

## *Escherichia coli* em frangos de corte com aerossaculite\*

Leandro S. Machado<sup>2+</sup>, Elmiro Rosendo do Nascimento<sup>2</sup>, Virgínia L.A. Pereira<sup>2</sup>,  
Dayse L.C. Abreu<sup>2</sup>, Raquel Gouvea<sup>2</sup> e Lídia M.M. Santos<sup>2</sup>

**ABSTRACT.** Machado L.S., do Nascimento E.R., Pereira V.L.A., Abreu D.L.C., Gouvea R. & Santos L.M.M. 2014. [*Escherichia coli* in broiler chickens with airsacculitis.] *Escherichia coli* em frangos de corte com aerossaculite. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 36(3):261-265, 2014. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Pública, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Rua Dr. Vital Brazil Filho 64, Vital Brazil, Niterói, RJ 24230-340, Brazil. E-mail: leandromachadovet@yahoo.com.br

The Brazilian poultry industry grows each year and becomes increasingly representative in the production and export of products. The health care with poultry have accompanied and favored this evolution, however, respiratory agents that affect the weight and carcass quality, continue to cause great damage to the poultry industry. Airsacculitis is considered the main cause of total and partial condemnation of carcasses of broilers, and has been attributed to Mycoplasmosis mostly caused by *Mycoplasma gallisepticum* (MG) and *Mycoplasma synoviae* (MS) and *Escherichia coli*. The aim of this study was to relate the positivity of MG / MS and *E. coli* detected by PCR as a risk factor for airsacculitis in condemnation of broilers in Health Inspection Service. We studied 30 broiler poultry slaughtered in a slaughterhouse under Federal Sanitary Inspection, located in the State of Rio de Janeiro. 30 chickens were randomly collected from different lots and tracheas obtained in each PCR. DNA was extracted by phenol-chloroform method and amplified using pairs of "primer" specific for MG, MS and *E. coli*. Of the 30 chickens analyzed by PCR, 30% (9/30) had lesions in air sacs. None of the birds showed infection with MG and/or MS PCR, however 33.3% (3/9) birds were positive for airsacculitis *iss* gene from *E.coli*. *E.coli* found in broiler chickens that were negative for mycoplasma airsacculitis, implying the presence of such bacteria may be sufficient to cause respiratory problems in broilers and no influence on diagnosis by type of material collection biological.

KEY WORDS. Broilers, airsacculitis, *Mycoplasma*, PCR.

**RESUMO.** A Indústria avícola brasileira cresce anualmente e se torna cada vez mais representativa na produção e exportação dos seus produtos. Os cuidados com a sanidade avícola têm acompanhado e favorecido essa evolução, entretanto, agentes respiratórios que afetam o peso e a qualidade da carcaça, continuam a provocar grandes prejuízos à avicultura industrial. Aerossaculite é considerada a principal causa da condenação total e parcial de carcaças de frangos de corte, e tem sido atribuída

às Micoplasmoses, causadas principalmente pelo *Mycoplasma gallisepticum* (MG) e *Mycoplasma synoviae* (MS) e por *Escherichia coli*. O objetivo do presente estudo foi o de relacionar a positividade por MG/MS e *E. coli* detectado pela PCR como fator de risco de aerossaculite na condenação de frangos de corte na Inspeção Sanitária Federal. Foram estudados 30 frangos de corte abatidos em um matadouro avícola sob Inspeção Sanitária Federal, localizado no Estado do Rio de Janeiro. Foram coletados alea-

\*Recebido em 26 de setembro de 2012.

Aceito para publicação em 23 de janeiro de 2014.

<sup>1</sup> Departamento de Saúde Coletiva Veterinária e Saúde Pública, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Rua Dr. Vital Brazil Filho 64, Vital Brazil, Niterói, RJ 24230-340, Brasil.\*Autor para correspondência: leandromachadovet@yahoo.com.br

toriamente 30 frangos de diferentes lotes e obtidos traquéias em cada um deles para PCR. O DNA foi extraído pelo método de fenol-clorofórmio e amplificado com pares de “primers” específicos para MG, MS e *E.coli*. Dos 30 frangos analisados pela PCR, 30% (9/30) apresentaram lesões nos sacos aéreos. Nenhuma das aves apresentou infecção por MG e/ou MS pela PCR, entretanto 33,3% (3/9) aves com aerossaculite apresentaram positividade para gene *iss* de *E. coli*. *E. coli* foi encontrada em frangos de corte negativos para micoplasmas que apresentaram aerossaculite, levando a crer que a presença dessa bactéria pode ser suficiente para causar problemas no sistema respiratório de frangos de corte e não houve influencia no diagnóstico através do tipo de colheita do material biológico.

**PALAVRAS-CHAVE.** Frangos de corte, aerossaculite, micoplasmas, *Escherichia coli*, PCR.

## INTRODUÇÃO

A posição do Brasil como terceiro produtor e maior exportador mundial de carne de frango foi alcançada devido a uma busca constante de evolução na qualidade e manutenção da sanidade avícola. Em função desse grande desenvolvimento, a preocupação com os aspectos higiênico-sanitários dos produtos também evoluiu na avicultura brasileira.

No Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA), as micoplasmoses são consideradas como doenças prioritárias com vistas ao controle e/ou erradicação nos planteis. As manifestações clínicas de *Mycoplasma gallisepticum* (MG) e *Mycoplasma synoviae* (MS) são tosse, corrimento, descarga ocular e nasal, decréscimo no consumo de alimentação, retardo de crescimento e lotes desiguais e queda na produção de ovos e mortalidade variável (Nascimento & Pereira 2009). Nas aves reprodutoras adultas, ocorre a forma crônica ou subclínica com baixo impacto nos índices produtivos. Por outro lado, a progênie costuma ser muito afetada, com descartes em razão de sacos aéreos lesados, ganho de peso reduzido e índices de conversão alimentar negativos (Mettifogo & Ferreira 2006). No Brasil, existem relatos do aumento das condenações de aves em matadouros pela presença de aerossaculite, que na sua maioria, pode ser decorrente de infecção pelo (MG) e (MS) e/ou em associação principalmente com *Escherichia coli* (Minharro et al. 2001, Branco 2004).

*E.coli* patogênica para aves (*Avian Pathogenic E. coli* - APEC), é responsável pela colibacilose e peritente ao grupo das *E.coli* patogênicas extra-intestinais, estando associada a quadros de: colisepticemia, peritonite, pneumonia, pleuropneumonia,

aerossaculite, pericardite, celulite, coligranuloma, DCR complicada, onfalite, salpingite, síndrome da cabeça Inchada, panoftalmia, osteomielite, ooforite e sinovite (Ferreira & Knobl 2009). Nas aves, a colibacilose inicia-se no epitélio traqueal, em contraste com a maioria das doenças causadas pela *E.coli* em humanos e outros mamíferos, afetados inicialmente no epitélio intestinal e urinário (Vidotto et al. 1997) e é responsável por condenações parciais ou totais das carcaças devido a vários processos inflamatórios, entre eles a aerossaculite (Brasil 1998).

As cepas de APEC possuem fatores de virulência específicos e são capazes de causar a colibacilose aviária (Cardoso et al. 2002, Delicato et al. 2003). Destacam-se como fatores essenciais para a patogenicidade das estirpes de *E. coli* a ação das adesinas, a produção de metabólitos bacterianos, fatores de resistência sérica, a ação de hemolisinas e aerobactina e a produção de citotoxinas (Brito 2003). Segundo Gibbs et al. (2003) e Rocha et al. (2008), a patogenicidade das estirpes está relacionada com o impacto cumulativo de vários fatores de virulência. Skyberg et al. (2003), em um estudo complementar sobre a letalidade embrionária de cepas de *E. coli*, demonstraram que apenas as cepas que apresentaram mais de dois fatores de virulência causavam a mortalidade em um número maior de embriões, mesmo que isolados de aves saudáveis.

Além do aumento das condenações, aves com aerossaculite podem apresentar-se com menor peso em relação a aves sem aerossaculite. A desuniformidade dos lotes na linha de abate aumenta o risco de erros durante a evisceração e, consequentemente, maior risco de contaminação das carcaças com patógenos do trato intestinal (Russel 2003).

A PCR pode tanto detectar, quanto tipificar o agente, sem a necessidade de um cultivo prévio, e por isso passou a desempenhar um papel de grande importância no diagnóstico laboratorial. Entre as vantagens do diagnóstico molecular, é possível citar a rapidez, a especificidade, a segurança dos resultados, a possibilidade de detecção de agentes de difícil cultivo ou de crescimento muito lento, detecção de agentes patogênicos em amostras clínicas de animais assintomáticos ou em tratamento com antibióticos, detecção antes da indução de uma resposta imunológica e em hospedeiros imunocomprometidos, demonstrando vantagens sobre os testes sorológicos (Moreno 2009).

O objetivo deste estudo foi relacionar a aerossaculite em frangos de corte à presença de MG, MS e gene *iss* de *E. coli* detectados pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 30 frangos de corte, coletados aleatoriamente na área de pendura de matadouro avícola sob Inspeção Sanitária localizado no Estado do Rio de Janeiro. Foi realizada a necropsia dessas aves para observação das lesões macroscópicas nos sacos aéreos e foram coletadas as traquéias de cada ave, acondicionadas em placa de Petri estéril sob refrigeração e encaminhadas ao Laboratório de Epidemiologia Molecular da Universidade Federal Fluminense (UFF). As traquéias foram submetidas à coleta com suabe e por escarificação para obtenção de espécimes diluídas em 1,0mL de “Phosphated Buffered Saline” (PBS), pH 7,4. O método de extração por fenol/clorofórmio, adaptado de Sambrook et al. (1989), foi realizado diretamente das amostras, sem a realização de pré-enriquecimento. A PCR para MG/MS (Buim, 2009) foi realizada com: 61,5µL de água ultrapura (Milli-Q), 10µL de Tampão PCR 10X, 4µL de MgCl<sub>2</sub> (50mM), 5µL de dNTP mix (0,25 mM de cada), 2µL (100 pmol) de cada “primer”, 2µL (2,5U/µL) de Taq Polimerase e 15µL do DNA extraído, obtendo-se um volume final de 100µL. Para amplificação do gene *iss* de *E. coli* (Rocha et al 2008) foi realizada a seguinte reação: 12,75 µL de água ultrapura (Milli-Q), 2,5µL de Tampão PCR 10X, 1,25µL de MgCl<sub>2</sub> (25mM), 1,25µL de dNTP mix (0,25 mM de cada), 1 µL (100 pmol) de cada “primer”, 0,25µL (2,5U/µL) de Taq Polimerase e 5µL do DNA extraído, obtendo-se um volume final de 25µL. Foram utilizados dois pares de “primers” para cada micro-organismo (Quadro 1). Como controle positivo utilizaram-se as cepas padrões MG-R (ATCC 19619), MS WUV 1853 (Charles River 538631) e a amostra padrão de gene *iss* de *E.coli* fornecida pelo Dr. Sílvio Luís da Silveira Rocha, do Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Após a reação de amplificação, homogeneizou-se 10µL de cada amostra com 2µL de tampão de arrasto, aplicou-se em gel de agarose a 1,5% submerso em Tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) 0,5X e por fim submeteu-se à eletroforese em condições baseadas em Sambrook et al. (1989). Após a corrida eletroforética, corou-se o gel em brometo de etídio e procedeu-se a visualização dos “amplicons”, sob luz ultravioleta em transiluminador. A influência do tipo de colheita de material biológico

(suabe, escarificado ou suabe+escarificado) sobre o resultado da PCR foi testado pelo teste exato de Fisher (Thrusfield 2003).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 30 frangos analisados, 30% (9/30) apresentaram lesões nos sacos aéreos. A presença de aerossaculite nesse estudo está de acordo com outros trabalhos que apontaram a aerossaculite como uma das principais causas de condenações de carcaças em matadouros (Branco 2004, Buim 2009). A presença de aerossaculite, *per si*, é fato que merece ser considerado de grande importância, pois além das perdas determinadas pela condenação de carcaças (Brasil 1998) pode comprometer a saúde das aves e do consumidor de produtos avícolas. Além do aumento das condenações, aves com aerossaculite podem apresentar-se com menor peso em relação a aves sem aerossaculite e essa desuniformidade na linha de abate aumenta o risco de erros durante a evisceração e, conseqüentemente, maior risco de contaminação das carcaças com patógenos do trato intestinal (Russel 2003).

Nenhuma das aves apresentou infecção por MG e/ou MS pela PCR, entretanto três das aves com aerossaculite 33,3% (3/9) apresentaram positividade para gene *iss* de *E. coli*, confirmando a presença da bactéria no sistema respiratório (Figura 1). Em contrapartida, recente trabalho de campo para frangos de corte com sorologia positiva para MG e MS na Turquia, aerossaculite foi o segundo tipo de lesão mais encontrada com frequência de 53,1% (Yilmaz 2011). Estudando infecções simples de MG, MS e *E.coli* em *pools* de frangos de corte condenados por aerossaculite em SIF de Goiás, Minharro et al. (2001) obteve as frequências de 9,7%, 0% e 41,9% respectivamente. Al-Attar et al. (2002) analisando um total de 100 granjas da zona norte e central da Jordânia investigou a associação de bacté-

Tabela 1. Sequência dos “primers”, tamanho dos fragmentos amplificados (pares de base/pb) e ciclos da PCR.

	Sequência dos “primers” (5'-3')	Tamanho fragmento	Ciclos da PCR
MG-1	5' CGT GGA TAT CTT TAG TTC CAG CTG C 3'	481 pb (Nascimento et al, 2005)	5 min 94°C / 35 ciclos (1 min 94°C, 1 min 55°C e 2 min 72°C) / 10 min 72°C
MG-2	5' GTA GCA AGT TAT AAT TTC CAG GCA T 3'	207 pb (Lauerman et al, 1993)	
MS-1	5'GAG AAG CAA AAT AGT GAT ATC A 3'	760 pb (Rocha et al, 2008)	5 min 94°C / 30 ciclos (1 min 94°C, 1 min 61°C e 2 min 72°C) / 2 min 72°C
MS-2	5' CAG TCG TCT CCG AAG TTA ACA A 3'	760 pb (Rocha et al, 2008)	
<i>E. Coli Iss-1</i>	5' GTG GCG AAA ACT AGT AAA ACA GC 3'	760 pb (Rocha et al, 2008)	5 min 94°C / 30 ciclos (1 min 94°C, 1 min 61°C e 2 min 72°C) / 2 min 72°C
<i>E. Coli Iss-2</i>	5' CGC CTC GGG GTG GAT AA 3'	760 pb (Rocha et al, 2008)	



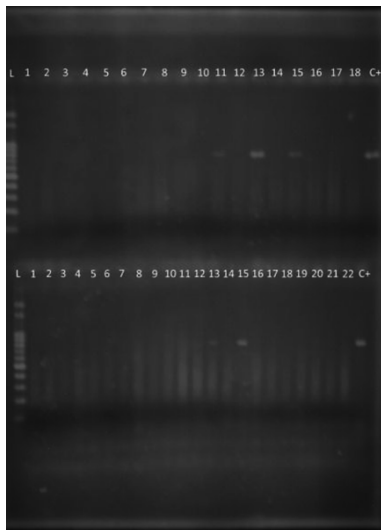


Figura 1. Gel de agarose com os "amplicons" de 760 pb referentes aos animais 11, 13 e 15 coletados por suabe (parte superior) e 13, 15 coletados por escarificado (parte inferior) positivos para *E.coli* gene *iss* pela PCR. M = Marcador de DNA de 100pb, C+ = controle positivo.

Tabela 2. Positivos e negativos para *E.coli* gene *iss* por suabe e escarificação como técnicas de processamento.

Técnicas de processamento	PCR <i>E.coli</i> gene <i>iss</i>		Total
	Positivo	Negativo	
Suabe	03	27	30
Escarificado	02	28	30
Suabe + escarificado	02	28	30

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

rias com aerossaculite em frangos de corte e isolou 170 bactérias, sendo 88,2% como *E.coli*, 8,8% como *Ornithobacterium rhinotracheale* e 3% como *Bordetella avium*. Tais resultados estão acima dos 33,3% de *E.coli* e ausência de MG e MS, encontrados neste trabalho, o que era de se esperar pelos autores terem trabalhado somente com aves de risco.

Pelo teste exato de Fisher, comparando-se a detecção de *E.coli* em material coletado por suabe e escarificação de traquéia, obteve-se um p>0,05, não havendo, portanto, diferença significativa entre os tipos de coleta (Tabela 1). Como não houve significância da influência do tipo de colheita de material biológico no diagnóstico de MG, pode-se supor que tanto suabe quanto escarificação podem ser utilizados em se tratando de PCR.

## CONCLUSÃO

*Escheria coli* foi encontrada em frangos de corte negativos para micoplasmas que apresentaram aerossaculite, levando a crer que a presença dessa bactéria pode ser suficiente para causar problemas no sistema respiratório de frangos de corte. A PCR foi uma técnica rápida e sensível para a detecção de

*E.coli* em frangos de corte, não sendo este diagnóstico influenciado pela de colheita de material biológico por suabe ou escarificação.

**Agradecimentos.** Ao Programa de Pós-Graduação de Higiene Veterinária e Produtos de Origem Animal da Universidade Federal Fluminense. Aos colegas do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Pública, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, pela valiosa ajuda deste trabalho. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Branco J.A.D. Manejo pré-abate e perdas decorrentes do processamento de frangos de corte. *Anais Conf. Apinco Cienc. Tecnol.*, 2:129-142, 2004
- Brasil, 1998. *Regulamento Técnico da Inspeção Tecnológica e Higiênico-sanitária de Carne de Aves do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA)*. Portaria nº210, de 10 de novembro de 1998. Diário Oficial República Federativa do Brasil, Brasília/DF, 11 de novembro. 1998. Seção 1.
- Brito B.G., Tagliari K.C., Berbel M.M. & Freire R.L. Produção de enterotoxina termoestável, hemolisinas, colicinas e fatores de colonização em amostras de *Escherichia coli* isoladas de leitões com diarréia no sudoeste do Paraná. *Sci. Agr.*, 4:15-20, 2003.
- Buim M.R., Mettifogo E., Timenetsky J., Kleven S. & Ferreira A.J.P. Epidemiological survey on *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* by multiplex PCR in comercial poultry. *Pesq. Vet. Bras.*, 27:552-556, 2009.
- Cardoso A.L.S.P., Tessari E.N.C., Castro, A.G.M., Pulici S.C.P. & Zanatta G.F. Prevalência de resistência em amostras de *Escherichia coli* de origem aviária. In: *Anais da Conferência Apinco de Ciência e Tecnologia Avícolas*. FACTA, Campinas, Campinas, 2002. p.129.
- Delicato E.R., Brito B.G., Gaziri L.C.J. & Vidotto M.C. Virulence associated genes in *Escherichia coli* isolates from poultry with colibacillosis. *Vet. Microbiol.*, 94:97-103, 2003.
- Ferreira A.J.P. & Knobl T. Colibacilose, p.457-471. In: Berchieri Junior A., Silva E.N., Di Fábio J., Sesti L. & Zuanaze M.A.F. *Doenças das Aves*. 2ª ed. Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, Campinas, 2009.
- Gibbs P.S., Maurer J.J., Nolan L.K. & Wooley E. Prediction of chicken embryo lethality with the avian *Escherichia coli* traits complement resistance, colicin V production, and presence of increased serum survival, gene cluster (*iss*). *Avian Dis.*, 47:370-379, 2003.
- Lauerman L.H., Hoerr F.J., Sharpton A.R., Shah S.M. & van Santen V.L. Development and Application of a Polymerase Chain Reaction Assay for *Mycoplasma synoviae*. *Avian Dis.*, 37:829-834, 1993.
- Mettifogo E. & Ferreira A.J.P. Micoplasmose aviária, p.147-151. In: Andreatti Filho R.L. (Ed.), *Saúde Aviária e Doenças*. Roca, São Paulo, 2006.
- Minharro S., Linhares G.F.C., Andrade M.A., Rocha P.T. & Santana A.P. Envolvimento de *Escherichia coli*, de *Mycoplasma gallisepticum* e de *Mycoplasma synoviae* em lesões de sacos aéreos em frangos abatidos no Estado de Goiás. *Cienc. Anim. Bras.*, 2:111-117, 2001.
- Moreno A.M. Técnicas moleculares de diagnóstico, p.413-427. In: Revollo L. & Ferreira A.J.P. (Eds), *Patologia Aviária*. Editora Manole, Barueri, SP, 2009.
- Nascimento E.R. & Pereira V.L.A. Micoplasmoses, p.485-500. In: Di Fábio J. & Rossini L.I. (Eds), *Doenças das Aves*. FACTA, Campinas, 2009.
- Nascimento E.R., Nascimento M.G.F., Vasconcelos M.P., Barreto M.L., Almeida J.F., Campos C.A.M. & Pereira V.L.A. Aprimoramento da PCR para *Mycoplasma gallisepticum* pelo encurtamento do am-

- plicon e ajuste no processamento da amostra. *Acta Sci., Vet.* 33:297-301, 2005.
- 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.*, 28:183-186, 2008.
- Russel S.M. The effect of airsacculitis on bird weights, uniformity, fecal contamination, processing errors, and populations of *Campylobacter* spp and *Escherichia coli*. *Poult. Sci.*, 82:1326-1331, 2003.
- Saeb N., El-Sukhon, Asad Musa, Majed Al-Attar. Studies on the Bacterial Etiology of Airsacculitis of Broilers in Northern and Middle Jordan with Special Reference to *Escherichia coli*, *Ornithobacterium rhinotracheale*, and *Bordetella avium*. *Avian Dis.*, 46:605-612, 2002.
- Sambrook J., Fritsch E.F. & Maniatis T. *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Vol.2, Chap.14. 2<sup>nd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 1989.
- Skyberg J.A., Horne S.M., Giddings C.W., Wooley R.E., Gibbs P.S. & Nolan L. Characterizing avian *Escherichia coli* isolates with multiplex polymerase chain reaction. *Avian Dis.*, 47:1441-1447, 2003.
- Thrusfield M. *Epidemiologia Veterinária*. 2<sup>a</sup> ed. Roca, São Paulo. 2003. 556p.
- Vidotto M.C., Navarro H.R. & Gaziri L.C.J. Adherence pili of pathogenic strains of avian *Escherichia coli*. *Vet. Microbiol.*, 59:79-87. 1997.
- Yilmaz F., Timurkaan N., Kilic A., Kalender H. & Kilinc U. Detection of *Mycoplasma synoviae* and *Mycoplasma gallisepticum* in chickens by immunohistochemical, PCR and culture methods. *Rev. Med. Vet.*, 162:79-86, 2011.