

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*

Thaís Badini Vieira¹⁺, Virginia Leo de Almeida Pereira², Robson Maia Franco³, Elmiro Rosendo do Nascimento², Rita de Cássia Figueira Silva¹ e Rogério Tortelly⁴

ABSTRACT. Vieira T.B., Pereira V.L.A., Franco R.M., do Nascimento E.R., Silva R. de C.F. & Tortelly R. [Pathogenic potential and septic character of the *Escherichia coli* by identification of virulence factors *iss* and *felA* from cellulitis and offal of broiler by Sanitary Inspection.] 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. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 36(2):144-152, 2014. Departamento de Medicina Veterinária. Universidade Federal do Mato Grosso, Campus Universitário de Sinop, Avenida Alexandre Ferronato, 1200, Setor Industrial, Sinop, MT 78557367, Brasil. E-mail: thaïs.badini@hotmail.com

Brazil is the third largest chicken producer and first in exports of broiler meat. Skin lesions such as avian cellulitis are becoming increasingly frequent in large-scale production due to premises type and management of broilers, leading to total or partial condemnation at slaughter throughout the world. In this study, we used 51 broilers with typical lesions of cellulitis, diagnosed by Sanitary Inspection. Recovery of *Escherichia coli* strains from cellulitis lesions and offal (liver and heart) from studied broilers established the of septic characteristic of the isolates. These *E. coli* isolates were tested by Polymerase Chain Reaction (PCR) for the genes of the virulence factors responsible for adhesion (F11 fimbria-*felA*) and serum resistance (*iss*). The cellulitis at inspection was characterized as skin ulcer, being eight with skin thickening, color changes tending to reddish-yellow, and irregular skin surface. At cutting, gelatinous fluid and yellowish patches were seen, in some cases, with involvement of the adjacent musculature. *E. coli* was isolated from 50 broilers, being 19, from cellulitis, 11 from cellulitis and liver, five from cellulitis and heart, 14, from cellulitis, liver and heart, and one only from liver and heart. *E. coli* isolates were recovered from 96% of cellulitis, 50.98% from liver and 41.17% from the heart samples. There was no significant association between cellulitis lesion size and *E. coli* rate of recovery from cellulitis and offal (liver and heart) by chi-square test ($p > 0.05$). Of 190 *E. coli* isolates from the 51 studied broilers, 59.47% were positive for *iss* gene and 4.2% for the *felA* gene. The recovery of *E. coli* from cellulitis and offal strengthen the idea that the partial removal of cellulitis lesions at slaughter only minimizes the repulsive aspect of the carcass which turns out to be more aesthetic than hygienic, not contributing to poultry products safeness.

KEY WORDS. Colisepsicemia, cellulitis, PCR, broiler.

*Recebido em 29 de julho de 2012.

Aceito para publicação em 10 de janeiro de 2014.

¹ Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Mato Grosso, Campus Universitário de Sinop, Avenida Alexandre Ferronato, 1200, Setor Industrial, Sinop, MT 78557367 MT, Brasil, e Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal), Faculdade de Veterinária (FV), Universidade Federal Fluminense (UFF), Rua Vital Brasil, 64, Niterói, RJ 24320-340, Brasil. + Autora para correspondência, Email: thaïs.badini@hotmail.com

² Médico-veterinário, DSc., Departamento de Saúde Coletiva Veterinária e Saúde Pública, FV, UFF, Rua Vital Brasil, 64, Niterói, RJ 24320-340. E-mail: msv@vm.uff.br

³ Médico-veterinário, DSc. Departamento de Tecnologia de Alimentos, FV, UFF, Rua Vital Brasil, 64, Niterói, RJ. E-mail: mta@vm.uff.br

RESUMO. O Brasil é o terceiro maior produtor mundial e o primeiro colocado nas exportações de carne de frango. As lesões cutâneas, como a celulite aviária, vêm se tornando cada vez mais frequente em função da produção em larga escala, do tipo de criação e do manejo de frangos de corte e são consideradas como uma das maiores causas de condenações totais e parciais em todo o mundo. Para esta pesquisa, foram utilizados 51 frangos de corte com lesões típicas de celulite identificadas pela Inspeção Sanitária. Foram isoladas estirpes de *Escherichia coli* das lesões de celulite e de miúdos (fígado e coração) dos frangos estudados, a fim de estabelecer o caráter séptico da lesão. Estas estirpes de *E.coli* foram testadas pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), para a presença dos genes dos fatores de virulência responsáveis pela capacidade de adesão (fimbria F11-*felA*) e resistência sérica (*iss*). Na Inspeção, as lesões de celulite apresentaram úlcera cutânea, sendo que oito com espessamento de pele, alterações na coloração tendendo ao amarelo-avermelhado e irregularidade na superfície cutânea. Ao corte, notou-se presença de fluido gelatinoso e placas amarelas destacáveis e em alguns casos foi visível o acometimento da musculatura adjacente. Foram recuperadas estirpes de *E. coli* em 96% das lesões de celulite, em 50,98% das amostras de fígado e em 41,17% das de coração. *E. coli* foi isolada de 50 frangos. Em 19, a bactéria estava presente somente em lesões de celulite; em 11, nas lesões de celulite e no fígado; em cinco, nas lesões de celulite e no coração; em 14, nas lesões de celulite, no fígado e no coração; e em uma, somente no fígado e no coração. Não houve significância pelo método de qui-quadrado ($p>0,05$) ao correlacionar os tamanhos das lesões com os isolamentos de *E.coli* em celulite e celulite e miúdos (fígado e coração). Dos 190 isolados de *E. coli* provenientes dos 51 frangos estudados, 59,47% foram positivos para o gene *iss* e 4,2%, para o gene *felA*. O isolamento de *E.coli* de celulite e miúdos em frangos de corte fortalece a idéia de que a remoção parcial das lesões de celulite apenas minimiza o aspecto repugnante da carcaça, sendo mais estética do que higiênica, não contribuindo para eliminação da contaminação, que poderia se estender às linhas de produção.

PALAVRAS-CHAVE. Colisepsicemia, celulite, PCR, frango.

INTRODUÇÃO

A avicultura brasileira desenvolveu-se e modernizou-se rapidamente alcançando níveis elevados de produtividade nos últimos 30 anos e destacan-

do-se por uma trajetória de incremento tecnológico expressivo, alavancada pela destacada articulação entre os diferentes agentes que a compõe (Giroto & Miele 2006). O Brasil é o terceiro maior produtor mundial e o primeiro colocado nas exportações de carne de frango (ABEF 2009).

Em função da produção em larga escala, do tipo de criação e do manejo de frangos de corte, as lesões cutâneas, como a celulite, vêm se tornando cada vez mais frequentes, sendo uma das maiores causas de condenações totais e parciais em todo o mundo (Andrade 2005). De acordo com a Portaria nº 210 de 26/11/1998 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (Brasil 1998) deverão sofrer condenação parcial, qualquer órgão ou partes de carcaça que estiverem afetados por um processo inflamatório, como a celulite, e condenação total, quando houver a evidência de caráter sistêmico, carcaça e vísceras. A lesão de celulite é caracterizada pela formação de placas fibrinocaseosas no tecido subcutâneo profundo, oriundas de uma inflamação purulenta, aguda e difusa, localizando-se principalmente nas regiões de abdômen e sobrecoxa (Silva & Mota 2003, Andrade 2005, Vieira 2006, Alves 2007).

Microscopicamente há inflamação do tecido subcutâneo formando massa constituída de restos celulares necróticos e bandas de fibrina, circundadas por cápsula de tecido conjuntivo contendo heterófilos, linfócitos e macrófagos, podendo haver formação granulomatosa e envolvimento do folículo plumoso (Onderka et al. 1997, Fallavena 2000, Andrade 2005, Alves 2007).

A celulite apresenta etiologia multifatorial, porém a *Escherichia coli* tem sido um dos agentes mais frequentemente isolados. É indispensável que a pele esteja lesada para que as bactérias invadam e se multipliquem no hospedeiro, embora este fator não seja isoladamente suficiente para a ocorrência da enfermidade (Allan 1997, Norton et al. 1999, Fallavena 2000).

A presença de *E. coli* nas lesões de celulite favorece a contaminação cruzada nas linhas de processamento de frangos, além disso, o descarte parcial de algumas lesões difusas pode favorecer ao aumento da quantidade inicial de bactérias no interior da carcaça. Gomis et al. (1997, 2000) demonstraram que aves condenadas por celulite apresentaram uma combinação com outras lesões em coração, sacos aéreos, ossos, articulações e/ou fígado, embora, em alguns casos não tenha sido possível o isolamento do mesmo sorogrupo nas lesões de celulite e dos outros tecidos.

A análise genômica das estirpes tem mostrado que *E. coli* isoladas de celulite estão geneticamente relacionadas àquelas responsáveis por septicemia e meningite em humanos, devendo ser considerada também a habilidade da *E. coli* em adquirir fatores de virulência por transferência e a probabilidade do surgimento de estirpes patogênicas emergentes (Ngeleka et al. 1996, Kumor et al. 1998, Kuhnert et al. 2000).

Estirpes de *E. coli* capazes de causar infecções extraintestinais são denominadas “Extraintestinal Pathogenic *E. coli*” (ExPEC) e agrupam estirpes de “Urophatogenic *E. coli*” (UPEC) que determinam infecções no trato urinário em humanos e “Avian Pathogenic *E. coli*” (APEC), que causam infecções respiratórias, pericardite e septicemia em aves (Kaper et al. 2004).

De acordo com Kariyawasam et al. (2007), os mecanismos de adaptação de estirpes de APEC assemelham-se aos da UPEC, permitindo às APEC causar doença extraintestinal em seres humanos. Não obstante, segundo Hammerum & Heuer (2009), é possível que infecção do trato urinário em humanos seja causada por cepas de UPEC resistentes a antimicrobianos que tiveram sua origem a partir de estirpes de animais.

Produtos derivados de frangos têm sido considerados potenciais fontes para contaminação de humanos por *E. coli* patogênica resistente a antibióticos (Jonhson et al. 2003), sendo o principal reservatório de ExPEC causador de infecções extraintestinais em humanos (Vicente et al. 2010). Adicionalmente, existem estudos que demonstraram que os métodos de limpeza empregados no ambiente doméstico frequentemente são ineficazes para eliminação de patógenos contaminantes de alimentos, aumentando a importância da contaminação cruzada (Cogan et al. 1999).

Os mecanismos de virulência da APEC têm sido continuamente estudados e considerados multifatoriais. Os mais frequentemente mencionados são: de adesão (*pap* e *felA*), de produção de colicina (*cva*), de presença de aerobactina (*iut*), de resistência sérica (*iss*), flagelos, antígenos capsulares (*Kps*) e hemaglutinina temperatura-sensível (*Tsh*) (La Ragione & Woodward 2002, Rocha et al. 2002, Ewers et al. 2004).

O gene *iss* tem sido localizado em vários plasmídios de grandes dimensões que são capazes de carrear simultaneamente fatores de virulência e de resistência a antimicrobianos (Johnson et al. 2002). É um determinante genético que pode mediar a resistência da bactéria aos efeitos bactericidas do

soro do hospedeiro. A resistência sérica tem sido associada com a capacidade da *E. coli* resistir ao sistema imune do hospedeiro, produzindo infecções generalizadas em frangos e infecções extraintestinais em outras espécies (Ngeleka et al. 1996, Allan 1997). A expressão do gene *iss* foi observada aumentando em 20 vezes esta capacidade de resistência bacteriana aos efeitos do soro (Chuba et al. 1986). Serve como marcador de virulência das estirpes patogênicas nas aves, uma vez que a expressão desse gene frequentemente prediz seus efeitos patogênicos (Gibbs et al. 2003, Nolan et al. 2002). Porém, a ausência do gene *iss* não assegura que estirpes não sejam patogênicas (Foley et al. 2000, Pfaff-McDonough et al. 2000).

A adesão da bactéria a superfície celular é o primeiro passo para a instalação de um processo infeccioso. As bactérias patogênicas são capazes de aderir às células quando possuem uma estrutura de superfície específica, denominada “pili” ou “fimbria”. Uma variante sorológica da fimbria P (F11) é codificada pelo operon *felA* e tem sido detectada em amostras de celulite e colissepticemia em aves (De Ree et al. 1985, Brito et al. 2003, Delicato et al. 2003, Rodriguez-Siek et al. 2005).

Este estudo teve como objetivo isolar e identificar *E. coli* de lesões de celulite, coração e fígado de frangos de corte e identificar fatores de virulência de resistência sérica (*iss*) e fimbrial F11 (*felA*), a fim de avaliar o potencial patogênico dos isolados e o caráter séptico da doença.

MATERIAL E MÉTODOS

Em matadouro de aves, 51 frangos de corte com idade entre 35 e 40 dias, apresentando lesões sugestivas de celulite foram retirados da linha de abate após a depenação durante a Inspeção Sanitária. Estas aves foram encaminhadas para o Laboratório de Controle de Qualidade, onde as lesões de celulite foram mensuradas, descritas macroscopicamente e registradas em fichas individuais. Foram colhidas amostras de pele e miúdos (coração e fígado) de cada frango de corte, com suabes estéreis para o exame microbiológico. O material foi acondicionado em tubo de ensaio contendo meio Cary e Blair, mantido refrigerado e transportado ao Laboratório de Controle Microbiológico de Produtos de Origem Animal - Universidade Federal Fluminense (UFF) para o isolamento e caracterização microbiana.

Os suabes foram retirados dos tubos com meio Cary e Blair e inoculados em tubos de ensaio esterilizados contendo 3,0 mL de caldo “Brain Heart Infusion” (BHI) e incubados a 37°C por 24 horas. Após esse período uma alíquota do caldo BHI foi semeada em ágar MacConkey e Agar Eosina Azul de Metileno (EMB) e as placas incubadas a 37°C por 24h, de acordo com a metodologia

descrita por Quinn et al. (1994). Do crescimento no ágar MacConkey e no Agar EMB duas colônias foram selecionadas e inoculadas individualmente nos meios Sulfeto Indol Motilidade (SIM), Citrato (Difco), MILi (Motilidade Indol Lisina) (Toledo et al. 1982a) e meio de Rugai e Araújo modificado (EPM) (Toledo et al. 1982b). Os tubos foram incubados a 37°C por 24 horas para bioquímica presuntiva. Os cultivos considerados positivos no meio EPM foram inoculados em BHI contendo 20% de glicérol e estocados em “freezer” para provas laboratoriais posteriores.

A PCR para detecção do gene *iss* e *felA* nos isolados de *E. coli* foi realizada no Laboratório de Epidemiologia Molecular da Faculdade de Veterinária da UFF, conforme metodologia utilizada por Rocha et al. (2008).

As amostras estocadas foram descongeladas e semeadas em caldo BHI e incubadas a 37°C durante 24 horas, para reativação. Foram utilizadas como controles da prova, uma amostra-padrão positiva para a presença do gene *iss* e uma amostra positiva para o gene *felA* fornecidas pelo Dr. Sílvio Luís da Silveira Rocha do Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Foi utilizada a técnica de extração térmica do DNA (Rocha et al. 2008). Dos isolados de *Escherichia coli* semeados em caldo BHI foram retiradas alíquotas de 1,0 mL e acondicionadas em tubos tipo “Eppendorf”, previamente esterilizados. Esse material foi centrifugado a 13.500 rpm em centrífuga refrigerada (ALC-PK 121R-Annita IIR-Processing e Control Interface) a 10°C por dez minutos. O sobrenadante foi descartado e 0,8 mL de água Milli Q adicionado ao tubo com a amostra. Esse material foi homogeneizado com pipeta e centrifugado novamente, utilizando-se o mesmo tempo e a mesma temperatura. Após essa etapa, foi descartado o sobrenadante e 80 µL de água Milli-Q, adicionados ao tubo. Os tubos foram levados para um bloco térmico (Quimis-Q331) a 95°C durante 10 minutos e após esse período, o sobrenadante foi transferido para um *Eppendorf* esterilizado e mantido congelado para análise posterior de amplificação do DNA.

Foram utilizados os seguintes pares de primers: *iss* 5'-GTG GCG AAA ACT AGT AAA ACA GC-3' e 5'-CGC CTC GGG GTG GAT AA-3', amplificando 760pb; e *felA*, 5'-GGC AGT GGT GTC TTT TGG TG-3' e 5'-GGC CCA GTA AAA GAT AAT TGA ACC-3', que amplificam 270 pb (Rocha et al. 2008). Para a amplificação dos genes *felA* e *iss* foram utilizados 12,75µl de água para PCR; 2,5µl de tampão PCR 10x, 2,5µl; 1,25µl dNTP com 2,5mM de cada nucleotídeo, 1,25µl MgCl₂ 50mM, 100pM de cada “primer” (Prodinol), 1,25U de *Taq* DNA polimerase e 5µl do DNA extraído.

As condições para as amplificações feitas em termociclador PTC-100 (PELTIER-EFFECT CYCLING-MJ Research, Inc.) foram as seguintes: 5 min 94°C / 35 ciclos 1 min 94°C, 1 min 64°C e 2 min 72°C / 10 min 72°C, para o gene *felA* e 5 min 94°C / 30 ciclos de 1 min 94°C, 1 min 61°C e 2 min 72°C / 10 min 72°C para o gene *iss*

Os produtos de amplificação foram submetidos a eletroforese a 55 V em gel de agarose a 1,5%, submer-

sa em Tampão Tris-Borato- EDTA (TBE) 0,5X, durante aproximadamente duas horas. Após a corrida eletroforética, o gel de agarose foi corado com brometo de etídio e observado sob luz ultravioleta em transiluminador (EB-20E-ultra-Lum - Inc. Carson, Califórnia). Para estimar o peso molecular dos “amplicons” gerados pelos “primers” foi utilizado o marcador Ladder 100pb.

RESULTADOS

Na Inspeção Sanitária, as amostras de pele das 51 aves com suspeita de celulite apresentaram úlcera cutânea, sendo que oito estavam com espessamento de pele, alterações na coloração tendendo ao amarelo-avermelhado e irregularidade na superfície cutânea, unilateralmente. Oito aves tinham lesões bilaterais. Ao corte, foi notada a presença de fluido gelatinoso e placas amarelas destacáveis, ora dispersas e difusas no subcutâneo e ora, firmes, consistentes e restritas. Em alguns casos foi visível o acometimento da musculatura adjacente, pela presença de focos hemorrágicos.

O tamanho das lesões variou de um a vinte centímetros e em nenhuma ave alterações significantes em órgãos internos foram observadas. Das 51 aves com suspeita de celulite, 49,01% apresentaram lesões na região caudo-lateral direita, 35,29% a lesão estava presente na região caudo-lateral direita e em 15,68% dos frangos a enfermidade pode ser observada na região caudo-lateral direita e esquerda, simultaneamente. A frequência relativa das alterações macroscópicas observadas pode ser visualizada na figura 1.

Das 51 aves estudadas, foi isolada *E. coli* em 50. Em 19, a bactéria estava presente somente em lesões de celulite; em 30, houve isolamento em celulite em miúdos, sendo 11, nas lesões de celulite e no fígado; em cinco, nas lesões de celulite e no coração e 14, nas lesões de celulite, no fígado e no coração. Em uma ave, foi detectada *E. coli* somente no fígado e no coração. Foram recuperadas estirpes de *E. coli* de 96% das lesões de celulite, em 50,98% das amostras de fígado e 41,17% das de coração.

Não houve significância na associação dos tamanhos das lesões com os isolamentos de *E. coli* em celulite e celulite e miúdos (fígado e coração), pelo método de qui-quadrado ($p > 0,05$), conforme descrito na tabela 1.

Foram obtidos 190 isolados de *E. coli*, sendo 98 a partir das lesões de celulite, 52 a partir de fígado e 40 a partir de coração. Destes 190 isolados, 113 (59,47%) foram positivos para o gene *iss*, sendo 59 (60,2%) das estirpes isoladas de celulite, 26 (50%) dos isolados de fígado e 28 (70%) dos isolados de coração (Figura 2).

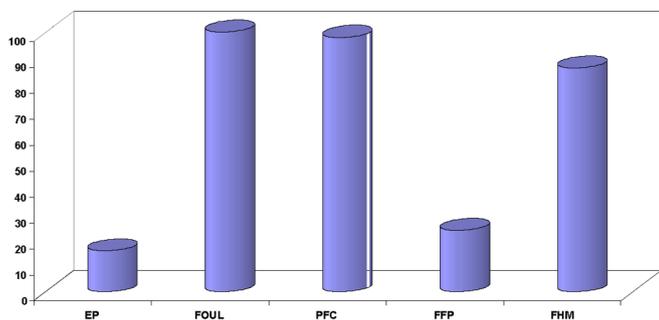


Figura 1. Frequência relativa (%) das principais alterações macroscópicas encontradas em tegumento de frangos de corte com celulite. EP: espessamento de pele; FOUL: focos ulcerativos; PFC: placa fibrinocaseosa em subcutâneo; FFP: fluido amarelado fibrinopurulento; FHM: focos hemorrágicos em tecido muscular.

Tabela 1. Tamanho de lesão versus Isolamento de *E. coli* em celulite e miúdos (fígado e coração) de frangos de corte sob Inspeção Sanitária

Tamanho de lesão (cm)	Isolamento de <i>E. coli</i>			
	Celulite	Celulite + Miúdos (Fígado e/ou Coração)	Miúdos (Fígado e/ou coração)	Total de aves
Menor que 5,17*	14	18	1	33
Maior que 5,17*	5	12	-	17
Total	19	30	1	50

*Diferenciação entre tamanho das lesões obtidas a partir do cálculo do valor da moda que foi de 5,17 cm.

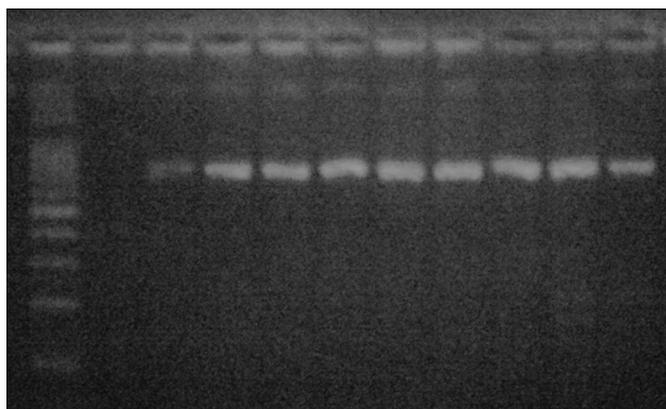


Figura 2. Marcador Molecular de DNA 100pb; CN: controle negativo; CP: controle positivo; 1 a 8: estirpes de *E. coli iss* positivas.

Do total de isolados, oito (4,2%) apresentaram positividade para o gene *felA*, sendo quatro de isolados de celulite, duas de estirpe de fígados e duas de coração (Figura 3).

O percentual dos isolados de *E. coli iss* e *felA* positivos em celulite e miúdos (fígado e coração) dos frangos de corte estão discriminados na tabela 2.

Dos 19 frangos em que *E. coli* foi isolada somente de celulite, em 57,89% (11/19) foi possível a identificação de um ou mais isolados *iss* positivos. A presença do gene *iss* em *E. coli* de acordo com a origem

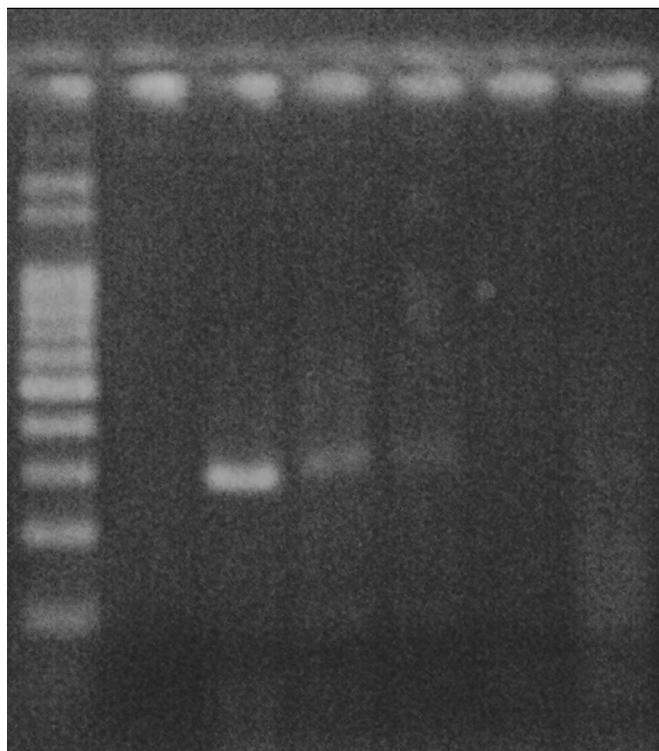


Figura 3. Marcador Molecular de DNA 100pb; CN: controle negativo; CP: controle positivo; 1 e 2: estirpes de *E. coli felA* positivas; 3 e 4: estirpes de *E. coli felA* negativa.

Tabela 2. Isolados de *E. coli iss* e *felA* positivos em celulite e miúdos (fígado e coração) de frangos de corte sob Inspeção Sanitária.

Origem da Amostra	Número de Isolados de <i>E. coli</i>	<i>E. coli iss</i> positivas	<i>E. coli felA</i> positivas
Celulite	98	59/98 (60,20%)	4/98 (4,08%)
Fígado	52	26/52 (50,00%)	2/52 (3,84%)
Coração	40	28/40 (70,00%)	2/40 (5,00%)
Total	190	113/190 (59,47%)	8/190 (4,20%)

dos isolados - celulite, celulite e miúdos (fígado e/ou coração) e somente miúdos (fígado e/ou coração) - pode ser visualizada na tabela 3.

E. coli foi isolada de celulite e miúdos de 30 aves. Em sete (23,33%), foi detectado o gene *iss* somente nas estirpes provenientes de celulite; em 16 (53,33%), de celulite e pelo menos um dos miúdos (fígado ou coração) e em cinco (16,66%), de pelo menos um dos miúdos (fígado ou coração), embora não tenha sido evidenciado no isolado de celulite. Em duas aves, *E. coli* foi isolada de celulite e de fígado simultaneamente, mas o gene *iss* não estava presente

Ao correlacionar os dados de tamanho das lesões e isolamento de *E. coli iss* positiva em celulite, celulite e miúdos (fígado e/ou coração) e somente nos miúdos, constatou-se que não houve significância pelo método de qui-quadrado ($p > 0,05$), conforme descrito na tabela 4.

Tabela 3. Identificação do gene *iss* nos isolados de *E. coli* de celulite e miúdos (fígado e/ou coração) em frangos de corte sob Inspeção Sanitária

Origem do Isolado de <i>E. coli</i>	Identificação do gene <i>iss</i>				Total
	Celulite	Celulite + Miúdos (fígado e/ou coração)	Miúdos (fígado e/ou coração)	<i>iss</i> negativo	
Celulite	11	-	-	8	19
Celulite + Miúdos (fígado e/ou coração)	7	16	5	2	30
Miúdos (fígado e/ou coração)	-	-	1	-	1
Total	18	16	6	10	50

Tabela 4. Tamanho de Lesão versus *E. coli iss* positiva isolada de Celulite e Miúdos (fígado e/ou coração) de frangos de corte sob Inspeção Sanitária

Tamanho de lesão de celulite (cm)	Isolados de <i>E. coli</i> gene <i>iss</i> positivos			
	Celulite	Celulite + Miúdos	Miúdos	Total
Menor que 5,17*	13	10	3	26
Maior que 5,17*	5	5	4	14
Total	18	15	7	40

*Diferenciação entre tamanho das lesões obtidas a partir do cálculo do valor da moda que foi de 5,17cm.

DISCUSSÃO

Os achados macroscópicos demonstraram que lesões de celulite podem ser visualizadas no abate após a depenagem. Nem sempre ocorre o espessamento da pele, em 43 das 51 aves estudadas, a celulite foi identificada apenas como uma ulceração cutânea. Os demais aspectos observados na Inspeção Sanitária, estavam de acordo com a literatura que descreve a celulite como um processo inflamatório no tecido subcutâneo caracterizado pela descoloração e engrossamento da pele, detectado no abate (Fallavena 2000, Andrade 2005, Vieira 2006, Alves 2007). Em alguns casos notaram-se pontos hemorrágicos em musculatura, assim como relatado por Silva & Mota (2003), Andrade (2005), Vieira (2006) e Alves (2007). Achados macroscópicos da celulite permite à equipe de inspeção identificar a enfermidade e realizar o julgamento e destino das carcaças.

Estirpes de *E. coli* foram isoladas em 96% das lesões de celulite reforçando os achados de que a espécie bacteriana está frequentemente presente na lesão (Norton et al. 1999, Fallavena 2000). Estas bactérias também foram isoladas em 50,98% das amostras de fígado e em 41,17% das amostras de coração. Embora *E. coli* tenha sido isolada dos mi-

údos, não foram observadas alterações macroscópicas que indicassem a infecção. Gomis et al. (1997, 2000) descreveram que estirpes de *E. coli* podem estar presentes em locais com estágios recentes de infecção sem determinar lesões macroscópicas, o que caracteriza a importância da enfermidade e as implicações com a saúde coletiva, visto que as condenações de carcaça e vísceras serão totais somente quando houver evidência do caráter sistêmico (Brasil 1998).

A frequência de isolamento de *E. coli* foi maior em órgãos internos de aves que apresentaram lesões de celulite de tamanhos menores. Estes resultados reforçam os descritos por Jeffrey et al. (1999), em que algumas estirpes de *E. coli*, conquanto possam causar lesões leves, são capazes de penetrar na corrente sanguínea, podendo levar a morte dos animais. Além disso, Brito et al. (2003) demonstraram que estirpes isoladas de celulite desenvolvem mais frequentemente casos de septicemia, quando comparadas a outras, isoladas de outras manifestações clínicas de colibacilose. Segundo Gomis et al. (1997, 2000), *E. coli* foi isolada do pericárdio e dos sacos aéreos de aves sem lesões graves aparentes, mas não foram isoladas de lesões macroscopicamente graves, o que foi justificado pela existência de *E. coli* em estágios recentes de infecção sem que tenham determinado lesões macroscópicas nos órgãos analisados. De acordo com os autores, o isolamento de diferentes sorogrupos de *E. coli* de lesões de celulite e de outros tecidos de uma mesma ave, deve-se ao fato de que aves com celulite tornam-se mais susceptíveis ao desenvolvimento de colisepticemia devido ao estresse causado pela presença de celulite e vice-versa.

O percentual de identificação do gene *iss* das estirpes isoladas de lesões de celulite (60,20%), de fígado (50%) e de coração (70%) no presente estudo foram inferiores aos obtidos em outros estudos. Ngeleka et al. (1996), verificaram em amostras isoladas de celulite que 71% das cepas expressaram resistência ao complemento do soro. As amostras estudadas por Gomis et al. (2000) apresentaram positividade de 88% e Brito et al. (2003) descreveram a presença do gene em 83% das *E. coli* isoladas de celulite em contraste com nenhuma estirpe positiva obtida dos isolados fecais.

Segundo Fallavena (2000) a gravidade das lesões irá depender de fatores como a quantidade de bactéria, severidade e da presença de lesões cutâneas e estado imunológico do hospedeiro. Assim, mesmo que o gene de resistência sérica esteja presente ele sozinho não determinaria o potencial patogê-

nico da estirpe, não obstante contribua para torná-la mais invasiva já que a sua presença prediz os efeitos patogênicos dos isolados (Nolan et al. 2002, Gibbs et al. 2003). Além disso, uma vez que esse gene foi localizado em plasmídeos capazes de carrear simultaneamente fatores de virulência e resistência a antimicrobianos, sua identificação torna-se importante, visto que estas cepas serviriam como reservatório de genes os quais poderiam ser transplantados por conjugação para outras estirpes da mesma espécie ou para espécies diferentes como descrito por Hammerum & Heuer (2009).

Nas aves estudadas, foram isoladas *E. coli* de celulite e miúdos. Em algumas aves notou-se o gene *iss* somente nas estirpes de *E. coli* isoladas de celulite; em outras o gene foi identificado em cepas obtidas de celulite e de pelo menos uma estirpe obtida a partir dos órgãos internos; evidenciando-se também, estirpes positivas para o gene *iss* em pelo menos um órgão interno, sem que tenha havido evidência no isolado de celulite. Nestes casos, embora as estirpes bacterianas apresentassem características fenotípicas semelhantes, as genéticas foram diferentes, havendo a possibilidade das estirpes de *E. coli* da lesão de celulite terem alcançado os órgãos internos ou, que as lesões de celulite tenham tornado as aves susceptíveis à colonização por outras estirpes de *E. coli* ou por outros micro-organismos, reforçando o proposto por Gomis et al. (1997, 2000).

O gene *felA* foi identificado em 4,2% do total dos isolados no presente estudo, resultado inferior aos obtidos por Brito et al. (2003), que encontraram 19% de positividade em amostras de celulite, e dos 12% e 78% obtidos, respectivamente por Delicato et al. (2003) e Rodriguez-Siek et al. (2005), em isolados a partir de casos de colisepticemia. Tal achado permite-nos sugerir que a fímbria F11 não está amplamente difundida entre as estirpes de *E. coli* presente em lesões de celulite aviária, embora possa ser importante como componente determinante para outros casos de colibacilose aviária.

A presença de gene *iss* em amostras de *E. coli* provenientes de miúdos detectada neste trabalho, em aves com lesões pequenas de celulite podem representar um risco à saúde dos consumidores. Estirpes reconhecidamente patogênicas para aves podem carrear genes de fatores de virulência e/ou genes resistentes que seriam transferidos a estirpes que colonizam a microbiota intestinal de humanos conforme preconizado por Ngeleka et al. (1996), Kumor et al. (1998), Kuhnert et al. (2000), Hammerum & Heuer (2009). Algumas estirpes de *E. coli* provenientes de animais poderiam ainda se

instalar e colonizar o trato intestinal humano (Ojaniyi 1989). Embora não seja um risco direto para a saúde humana, tais estirpes poderiam originar uma infecção bacteriana com opções limitadas de tratamento, uma vez que produtos de frango são constantemente incriminados como as principais fontes de contaminação em humanos por *E. coli* resistente a antimicrobianos (Johnson et al. 2003 e Hammerum & Heuer 2009). Além disso, de acordo com Rodriguez-Siek et al. (2005) e Kariyawasam et al. (2007) algumas estirpes de APEC são capazes de causar doenças extintestinais em humanos.

CONCLUSÃO

As lesões de celulite podem ser visualizadas macroscopicamente no abate, permitindo o julgamento e destino das carcaças de acordo com a legislação brasileira.

O tamanho das lesões de celulite não pode ser um critério para o processo de julgamento e destino correto das carcaças, visto que pode ocorrer colisepticemia mesmo em lesões de celulite de menor diâmetro.

O fator de virulência que confere resistência sérica (*iss*) pode ser identificado na maior parte dos isolados de *E. coli* a partir de amostras de coração em aves com celulite, representando um risco à Saúde Coletiva.

Os resultados obtidos neste estudo fortalecem a ideia de que a remoção parcial das lesões de celulite apenas minimiza o aspecto repugnante da carcaça, sendo mais estética do que higiênica, não contribuindo para eliminação da contaminação, que poderia se estender às linhas de produção. A detecção de *E. coli* patogênica em miúdos representa uma fonte importante de enfermidades transmitida por alimentos e riscos relativos à saúde pública, tornando-se necessária a reavaliação dos critérios determinados pela Portaria nº 210 de 26/11/1998 para condenação em casos de celulite aviária, a fim de garantir a segurança no consumo de produtos derivados de frangos de corte.

Agradecimentos. Ao CNPq e à Faperj pelo apoio financeiro no desenvolvimento desta pesquisa. Ao Dr. Sílvio Luís da Silveira Rocha, do Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, por fornecer a estirpe-padrão positiva utilizado nesta pesquisa.

REFERÊNCIAS

Allan B. Cellulitis: Its Microbiology. In: Anais Eletrônicos 22nd Annual Poultry Service Industry Workshop, Alberta, Canadá, 1997. Disponível em: <<http://www.agric.goc.ab.ca/>>. Acesso em: 28 mar 2004

- Alves F.M.X., Pereira V.L.A., Nascimento E.R. do, Guimarães A.M.P., Almeida D.O. & Tortelly R. Celulite associada às lesões na Bolsa de Fabricio de frangos de corte ao abate, sob inspeção sanitária. *Rev. Bras. Ci. Vet.*, 14:23-27, 2007.
- Andrade C.L. *Histopatologia e Identificação da Escherichia coli como agente causal da celulite aviária em frangos de corte*. Dissertação (Medicina Veterinária/HVPTPOA), Universidade Federal Fluminense, Niterói. 2005. Disponível em: <http://www.uff.br/higiene_veterinaria/teses/claudia_andrade_completa_mestrado.pdf>.
- Associação Brasileira dos Produtores e Exportadores de Frangos-ABEF. Relatório anual 2008-2009. Disponível em: <http://www.abef.com.br/portal/_clientes/abef/cat/Abef%20RA_4021.pdf> Acesso em: 17 jun 2010.
- 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 B.G., Gaziri L.C.J. & Vidotto M.C. Virulence Factors and Clonal Relationships among *Escherichia coli* strains Isolated from Broiler Chickens with Cellulitis. *Infect. Imm.*, 71:4175-4177, 2003, 1997.
- Chuba P.J., Palchadhuri S. & Leon M.A. Contributions of traT and *iss* genes to the serum resistance phenotype of plasmid ColV2-K94. *FEMS Microbiol. Letters*, 37:135-140, 1986.
- Cogan T.A., Bloomfield S.F. & Humphrey T.J. The effectiveness of hygiene procedures for prevention of cross-contamination from chicken carcasses in the domestic kitchen. *Letters Appl. Microbiol.*, 29:354-358, 1999.
- De Ree J.M., Schwillens P. & Van Den Bosch J.F. Monoclonal antibodies that recognize the P fimbriae F71, F72, F9, and F11 from uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Imm.*, 50:900-904, 1985.
- 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.
- Ewers C., Janssen T., Kiessling S., Philipp H.C. & Wieler L.H. Molecular epidemiology of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from colisepticemia in poultry. *Vet. Microbiol.*, 104:91-101, 2004.
- Fallavena L.C.B. *Enfermidades da pele e das penas*, p.37-47. In: Barchieri Jr A. & Macari M. (Eds), *Doença das Aves*. FACTA, Campinas, 2000.
- Foley S.L., Horne S.M., Giddings C.W., Robinson M. & Nolan L.K. 2000. *Iss* from a virulent *Escherichia coli*. *Avian Dis.*, 44:185-191, 2000.
- 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.
- Gomis S.M., Goodhope R., Kumor L., Caddy N., Riddell C., Potter A.A. & Allan B.J. Isolation of *Escherichia coli* from cellulitis and other lesions of the same bird in broiler at slaughter. *Can. Vet. J.*, 38:159-162, 1997.
- Gomis S.M., Gomis A.I.U., Horadagoda N.U., Wijewardene T.G., Allan B.J. & Potter A.A. Studies on cellulitis and other disease syndromes caused by *Escherichia coli* in broilers in Sri Lanka. *Trop. Anim. Health Prod.*, 32:341-351, 2000.
- Giroto A.F. & Miele M. Estudos da Embrapa - Situação atual e tendências para a avicultura de corte nos próximos anos. Disponível em: <http://www.aviculturaindustrial.com.br/site/dinamica.asp?id=12024&tipo_tabela=produtos&categoria=frango_de_corte> Acesso em: 20 jul 2006.
- Hammerum A.M. & Heuer O.E. Human health hazards from antimicrobial-resistant *Escherichia coli* of animal origin. *Clin. Infect. Dis.*, 48:916-921, 2009.
- Jeffrey J.S., Chin R.P. & Singer R.S. Assessing cellulitis pathogenicity of *Escherichia coli* isolates in broiler chickens assessed by an in vivo inoculation model. *Avian Dis.*, 43:491-496, 1999.
- Johnson J.R., Murray A.C., Gajewski A., Sullivan M., Snippes P., Kuskowski M.A. & Smith K.E. Isolation and Molecular Characterization of nalidixic acid-resistant extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* from retail chicken products. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 47:2161-2168, 2003.
- Johnson T.J., Giddings C.W., Horne S.M., Gibbs P.S., Wooley R.E., Skyberg J., Olah P., Kercher R., Sherwood J.S., Foley S.L. & Nolan L.K. Location of increased serum survival gene and selected virulence traits on a conjugative R plasmid in an avian *Escherichia coli* isolate. *Avian Dis.*, 46:342-352, 2002.
- Kariyawasam S., Scaccianoce J.A. & Nolan L.K. Common and specific genomic sequences of avian and human extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* as determined by genomic subtractive hybridization. *BMC Microbiol.*, 7:81-88, 2007.
- Kaper J.B., Nataro J.P. & Mobley H.L. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Rev. Microbiol.*, 2:123-140, 2004.
- Kuhnert P., Boerlin P. & Frey J. Target genes for virulence assessment of *Escherichia coli* isolates from water, food and the environment. *FEMS Microbiol. Rev.*, 24:107-117, 2000.
- Kumor L.W., Olkowski A.A., Gomis S.M. & Allan B.J. Cellulitis in broiler chickens: epidemiological trends, meat hygiene, and possible human health implications. *Avian Dis.*, 42:285-291, 1998.
- La Ragione R.M. & Woodward M.J. Virulence factors of *Escherichia coli* serotypes associated with avian colisepticemia. *Res. Vet. Sci.*, 73:27-35, 2002.
- Ngeleka M., Kwaga J.K., White D.G., Whittam T.S., Riddell C., Goodhope R., Potter A.A. & Allan B. *Escherichia coli* cellulitis in broiler chickens: clonal relationship among strains and analysis of virulence-associated factors of isolates from disease birds. *Infect. Imm.*, 64:3118-3126, 1996.
- Nolan L.K., Giddings C.W., Horne S.M., Doetkott C., Gibbs P.S., Woolley R.E. & Foley S.L. Complement resistance, as determined by viable count and flow cytometric methods, and its association with the presence of *iss* and the virulence of avian *Escherichia coli*. *Avian Dis.*, 46:386-392, 2002.
- Norton R.A., Macklin K.S. & McMurtrey B.L. 1999. Evaluation of scratches as an essential element in the development of avian cellulitis in broiler chickens. *Avian Dis.*, 43:320-325, 1999.
- Ojeniyi A.A. Direct transmission of *Escherichia coli* from poultry to humans. *Epidemiol. Infect.*, 103:513-522, 1989.
- Onderka D.K., Hanson J.A., McMillan K.R. & Allan B. *Escherichia coli* Associated Cellulitis in Broilers: Correlation with Systematic Infection and Microscopic Visceral Lesions, and Evaluation for Skin Trimming. *Avian Dis.*, 41:935-940, 1997.
- Pfaff-McDonough S.J., Horne S.M., Giddings C.W., Ebert J.O., Doetkott C., Smith M.H. & Nolan L.K. Complement resistance-related traits among *Escherichia coli* isolates from apparently healthy birds and birds with colibacillosis. *Avian Dis.*, 44:23-33, 2000.
- Quinn P.S., Carter M.E., Marvey B. & Carter G.R. *Clinical Veterinary Microbiology*. Wolfe Publishing, 1998. 648p.
- Ramchandani M., Manges A.R., DeBroy C., Smith S.P., Johnson J.R. & Riley L.W. Possible Animal Origin of human-associated. Multidrug-resistant, uropathogenic *Escherichia coli*. *Clin. Infect. Dis.*, 40:251-257, 2005.
- Rocha A.C.G.P., Silva A.B., Brito B.G., Moraes H.L.S., Pontes A.P., Cé M.C., Nascimento V.P. & Salle C.T.P. Virulence factors of avian pathogenic *Escherichia coli* isolated from broilers from the south of Brazil. *Avian Dis.*, 46:749-753, 2002.
- 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.
- Rodriguez-Siek K.E., Giddings C.W., Doetkott C., Johnson T.J., Fakhr M.K. & Nolan L.K. Comparison of *Escherichia coli* isolates implicated in human urinary tract infection and avian colibacillosis. *Microbiology*, 151:2097-2110, 2005.
- Silva E.N. & Mota M.P. Celulite em Frangos de Corte. Disponível em: <http://www.fatec.com.br/trabtec/celulite_em_frangos_de_corte.html> Acesso em: 27 nov. 2003.
- Toledo M.R.F., Fontes C.F. & Trabulsi L.R. MILI - Um meio para a realização dos testes de motilidade, indol e lisina descarboxilase. *Rev. Microbiol.*, 13:230-235, 1982a.

Toledo M.R.F., Fontes C.F. & Trabulsi L.R. EPM - Modificação do meio de Rugai e Araújo para a realização simultânea dos testes de produção de gás a partir da glicose, H₂S, urease e triptofano desaminase. *Rev. Microbiol.*, 13:309-315, 1982b.

Vincent C., Boerlin P., Daignault D., Dozois C.M., Dutil L., Galanakis C., Reid-Smith R.J., Tellier P., Tellis P.A., Ziebell K. & Manges A.R.

Food reservoir for *Escherichia coli* causing urinary tract infections. *Emer. Infect. Dis.*, 16:88-95, 2010.

Vieira T.B., Franco R.M., Magalhães H., Praxedes C.I.S. & Tortelly R. Celulite em frangos de corte abatidos sob inspeção sanitária: aspectos anatomopatológicos associados ao isolamento de *Escherichia coli*. *Rev. Bras. Ci. Vet.*, 13: 174-177, 2006.