRZUSZKIEWICZ, E.; BIRAN, D.; BLOM, J.; GOESMANN, A.; GOTTSCHALK, G.; HACKER, J.; RON, E.Z.; DOBRINDT, U. Genomic Avenue to Avian Colisepticemia. **Mbio.**, Washington, V.6, p.1-13, jan.-fev., 2015.



JOHNSON, T.J.; KARIYAWASAM, S.; YWANNEMUEHLER, Y.; MANGIAMELE, P.; JOHNSON, S.J.; DOETKOTT, C.; SKYBERG, J.A.; LYNNE, A.M.; JOHNSON, J.R.; NOLAN, L.K. The genome sequence of avian pathogenic *Escherichia coli* strain O1:K1:H7 shares strong similarities with human extraintestinal pathogenic *E. coli* genomes. **Journal of Bacteriology**, v.189, n.8, p.228-3236, apr., 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, jan., 2006.

JOHNSON, T.J.; WANNEMUEHLER, Y.; DOETKOTT, C.; JOHNSON, S.J.; ROSENBERGER, S.C.; NOLAN, L.K. Identification of minimal predictors of avian pathogenic *Escherichia coli* virulence for use as a rapid diagnostic tool. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n.12, p.3987-3996, Dec., 2008.

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

KNÖBL, T.; SAIDENBERG, A.B.S.; MORENO, A.M.; GOMES, T.A.T.; VIEIRA, M.A.M.; LEITE, D.S.; BLANCO, J.E.; FERREIRA, A.J.P. Serogroups and virulence genes of *Escherichia coli* isolated from psittacine birds. **Pesq. Vet. Bras.** v.31, n.10, p.916-921, out., 2011.

KRAUSE, G.; ZIMMERMANN, S.; BEUTIN, L. Investigation of domestic animals and pets as a reservoir for intimin- (*eae*) gene positive *Escherichia coli* types. **Veterinary Microbiology**. Amsterdam, v.106, p.87-95, 2005.

LEE, G.Y.; JANG, H.I.; HWANG, I.G.; RHEE, M.S. Prevalence and classification of pathogenic *Escherichia coli* isolated from fresh beef, poultry, and pork in Korea. **International Journal of Food Microbiology**. Amsterdam, v.134, n.196-200, 2009.

MELLATA, M. Human and Avian Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*: Infections, Zoonotic Risks, and Antibiotic Resistance Trends. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.10, p.916-932, 2013.

NATARO, J. P; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical microbiology reviews**, Washington, v.11, n.1, p.142-201, jan., 1998.

OCHOA, T.J; BARLETTA, F.; CARMEN CONTRERAS, C.; MERCADO, E. New insights into the epidemiology of enteropathogenic *Escherichia coli* infection. **Trans R Soc Trop Med Hyg.**, v.102, n.9, p.852–856, sep., 2008.

PENTEADO, F. R.; ESMERINO, L. A. Avaliação da qualidade microbiológica da carne de frango comercializada no município de Ponta Grossa – Paraná. **Biol. Health Sci.**, Ponta Grossa, 17, 1, p. 37-45, 2011.

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

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

SANTOS, A.C.M.; ZIDKO, A.C.M.; PIGNATARI, A.C.C.; GALES, A.C.; SILVA, R.M. A virulência de *Escherichia coli* patogênica extra-intestinal (ExPEC) em relação à idade e ao sexo do hospedeiro. **O Mundo da Saúde**, São Paulo, v.33, n.4, p.392-400, 2009.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A.; TANIWAKI, M.H.; SANTOS, F.R.S. dos; GOMES, R.A.R.; OKAZAKI, M.M. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 3. Ed. São Paulo: Livraria Varela, 2007.

SILVA, I.M.M.; EVENCIO-NETO, J.; SILVA, R.M.; LUCENA-SILVA, N.; MAGALHAES, J.; BALIZA, M. Caracterização genotípica dos isolados de *Escherichia coli* provenientes de frango de corte. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte, v.63, n.2, p.333-339, abril, 2011.

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

SKYBERG, J.A.; JOHNSON, T.J.; JOHNSON, J.R.; CLABOTS, C.; LOGUE, C.M.; NOLAN, L.K. Acquisition of avian pathogenic *Escherichia coli* plasmids by a commensal *E. coli* isolate enhances its abilities to kill chicken embryos, grow in human urine, and colonize the murine kidney. **Infection and Immunity**, v.74, n.11, p.6287-6292, nov., 2006.

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

## Tabelas e gráfico

**Tabela 01: Número de amostras de fígado por aviários.**

<b>Aviários</b>	<b>N (Número de amostras)</b>
<b>A</b>	<b>5</b>
<b>B</b>	<b>5</b>
<b>C</b>	<b>39</b>
<b>D</b>	<b>16</b>
<b>E</b>	<b>6</b>
<b>F</b>	<b>11</b>
<b>G</b>	<b>8</b>
<b>H</b>	<b>4</b>
<b>I</b>	<b>6</b>
<b>Total</b>	<b>100</b>

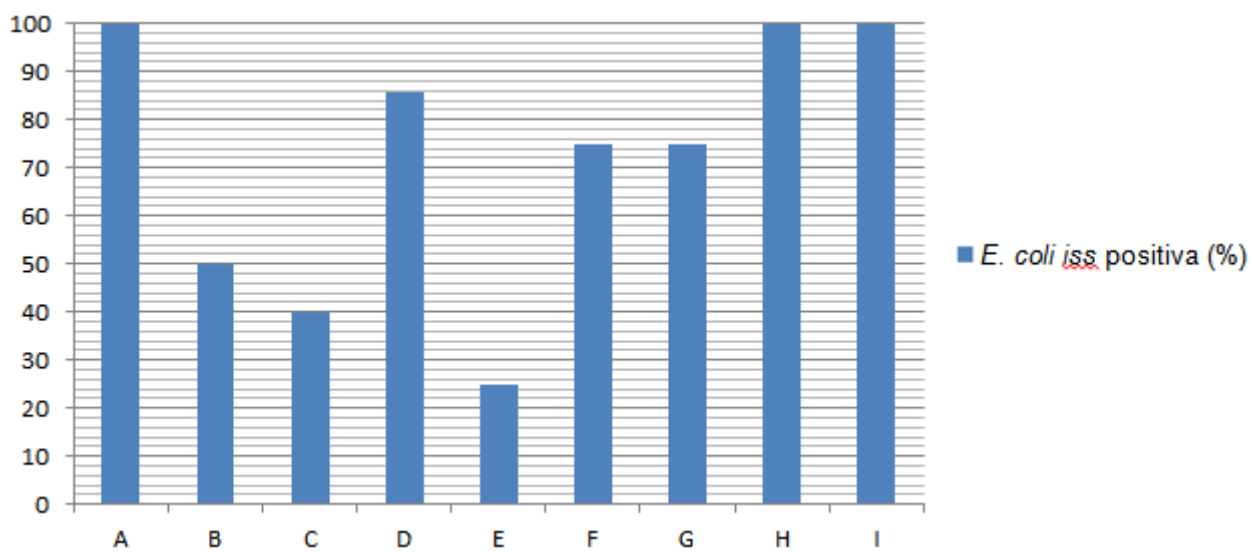
Fonte: dados da pesquisa

**Tabela 02: Componentes utilizados na realização da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para amplificação dos genes *iss*, *stx* e *bfpA* em amostras de fígados de frangos oriundos de um matadouro avícola do Recôncavo Sul da Bahia**

<b>Componentes</b>	<b>Volume (µL)</b>	<b>Concentração</b>
Água deionizada	15,2	-
PCR buffer	5	0,2µ Mol
DNTP mix	0,5	0,02 µMol
MgCl <sub>2</sub>	1,5	1,5 µMol
Taq DNA polimerase	0,27	-
Iniciador I	1,6	-
Iniciador II	1,6	-
DNA-molde	1	50 ng/10µL
<b>Total</b>	<b>25</b>	<b>-</b>

Fonte: dados da pesquisa

**Gráfico 01: Porcentagem do gene *iss* por *Escherichia coli* em amostras de fígado de frangos por aviário.**



Fonte: dados da pesquisa

## Considerações Finais

Está clara a necessidade de avanços em todo o processo de produção do frango de corte, desde a criação até o momento do abate. Nas granjas, o excesso de aves e a higiene do ambiente podem comprometer a qualidade final do produto ofertado ao consumidor. No abatedouro, devido a grande quantidade de aves abatidas diariamente, torna-se necessário uma fiscalização mais intensa, a fim de evitar que aves aparentemente saudáveis sejam liberadas para o consumo humano, com a presença de enfermidades cutâneas e/ou infecções sistêmicas.

Os resultados permitem sinalizar o potencial zoonótico das cepas de *E.coli* isoladas de celulites e fígados, porém é necessária a continuidade de estudos que fomentem esse potencial.

Torna-se necessária a utilização de análises microbiológicas e sorológicas, utilizando métodos rápidos, em amostras representativas dos lotes enviados ao matadouro em associação as características macroscópicas de carcaça e vísceras, por meio da inspeção sanitária.

Além disso, é importante a descoberta de mecanismos rápidos de detecção de patótipos de *E.coli*, assim como a determinação de seus mecanismos de patogenicidade.

Essas medidas são imprescindíveis para que a agroindústria avícola brasileira mantenha seu patamar de liderança no mercado mundial, com a oferta de alimento seguro aos consumidores.