



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

CAROLINE CELLA GERON

**CLASSIFICAÇÃO DOS GRAUS DE LESÕES DE  
AEROSSACULITE EM PERUS ASSOCIADAS COM  
ENTEROBACTÉRIAS**

CAROLINE CELLA GERON

**CLASSIFICAÇÃO DOS GRAUS DE LESÕES DE  
AEROSSACULITE EM PERUS ASSOCIADAS COM  
ENTEROBACTÉRIAS**

Defesa de dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Mestrado Profissional em Clínicas Veterinárias, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Clínicas Veterinárias.

Orientador: Prof. Dr. Gerson Nakazato

Londrina  
2018

CAROLINE CELLA GERON

**CLASSIFICAÇÃO DOS GRAUS DE LESÕES DE  
AEROSSACULITE EM PERUS ASSOCIADAS COM  
ENTEROBACTÉRIAS**

Defesa de dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Mestrado Profissional em Clínicas Veterinárias, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Clínicas Veterinárias.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Prof. Dr. Gerson Nakazato  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Profa. Dra. Kátia Cristina Silva Santos  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Profa. Dra. Renata Katsuko Takayama Kobayashi  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 17 de dezembro de 2018.

Dedico este trabalho a DEUS que me deu forças e iluminou o meu caminho.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus que iluminou minha jornada e me deu forças para os vários quilômetros percorridos para chegar até aqui. À São Francisco de Assis e Santo Antônio.

Aos meus pais Moisés Geron e Teresinha Cella Geron pela compreensão e pelos momentos de oração para que todas as minhas viagens corressesem bem.

As minhas amigas Flávia e Lika que sempre me acolheram em Londrina tenho muito a agradecer e dizer que não seria possível sem vocês. E também aos amigos que mesmo de longe sempre estão torcendo por mim.

Ao corpo docente da Universidade Estadual de Londrina por me aceitarem no programa de mestrado. Ao meu orientador Dr. Gerson Nakazato, pelo tempo disponibilizado, pelo conhecimento e pela paciência em me ajudar mostrando uma área desconhecida para mim da medicina veterinária. Obrigada a professora Dra. Renata e Dra. Kátia por aceitarem participar da banca.

Obrigada a Carol Galdino e a Anna Carolina por me ajudarem no laboratório, sempre se disponibilizando para o pouco tempo que eu tinha, me ajudando mesmo em feriados e fins de semana e me passarem um pouco do conhecimento de vocês.

Não poderia deixar de lembrar os meus colegas de trabalho que me ajudaram na coleta e nas fotos e sempre me incentivaram para continuar na realização deste sonho em especial ao seu Witor e seu Lino.

A todos aqueles que de certa forma contribuíram e participaram nesta minha caminhada. **MUITO OBRIGADA!**

“Você nunca sabe que resultados virão da sua ação. Mas se você não fizer nada, não existirão resultados.”

(Ghandi)

GERON, CAROLINE CELLA. **Classificação dos graus de lesões de aerossaculite em perus associadas com enterobactérias**. 2018, 57 f.. Trabalho de Conclusão de Curso Mestrado Profissional (Clínicas Veterinárias) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

## RESUMO

A avicultura é um segmento de grande importância para a economia brasileira, destacando-se o Brasil como o maior exportador de carne de frango do mundo. Com o crescimento na produção e exportação de carne de perus, aumentam os desafios na sua produção. Eles possuem período de alojamento mais longo do que frangos, acarretando aumento de doenças respiratórias como a aerossaculite. O objetivo deste estudo foi padronizar os graus de lesões dos sacos aéreos em perus com aerossaculite, associados com a presença de isolados de enterobactérias nesses órgãos. Um total de 110 amostras de sacos aéreos de perus machos com aerossaculite foram coletados e analisados em um abatedouro no Paraná com fiscalização federal. Durante o processo de abate, as amostras de aerossaculite foram coletados por meio de swabs, que foram mantidos em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI), sob refrigeração a 4°C, e submetidas a três métodos de armazenamento (imediate, congelado ou pré-incubado após congelamento) para posterior comparação das suas eficiências de isolamento em meio ágar *MacConkey*. As carcaças dos perus foram submetidas à avaliação e padronização dos graus de lesões dos sacos aéreos, sendo classificadas em grau 1 quando apresentavam leve opacidade e presença de trabéculas de infecção, grau 2, com moderada opacidade (esbranquiçados), grau 3, com marcante presença de exsudato localizado e grau 4, os que tinham severa presença de exsudato envolvendo vários sacos aéreos. Das amostras coletadas de carcaças com aerossaculite, foi evidenciado o crescimento bacteriano em 43,64% (48/110) por pelo menos uma das metodologias de armazenamento e semeadura. As principais enterobactérias identificadas nas amostras foram: *Escherichia coli* (54%), *Citrobacter* sp. (10%), *Proteus* sp. (8%), *Edwardsiella* sp. (8%), *Morganella* sp. (8%), *Kluyvera* sp. (4%), *Salmonella* sp. (4%) e *Klebsiella* sp. (2%). Não houve relação entre a presença de agentes bacterianos com os graus das lesões, já que todos os tipos padronizados apresentaram um percentual de positividade, porém, foi observado que os graus padronizados como grau 3 e 4 apresentaram maior variedade de gêneros bacterianos, o que demonstra que, apesar de todos apresentarem alguma contaminação, quanto maior o grau, mais variações de gêneros são isolados. Dos três métodos de armazenamento, o imediate apresentou maior percentagem de positividade 41,82% (46/110), no entanto, o pré-incubado após congelamento se apresentou mais eficaz em relação à quantidade de colônias 40% (44/110). Os dados deste estudo revelaram a prevalência de oito enterobactérias em lesões nos sacos aéreos em perus machos.

**Palavras-chave:** Avicultura. Doenças respiratórias. Infecção. Metodologias. *Escherichia coli*.

GERON, CAROLINE CELLA. **Classification of the levels of the airsacculitis injuries in turkeys associated with enterobacteriaceae.** 2018, 57 p.. Final Paper in Professional Master Degree (Veterinary Clinics) – State University of Londrina, Londrina, 2018.

## ABSTRACT

Aviculture is a important sector for Brazilian economy, featuring Brazil as the biggest chicken meat exporter worldwide. With the improvement in the production and exportation of turkey meat, more challenges are observable in its farming. Turkey has longer farming period than chicken, resulting in increased number of respiratory diseases as airsacculitis. The purpose of this study was standardizing the injuries levels of the air sacs in turkeys with airsacculitis, associated with the presence of enterobacteriaceae isolated from these organs. A total of 110 samples of air sacs from male turkeys with airsacculitis were collected and analyzed in a slaughter in Paraná, with federal inspection. During the slaughtering process, the samples collection was realized using swabs, while were kept in *broth Brain Heart Infusion* (BHI) under refrigeration of 4°C and submitted to three storage methods (immediate, frozen, or pre incubated after freezing) for further comparison of their isolated efficiency in *MacConkey* agar. The turkey carcasses were submitted to evaluation and standardizing the level of the air sacs injuries. They were classified in level one – when showing light opacity and presence of trabeculae of infection; level two – with moderate opacity (whitish); level three – with high presence of located exudate ; and level four – the ones with severe presence of exudate involving several air sacs. From the collected samples of the carcasses with airsacculitis, it was evidenced the bacterial growth in 43.64% (48/110) in at least one of the storage methods and seeding. The frequencies of the enterobacteriaceae isolated identified in the samples were: *Escherichia coli* (54%), *Citrobacter* sp. (10%), *Proteus* sp. (8%), *Edwardsiella* sp. (8%), *Morganella* sp. (8%), *Kluyvera* sp. (4%), *Salmonella* sp. (4%) and *Klebsiella* sp. (2%). There was not correlation between the presence of bacterial agents with the injuries levels, since all kinds of the standardized ones showed percentage of positivity. Otherwise, it was observed that the levels already standardized as level three and four showed higher variety of genus, which demonstrates that despite everyone showing some contamination, as higher the level, more variations of genus are isolated. Among the three storage methods, the immediate showed higher percentage of positivity, however the pre incubated after freezing showed more efficiency in relation to the quantity of colonies. The data of this study revealed the prevalence of eight enterobacteriaceae in air sacs injuries in male turkeys.

**Key words:** Aviculture. Respiratory Diseases. Infection. Methodologies. *Escherichia coli*.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – Padronização dos graus de aerossaculite em perus: (a) grau 1, trabéculas de infecção (seta), (b) grau 2, opacidade dos sacos aéreos, (c) grau 3, exsudato (seta) e (d) grau 4, exsudatos (seta) .....25
- Figura 2** – Coleta de swabs de carcaças de perus com aerossaculite.....26
- Figura 3** – Armazenamento dos swabs em tubos com BHI (a), colônias lactose positivas (vermelhas/rosas) e negativas (transparentes) (b)..... .27
- Figura 4** – Prova bioquímica com meio EPM e Citrato, utilizada para identificação de bactérias Gram negativas fermentadoras. Da esquerda para direita: (a) primeiro frasco produção de H<sub>2</sub>S e gás; segundo frasco fermentação da glicose e produção de gás; (b) primeiro frasco produção de H<sub>2</sub>S e segundo frasco urease positiva; (c) Citrato negativo e Citrato positivo .....29
- Figura 5** – Prova bioquímica com meio Mlli utilizada para identificação de bactérias Gram negativas fermentadoras. Da esquerda para direita: (a) prova da motilidade primeiro frasco negativo e segundo frasco positivo; (b) indol positivo; (c) primeiro frasco LDC negativo, segundo e terceiro positivo.....29

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Escala de padronização dos graus de comprometimento dos sacos aéreos em perus.....	24
<b>Tabela 2</b> – Condenações de carcaças de perus por aerossaculite realizadas pelo Serviço de Inspeção Federal nos meses de setembro de 2017 a janeiro de 2018 .....	31
<b>Tabela 3</b> – Carcaças de perus com aerossaculite relacionadas aos graus de acometimento dos sacos aéreos .....	32
<b>Tabela 4</b> – Enterobactérias isoladas de swabs de sacos aéreos de perus acometidos por aerossaculite coletados em um frigorífico do estado do Paraná com Serviço de Inspeção Federal .....	33

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APEC	Avian Pathogenic <i>E. coli</i>
BHI	Infusão Coração - Cérebro
DAEC	<i>E. coli</i> Difusamente Aderente
DIF	Departamento de Inspeção Federal
EAEC	<i>E. coli</i> Enteroagregativa
EIEC	<i>E. coli</i> Enteroinvasiva
EHEC	<i>E. coli</i> Enterohemorrágica
EPEC	<i>E. coli</i> Enteropatogênica
ETEC	<i>E. coli</i> Enterotoxigênica
EPM	Escola Paulista de Medicina
LB	Luria Bertani
LDC	Lisina descarboxilase
LTD	L-triptofano desaminase
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
MILi	Motilidade, Indol e Lisina
MNEC	<i>E. coli</i> causadora de meningite neonatal
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PIB	Produto Interno Bruto
SIF	Serviço de Inspeção Federal
UPEC	<i>E. coli</i> Uropatogênica

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	14
2.1	OBJETIVO GERAL.....	14
2.2	OBETIVOS ESPECÍFICOS .....	14
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRAFICA</b> .....	15
3.1	AEROSSACULITE NAS AVES .....	15
3.2	ENTEROBACTÉRIAS ENVOLVIDAS COM LESÕES DE AEROSSACULITE EM PERUS .....	17
3.2.1	Principais Gêneros Da Família Enterobacteriaceae .....	18
3.2.1.1	<i>Citrobacter</i> .....	18
3.2.1.2	<i>Escherichia coli</i> .....	19
3.2.1.3	<i>Edwardsiella</i> .....	20
3.2.1.4	<i>Klebsiella</i> .....	20
3.2.1.5	<i>Kluyvera</i> .....	21
3.2.1.6	<i>Morganella morganii</i> .....	21
3.2.1.7	<i>Proteus</i> .....	22
3.2.1.8	<i>Salmonella</i> .....	22
3.3	CONDENAÇÕES DE CARCAÇAS DE PERUS POR AEROSSACULITE .....	23
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	24
4.1	AMOSTRAS .....	24
4.2	PADRONIZAÇÃO DOS GRAUS DE ACOMETIMENTO DOS SACOS AÉREOS .....	24
4.3	OBETENÇÃO DAS AMOSTRAS E MÉTODOS DE ARMAZENAMENTO.....	25
4.4	ANÁLISE BIOQUÍMICA .....	27
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	30
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	31

5.1	CONDENAÇÕES DE CARÇAÇAS DE PERUS POR AEROSSACULITE .....	31
5.2	GRAUS DE AEROSSACULITE EM PERUS .....	31
5.3	AGENTES BACTERIANOS GRAM-NEGATIVOS FERMENTADORES EM AEROSSACULITE .....	32
5.4	MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO PARA ISOLAMENTO DAS ENTEROBACTÉRIAS .....	33
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>34</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>38</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>39</b>
	<b>APÊNDICE .....</b>	<b>47</b>
	APÊNDICE A – Resultados dos métodos utilizados para isolamento de enterobactérias em carcaças de perus com aerossaculite, coletados em um frigorífico do estado do Paraná com SIF.....	47
	<b>ANEXOS .....</b>	<b>49</b>
	ANEXO A – Caldo Cérebro-Coração Bovino (BHI broth).....	49
	ANEXO B – Caldo Luria Bertani (LB broth).....	50
	ANEXO C – Ágar MacConkey .....	51
	ANEXO D – Meio EPM – MILi.....	52
	ANEXO E – Ágar Citrato de Simmons .....	53
	ANEXO F – Fluxograma para identificação de enterobactérias.....	54
	ANEXO G – Características bioquímicas de enterobactérias de interesse na patologia humana .....	55

## 1 INTRODUÇÃO

A avicultura é um segmento de grande importância para a economia brasileira, destacando-se como a principal atividade econômica em algumas regiões. O setor foi responsável em 2014 por 3,5 milhões de empregos diretos e indiretos e representa 1,5% do produto interno bruto (PIB) do país, conforme dados da União Brasileira de Avicultura (UBABEF, 2014). A produção de carne de frangos do Brasil, apesar de todas as dificuldades, continua crescendo e, em 2016, superou a produção chinesa, colocando o país na segunda posição no ranking mundial dos países produtores e o maior exportador mundial, enquanto os USA (Estados Unidos da América) ocupa a segunda posição (TALAMINI; FILHO SANTOS, 2017).

Segundo a Associação Brasileira de Proteína Animal, o estado do Paraná concentra a maior parte dos abates de frangos, 34,32% em 2017. Aproximadamente 180 mil produtores agrícolas dedicam-se à atividade. Dentro deste segmento, a produção de perus tem apresentado crescimento considerável, atingindo, em 2017, produção de 390.480 mil toneladas no Brasil, com o estado do Paraná se destacando como o maior produtor e exportador, responsável por 37,18% das exportações (ABPA, 2018).

Após a repercussão negativa da deflagração da Operação Carne Fraca em 17 de março de 2017, as exportações de carne de aves brasileiras sofreram uma pequena variação anual de -1,8% no volume exportado entre 2016 e 2017. Segundo o SECEX/MDIC (2018), a produção passou de 4.307,6 milhões de toneladas de carnes de frango vendidas em 2016 para 4.232,1 milhões de toneladas em 2017. Porém, acredita-se que apenas os dados estatísticos do acumulado do ano de 2018 poderão oferecer maiores esclarecimentos sobre a real situação das exportações em valor e volume. A estimativa é uma redução de 35% nas exportações devido ao embargo atual da União Europeia a 20 frigoríficos brasileiros (CORREIA, 2018).

Apesar deste contexto, o sucesso na produção de aves do país deve-se a sua alta capacidade de produção de grãos e baixo custo da mão-de-obra. Por outro lado, doenças bacterianas são causadoras de prejuízos econômicos por queda de produtividade e condenações nos abatedouros (FALLAVENA *et al.*, 2000).

Na produção de perus, as doenças respiratórias representam um

grave problema, causando continuamente perdas econômicas decorrentes de aumento nas taxas de mortalidade, do custo de medicamentos, das taxas de condenação das carcaças, queda da produção de ovos e eclosão (HAFEZ, 2009). Vários agentes virais e bacterianos podem estar envolvidos nas infecções do trato respiratório, sozinhos ou associados. Além disso, os perus também sofrem influência de fatores não infecciosos, como condições climáticas ou manejo impróprio (CANAL, 2003; HAFEZ, 2009).

Não há uma definição que padronize a extensão das lesões causadas pela aerossaculite em perus, somente observa-se o comprometimento dos sacos aéreos. Além disso, existe apenas um relato de El-Sakhon et al, 2002 em frangos que associa diretamente as lesões dos sacos aéreos às enterobactérias, sendo que estes patógenos causam prejuízos econômicos consideráveis devido à condenação de parte destas carcaças, além de apresentar importância na saúde pública.

Atualmente, as carcaças com aerossaculite são condenadas conforme a portaria nº 210 do MAPA (1998): condenadas parcialmente, quando as lesões são restritas, ou totalmente, quando há comprometimento da carcaça, sendo que as vísceras são condenadas em qualquer caso. Porém, não há uma definição exata de quando esta é considerada restrita ou extensa.

Não existem pesquisas que revelem as perdas causadas por problemas respiratórios exclusivamente em perus, porém, segundo registros oficiais, 4% das aves abatidas no Brasil são condenadas por aerossaculite e 1,3% por lesões causadas por colibacilose (BRASIL, 2013). Segundo estudos de Pianho *et al.* (2015) a perda na cadeia do frango por aerossaculite corresponde a 2,14% das condenações. Desta forma, o objetivo deste estudo foi padronizar os graus das lesões dos sacos aéreos em perus com aerossaculite associados com a presença de isolados de enterobactérias nesses órgãos.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Padronizar os graus das lesões dos sacos aéreos em perus com aerossaculite associado com a presença de isolados de enterobactérias nesses órgãos.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Classificar as lesões de aerossaculite conforme o comprometimento dos sacos aéreos dos perus;
- Pesquisar a ocorrência de enterobactérias em perus machos com aerossaculite;
- Avaliar qual método de armazenamento é mais eficaz para o isolamento de enterobactérias presentes em lesões de sacos aéreos de perus e comparar o resultado da análise microbiológica com o grau de comprometimento destes órgãos.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 AEROSSACULITE NAS AVES

As aves possuem sacos aéreos, dilatações cegas formadas de finas membranas translúcidas que preenchem todos os espaços das cavidades torácicas e abdominais, as quais são responsáveis por suprir os pulmões com ar inspirado durante o processo de expansão das cavidades tóraco-abdominais da ave. Em doenças respiratórias das aves, os sacos aéreos são mais frequentemente afetados que os pulmões devido as suas posições ventrais e à ausência de numerosos macrófagos pulmonares e vascularização (BERCHEIRI; MACARI, 2009; DYCE *et al.*, 2004).

Os pulmões das aves são proporcionalmente pequenos e compactos, incapazes de grande expansão; entretanto, são ligados a nove sacos aéreos, os quais tem função de reservatório, já que não são revestidos por epitélio respiratório. Estes são: um saco interclavicular único, um par de sacos cervicais, um par de sacos torácicos craniais, um par de sacos torácicos caudais e um par de sacos abdominais (ORR, 1986). Segundo Dyce *et al.* (2004), as galinhas apresentam uma diferenciação, pois possuem apenas oito pares de sacos aéreos, os cervicais se fundem e se tornam único.

A reação inflamatória dos sacos aéreos, também denominada aerossaculite, provoca espessamento da membrana dos sacos aéreos, infiltrados por células inflamatórias e exsudatos caseosos. As aves infectadas com esta doença apresentam sinais de dificuldade respiratória, tosse, redução do crescimento e queda na produção. Os quadros de aerossaculite são importantes e frequentes em aves comerciais, levando a grandes prejuízos devido à mortalidade, ao gasto com medicamentos, à redução de peso e, principalmente, à condenação de carcaças em abatedouros (ABUJAMRA, 2010; CORRÊA, 2010). A aerossaculite pode evoluir para bacteremia com infecção generalizada e pode ocasionar mortalidade acima de 20% (BERCHIERI JUNIOR, 2009).

Desde 1994, Dipemar já afirmava que, anualmente, cerca de 30 mil toneladas de carne de frango são perdidas na fase final de produção, não chegando à mesa do consumidor devido a problemas respiratórios, acarretando prejuízos de até 30 milhões de dólares. Este cenário ainda é realidade atualmente.

Inúmeras enfermidades ou lesões desencadeiam significativos prejuízos à indústria avícola por acarretarem condenações de carcaças ou vísceras nas linhas de inspeção durante o abate (CORRÊA, 2010). O Serviço de Inspeção Federal (SIF) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) é responsável pelo destino final das aves, as quais são julgadas de acordo com a Portaria nº 210 do MAPA, de 1998 e segundo o, Art. 175 do RIISPOA de março de 2017. Orienta-se que as carcaças com aerossaculite sejam condenadas parcialmente quando apresentarem lesões restritas após a remoção completa dos tecidos envolvidos; quando apresentarem lesões extensas, múltiplas ou houver evidência de caráter sistêmico, deverão ser condenadas totalmente. As vísceras sempre serão condenadas totalmente (BRASIL, 1998; BRASIL, 2017).

Os quadros de aerossaculite podem ser ocasionados pela qualidade do ar ambiente que as aves inalam. Gases tóxicos no ambiente, como o gás amônia e o excesso de dióxido de carbono, associados à presença de agentes virais e bacterianos, causam irritação no epitélio traqueal, aumentando a produção de muco e perda dos cílios, promovendo um processo inflamatório local. Assim, este ambiente formado favorece a colonização e multiplicação bacteriana (BERCHIERI JUNIOR, 2009; SAVIOLLI, 2010).

Os principais microrganismos envolvidos nas infecções respiratórias das aves são: *Mycoplasma galisepticum*, *Mycoplasma synoviae*, *Ornithobacterium rinoatracheale*, *Bordetella avium*, *Escherichia coli*, pneumovirus aviário, vírus da bronquite infecciosa, vírus da influenza aviária, vírus da laringotraqueíte infecciosa, vírus da doença de Newcastle e também pode estar concomitantemente associado com o fungo *Aspergillus fumigatus* (PANG, 2002; SPANAMBERG *et al.*, 2013). Segundo Minharro *et al.* (2001), entre os microrganismos pesquisados nas lesões de sacos aéreos, a *Escherichia coli* foi considerada um dos principais agentes bacterianos encontrados, sendo isolada em 80,64% de lesões de aves com aerossaculite.

Várias enterobactérias podem estar envolvidas na aerossaculite, o tratamento das mesmas é realizado utilizando antibióticos aliado com as corretas práticas de manejo. Dentre estas práticas de manejo, podemos citar: boa higienização, adequada desinfecção do ambiente, associação de diferentes medidas de prevenção como boa ventilação e controle populacional, redução de estresse

ambiental e de manipulação, ótima nutrição e a utilização de probióticos (LOPES, 2016).

### 3.2 ENTEROBACTÉRIAS ENVOLVIDAS COM LESÕES DE AEROSSACULITE EM PERUS

A família Enterobacteriaceae faz parte da maior família de bactérias Gram-negativas de importância clínica e representam 80% ou mais de todos os Gram-negativos isolados na rotina microbiológica (LEVY; VAZ, 2013). A maioria das espécies se desenvolve bem à temperatura de 37°C; entretanto, algumas têm temperatura ótima entre 25 e 30°C sendo mais ativas metabolicamente a estas temperaturas (ICMSF, 2000).

Essas bactérias são fermentadoras de glicose e outros açúcares, oxidase negativa e catalase positiva, anaeróbios facultativos, não formadoras de esporos e a maioria móveis (exceto *Klebsiella*, *Shigella* e *Yersinia*). Elas crescem bem em meios básicos (caldo peptona) e ricos em nutrientes, como ágar sangue, ágar chocolate e ágar MacConkey, e não são inibidas pelos sais biliares presentes no último meio (LEVY; VAZ, 2013; MURRAY *et al.* 2000; PESSOA 2011; QUINN, 2011).

A família contém mais de 42 gêneros e mais de 142 espécies bacterianas, sendo encontradas no solo, nas águas, nos vegetais e em animais, desde insetos ao homem. Muitas espécies bacterianas dessa família pertencem à microbiota intestinal animal ou em outros casos, atuam como agentes infecciosos (QUINN *et al.*, 1994).

As enterobactérias podem ser agrupadas em três categorias: agentes patogênicos, patógenos oportunistas ou não patogênicos. Algumas espécies bacterianas são capazes de causar uma vasta quantidade de enfermidades, incluindo diarreia, infecção das vias urinárias e respiratórias, septicemia e meningite. Os principais agentes patogênicos são *Salmonella enterica*, *E. coli*, *Klebsiella* sp., *Proteus* sp., *Enterobacter* sp. e *Serratia marcescens* (KEUSCH; ACHESON, 2009; MURRAY *et al.* 2000; PESSOA 2011; QUINN, 2011).

Existem alguns relatos, que isolaram enterobactérias, em órgão de aves e em seu ambiente os quais podem estar correlacionados com doenças respiratórias como a aerossaculite. As infecções causadas por *E. coli* são

consideradas secundárias a outros agentes e a manifestação da doença é extraintestinal (FERREIRA *et al.*, 2009). O trato respiratório superior é a principal porta de entrada da infecção, que coloniza e se multiplica na traqueia, com posterior disseminação para os sacos aéreos e tecidos adjacentes. As principais lesões encontradas são: aerossaculite, pericardite, perihepatite, pleuropneumonia e peritonite (CHEVILLE *et al.*, 1978).

Já *Edwardsiella ictaluri*, foi encontrada por Segabinazi *et al.* (2005) em insetos presentes na cama de aviários, sendo que o maior número estava na superfície interna do inseto, sugerindo que ela pode ser um habitante natural do trato intestinal. *E. ictaluri* pode ser um patógeno oportunista dos animais, mas não há informações até o momento sobre sua patogenicidade para as aves apenas que estão presente no ambiente (QUINN *et al.*, 1994; SEGABINAZI *et al.*, 2005). Também já foram identificadas cepas com espécies de *Kluyvera* juntamente com outras bactérias da família Enterobacteriaceae em um levantamento de cultura fecal de 47 aves de rapina em cativeiro (BANGERT *et al.*, 1988).

As salmonelas estão amplamente difundidas na natureza e são capazes de infectar o homem e outros animais. As aves acometidas por salmonelas paratíficas podem desenvolver a doença clinicamente ou de forma assintomática, albergando esses agentes e tornando-se fonte em potencial para os seres humanos, sendo uma das maiores preocupações da saúde pública, pois mesmo em países bem desenvolvidos, gera-se um custo significativo para a sociedade (BARROW, 1993; SHINOHARA, 2008).

A identificação das enterobactérias pode ser facilitada pela utilização de meios que reúnem em um só tubo várias reações bioquímicas; assim, é possível realizar a identificação presuntiva dos principais gêneros de interesse clínico. No Brasil, os meios presuntivos de identificação mais utilizados são: Meio de Rugai, modificado por Pessoa e Silva (Meio de LIA), EPM, MILi e TSI (LEVY; VAZ, 2010).

### 3.2.1 Principais Gêneros Da Família Enterobacteriaceae

#### 3.2.1.1 *Citrobacter*

O gênero *Citrobacter* compreende as espécies *C. freundii*, *C. diversus* e *C. amalonaticus*. São bacilos curtos, que ocorrem isoladamente ou aos pares, com

aproximadamente 1,0 µm de diâmetro e 2,0-6,0 µm de comprimento, usualmente não possuem cápsula e são móveis por flagelos peritríqueos. São anaeróbios facultativos, com metabolismo respiratório e fermentativo, fermentam glicose com produção de ácido e gás. A maioria das amostras de *C. freundii* produz sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S) (HOLT *et al.*, 1994; TRABULSI; ALTERTHUM, 2004).

Esse gênero bacteriano é frequentemente isolado de indivíduos doentes como um patógeno oportunista. Pode causar meningite neonatal e mastite bovina, sendo encontrado no solo, água, esgoto e alimentos, porém não é descrito em aves (HOLT *et al.*, 1994; QUINN *et al.*, 1994).

### 3.2.1.2 *Escherichia coli*

*Escherichia coli* faz parte da microbiota entérica de mamíferos e aves; portanto, possui distribuição cosmopolita. É uma bactéria Gram negativa, anaeróbica facultativa e possui metabolismo respiratório e fermentativo. Caracterizam-se por serem microrganismos bacilares, medindo de 1,1-1,5µm, a maioria são móveis, possuindo flagelos peritríquios, não produz H<sub>2</sub>S, urease, L-triptofano desaminase, mas são passíveis de utilizar a lisina e produzir indol (FERREIRA *et al.*, 2009; HOLT *et al.*, 1994). O agente bacteriano é responsável por significativa incidência de processos mórbidos em seres humanos e outros animais (CALNEK *et al.*, 1997; CARDOSO, 2002; SAVIOLLI, 2010).

*E. coli* engloba diversas cepas patogênicas e não patogênicas. Dentre as cepas patogênicas, existem seis grupos identificáveis que provocam doença entérica (diarreio gênicas): EPEC (enteropatogênica), ETEC (enterotoxigênica), EAEC (enteroagregativa), EIEC (enteroinvasiva), EHEC (enterohemorrágica) e DAEC (*E. coli* difusamente aderente); (KEUSCH; ACHESON 2009; KONEMAN *et al.*, 2012). Os patotipos extra-intestinais associados às regiões específicas do organismo hospedeiro que se refere ao sítio de isolamento, são comumente divididos em UPEC (uropatogênicos), MNEC (meningite neonatal) e APEC (avian pathogenic *E. coli*); (FERREIRA *et al.*, 2009).

Acredita-se que a maioria dos sorotipos de *E. coli* seja desprovida de qualquer fator de virulência; entretanto, algumas cepas adquiriram durante o processo evolutivo diferentes conjuntos de genes que lhes conferiram a capacidade de ocasionar doença, fato que determina a grande versatilidade patogênica da

espécie (CHERNAKI-LEFFER *et al.*, 2002).

Alguns fatores de virulência associados *E. coli* patogênica para aves são fundamentais na patogenia da doença, como a expressão de adesinas, a produção de sideróforos e a capacidade de resistir a ação microbicida do soro. Após a invasão, outros fatores que contribuem para a sobrevivência e evolução da doença são a resistência aos componentes do sistema complemento e a capacidade de sequestrar o íon ferro na corrente sanguínea e nos tecidos das aves (REIS, 2011).

### 3.2.1.3 *Edwardsiella*

*Edwardsiella* são bastonetes pequenos, medindo em média 1µm de diâmetro, Gram-negativos, móveis e compostos por três espécies: *E. tarda*, *E. hoshinae* e *E. ictaluri* apresentam temperatura ótima de crescimento de 37°C, exceto a *E. ictaluri*, que tem preferência por temperaturas mais baixas (HOLT *et al.*, 1994; LIMA *et al.*, 2014).

Ocorrem mais frequentemente em ambientes aquáticos relacionados à contaminação e infecção de animais de sangue frio, como peixes e répteis. Embora sejam raras, é um patógeno que pode acometer os seres humanos, causando gastroenterites e infecção extraintestinal (DOYLE, 2001; WANG *et al.*, 2005). Casos como enterocolite, abscesso hepático, peritonite, osteomielite, endocardite, meningite e sepse em neonatos já foram descritos (LIMA *et al.*, 2014).

*E. tarda*, desde 2001, vem chamando atenção para enfermidades transmitidas através da ingestão de alimentos, sendo considerada como uma bactéria emergente (DOYLE, 2001).

### 3.2.1.4 *Klebsiella*

*Klebsiella* é uma enterobactéria encontrada em locais como água, solo, plantas e esgoto. Em pessoas imunocomprometidas esta bactéria encontra ambiente propício para o seu crescimento, levando a quadros de infecções respiratórias, oculares, doenças reprodutivas (DAVIES *et al.*, 2016; MARTINEZ *et al.*, 2004; PODSCHUM; ULLMANN, 1998).

É um bastonete Gram-negativo, anaeróbio facultativo, mas com melhor crescimento em condições aeróbias, não esporulado e cujo tamanho varia de 0,3 a 1

µm de diâmetro. São imóveis e produzem colônias grandes e gomosas quando cultivadas em placas com nutrientes. No ágar MacConkey, produz colônias róseas, com aspecto elevado e de consistência mucoide (MARTÍNEZ *et al.*, 2004).

#### 3.2.1.5 *Kluyvera*

*Kluyvera* é um gênero relativamente novo na família Enterobacteriaceae. É descrito com pouca frequência em associação com infecções clinicamente significativas; porém, já foi isolada em seres humanos no trato respiratório (FARMER *et al.*, 1981; FARMER *et al.*, 1985; JUAN *et al.*, 2001).

Somente a partir de 1981, Farmer *et al.* redefiniram *Kluyvera* como um gênero separado, usando bioquímica e técnicas de hibridização DNA-DNA. Apresenta-se em forma de haste, com 0,5–0,7 µm de diâmetro e 2–3 µm de comprimento, flagelado e móvel. O organismo distingue-se de outros gêneros relacionados pela sua capacidade de usar citrato e malonato, descarboxilato de lisina e ornitina e produzir grandes quantidades de ácido alfacetoglutárico durante a fermentação de glicose. *Kluyvera* cresce bem em meios de cultura e suas colônias se assemelham às de *Escherichia* (FARMER *et al.*, 1981).

#### 3.2.1.6 *Morganella morganii*

Dentro da família Enterobacteriaceae, o gênero *Morganella morganii* pertence ao tribo Proteeae, que também inclui os gêneros *Proteus* e *Providencia* (KIM *et al.*, 2007). Bactérias dessa tribo produzem urease e fenilalanina desaminase, são anaeróbicos facultativos, e fermentam glicose e manose, com produção de ácido (HOLT *et al.*, 1994).

*M. morganii* é encontrada em fezes de humanos, cães, outros mamíferos e répteis. São microrganismos oportunistas, isolados no trato respiratório, feridas e infecções do trato urinário e tem sido causa de diarreia. Os relatos de infecções causados por *M. morganii* podem ser devastadoras em recém-nascidos e hospedeiros imunocomprometidos, mas não há relatos em aves (HOLT *et al.*, 1994; KIM *et al.*, 2007; KONEMAN *et al.*, 2008).

### 3.2.1.7 *Proteus*

O gênero *Proteus* inclui as espécies *P. mirabilis*, *P. myxofaciens*, *P. penneri* e *P. vulgaris*. São bastonetes curtos, com 0,4-0,8 µm de diâmetro e 1,0-3,0 µm de comprimento. São móveis por flagelos peritríqueos, anaeróbios facultativos, produzem H<sub>2</sub>S, lisina descarboxilase negativas e hidrolisam a ureia, exceto o *P. penneri* que pode ou não hidrolisar. Entre as espécies, ocorre variação nos testes de indol e citrato (HOLT *et al.*, 1994).

São frequentemente isoladas de amostras ambientais e também podem estar presentes no trato intestinal de animais e humanos, no solo, em águas poluídas com dejetos e resíduos. São considerados microrganismos oportunistas causando doenças quando o hospedeiro está em condição de imunossupressão ou quando há alterações em seu microambiente habitual. Apesar do *Proteus* causar infecções no trato urinário, estas bactérias podem ser isoladas de muitas partes infectadas do corpo (BROOKS *et al.*, 1998). São muito importantes na deterioração dos alimentos (FRANCO; LANDGRAF, 1996).

### 3.2.1.8 *Salmonella*

São bactérias Gram-negativas, anaeróbicas facultativas, que se apresentam em bastonetes medindo de 0,7 – 1,5 de diâmetro e 2,0 - 5µm de comprimento, não fermentam lactose, sendo movidas por flagelos peritríquios, exceto a *S. enterica* sorovariedades Pullorum e Gallinarum, que são imóveis. Produzem gás a partir de glicose (exceto *S. enterica* sorovariedade Typhi) e são capazes de utilizar o citrato como única fonte de carbono. A taxonomia é baseada na composição de seus antígenos de superfície, que são os antígenos somáticos (O), os flagelares (H) e os capsulares (K); (FRANCO; LANDGRAF, 1996; PAULA, 2002; LEVINSON, 2005). Entre os animais, as aves (galinhas, perus, patos e gansos) são os reservatórios mais importantes, mas suínos, bovinos, equinos e outros mamíferos domésticos e silvestres, bem como répteis, também apresentam salmonela (CARDOSO; CARVALHO, 2006).

Normalmente, as salmoneloses são infecções autolimitantes, ou seja, que duram certo período de tempo, que pode variar entre um a quatro dias dependendo do organismo; porém, os quadros de desidratação causados pela

diarreia requerem atenção. A salmonelose é uma infecção que precisa ser notificada as autoridades para que possa haver uma investigação e determinação da fonte da doença (LEVINSON, 2005). Os principais veículos de transmissão são alimentos de origem animal, principalmente aves e ovos, mas também podem ser encontrados em carne de bovinos, peixes, frutos do mar, laticínios como leite e queijos (SHINOHARA *et al.*, 2008).

### 3.3 CONDENAÇÕES DE CARÇAÇAS DE PERUS POR AEROSSACULITE

Há uma escassez de registros na literatura sobre condenações em abatedouros de perus. O primeiro levantamento foi realizado no oeste catarinense, no período entre agosto de 1999 e julho de 2001, descreve que 3,03% (356.614) das carcaças foram condenadas por aerossaculite, apesar de parecer um índice baixo, a segunda maior condenação parcial foi de 0,12% (14.516) por contaminação (MACAHYBA *et al.*, 2005).

Entre 2005 e 2006, um frigorífico de perus do Rio Grande do Sul obteve resultados menos expressivos, com uma condenação por aerossaculite de 1,1% (87.929 carcaças), sendo a sexta causa de condenações parciais (SCHLETEIN, 2007). Já Abujamra (2010) realizou um levantamento no ano de 2009, de condenações por aerossaculite em perus (totais e parciais), no centro oeste do Brasil com variação de 1,6 a 5,4% e no estado de Minas Gerais, obteve entre os agosto de 2008 a julho de 2009, uma condenação parcial por aerossaculite de 41,24% (722.119) em relação às carcaças abatidas (MOURA *et al.*, 2012).

No estado do Paraná não, existem estudos em perus; porém, Pianho (2015) também destaca a aerossaculite como a patologia mais encontrada em abatedouros de aves na região noroeste do Paraná, com 2,14% das carcaças condenadas por aerossaculite. Assim, três regiões distintas apresentaram-se como a patologia causadora de maiores perdas em abatedouros de perus.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 AMOSTRAS

Para a realização deste trabalho, foram selecionadas aleatoriamente em um frigorífico com Fiscalização Federal no estado do Paraná, 110 carcaças de perus machos, com idade média de 140 dias e peso médio de 22 kg apresentando lesões nos sacos aéreos e 16 amostras de sacos aéreos saudáveis como amostras controle, sendo que estas foram coletadas em todas as idas ao frigorífico. Os períodos de coleta ocorreram entre os meses de setembro de 2017 a janeiro de 2018.

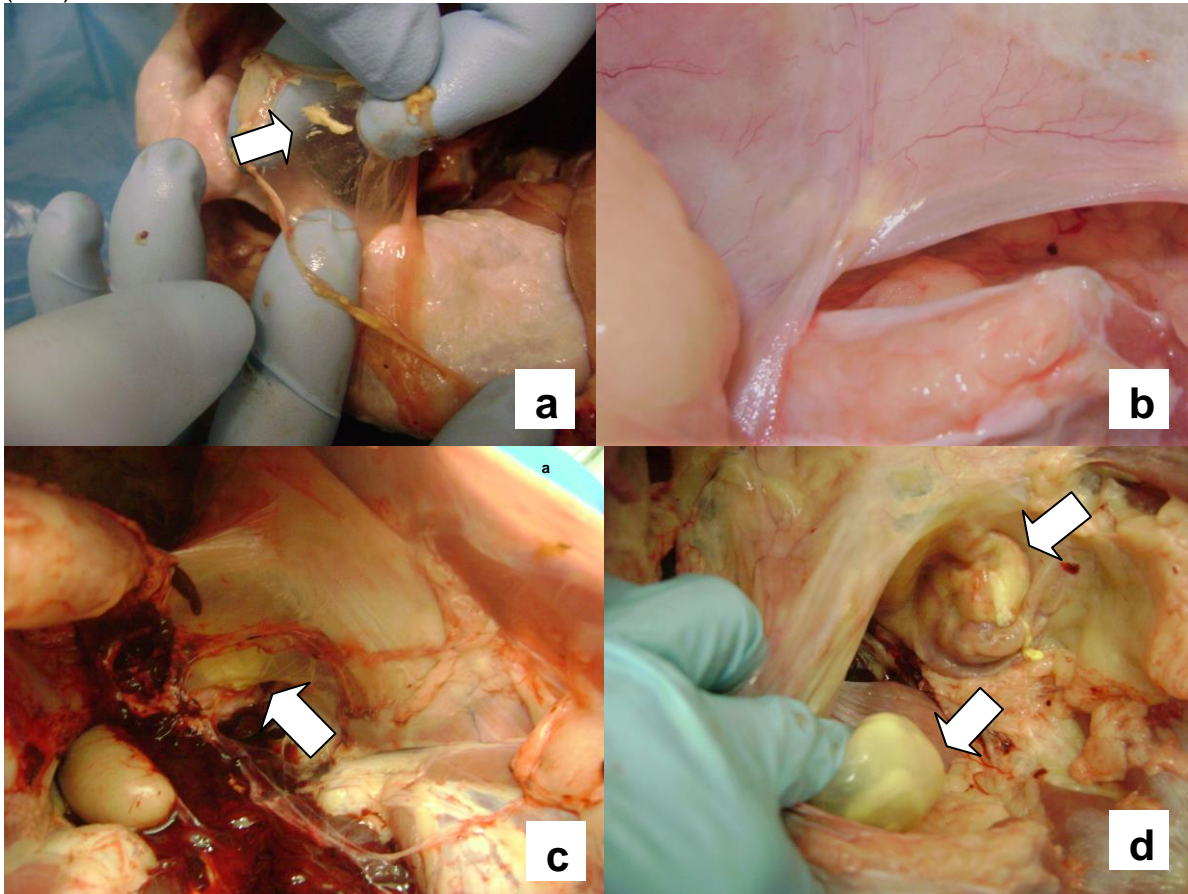
### 4.2 CLASSIFICAÇÕES DAS LESÕES DE ACOMETIMENTO DOS SACOS AÉREOS

Na primeira etapa, foi realizada uma classificação das lesões presentes nos sacos aéreos em carcaças de perus que seriam destinadas ao aproveitamento condicional por apresentarem aerossaculite. As lesões foram definidas conforme a extensão de comprometimento dos sacos aéreos. A escala de padronização realizada para aerossaculite em perus encontra-se a seguir (Tabela 1 e Figura 1).

**Tabela 1-** Escala de padronização dos graus de comprometimento dos sacos aéreos em perus.

<b>Escala</b>	<b>Características</b>
Grau 0	Sacos aéreos sem lesão (translúcidos).
Grau 1	leve presença de trabéculas de infecção nos sacos aéreos.
Grau 2	moderada opacidade dos sacos aéreos (esbranquiçados).
Grau 3	presença de exsudado localizado.
Grau 4	severa presença de exsudado envolvendo vários sacos aéreos.

**Figura 1.** Padronização dos graus de aerossaculite em perus: (a) grau 1 – trabéculas de infecção (seta), (b) grau 2 – opacidade dos sacos aéreos, (c) grau 3 – exsudato (seta) e (d) grau 4 – exsudatos (seta).



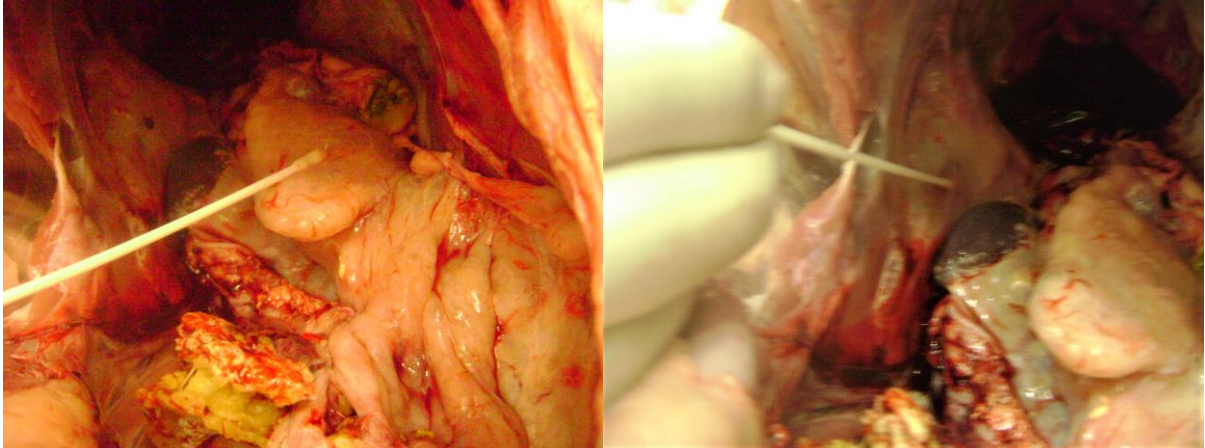
#### 4.3 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS E MÉTODOS DE ARMAZENAMENTO

Para obtenção das amostras, foi coletado, com o auxílio de swabs, material dos sacos aéreos comprometidos, após a evisceração, os quais foram armazenados individualmente em tubos de ensaios esterilizados contendo 2 ml de Infusão Coração-Cérebro (BHI –Oxoid, USA, Anexo A), e transportados até o laboratório em recipiente isotérmico com gelo seco, para posterior análise bacteriológica das lesões. Em todo o processo, cuidou-se para não ocorrer contaminação dos swabs com outras partes das carcaças; sendo assim eliminadas as carcaças que apresentavam contaminação gastrointestinal.

As amostras foram coletadas aleatoriamente de carcaças que estavam com aerossaculite durante o processo de abate. Para a coleta, foram utilizadas luvas cirúrgicas e swabs com haste de plástico, realizando-se movimentos de fricção sobre os sacos aéreos comprometidos (graus 1 e 2), tanto na parte externa como interna,

e também foi realizada fricção dos exsudatos presentes (graus 3 e 4); (Figura 2). Pela forma de evisceração das carcaças, foi possível apenas visualizar e coletar amostras dos sacos aéreos torácicos posteriores e abdominais.

**Figura 2** – Coleta de swabs de carcaças de perus com aerossaculite.



As análises foram realizadas no Laboratório de Bacteriologia Básica e Aplicadas do Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, da Universidade Estadual de Londrina – Paraná, por meio do isolamento por semeadura e esgotamento em ágar MacConkey (Oxoid, USA, Anexo C). Foi avaliado o crescimento bacteriano por três métodos diferentes de armazenamento das amostras: 1) Isolamento bacteriano imediato (na chegada do material no laboratório); 2) Isolamento bacteriano após o congelamento no material em meio BHI (Oxoid, USA), contendo 25% de glicerol (Merck, USA) e 3) Pré-incubação do material congelado, em caldo LB (Anexo B). Todas as amostras positivas foram submetidas ao teste bioquímico para identificação da bactéria isolada.

A cada coleta individual, os swabs foram armazenados em tubos de vidro com 2 ml de BHI esterilizado (Figura 3a) e transportados imediatamente para o laboratório. Durante o intervalo da coleta para o laboratório o material foi mantido sob refrigeração a 4°C durante 20 a 28 horas. No primeiro método de armazenamento (isolamento imediato), foi realizada a semeadura por esgotamento em ágar MacConkey, com posterior incubação das placas de Petri semeadas em estufa bacteriológica a 37°C por 18 a 24 horas, para crescimento bacteriano.

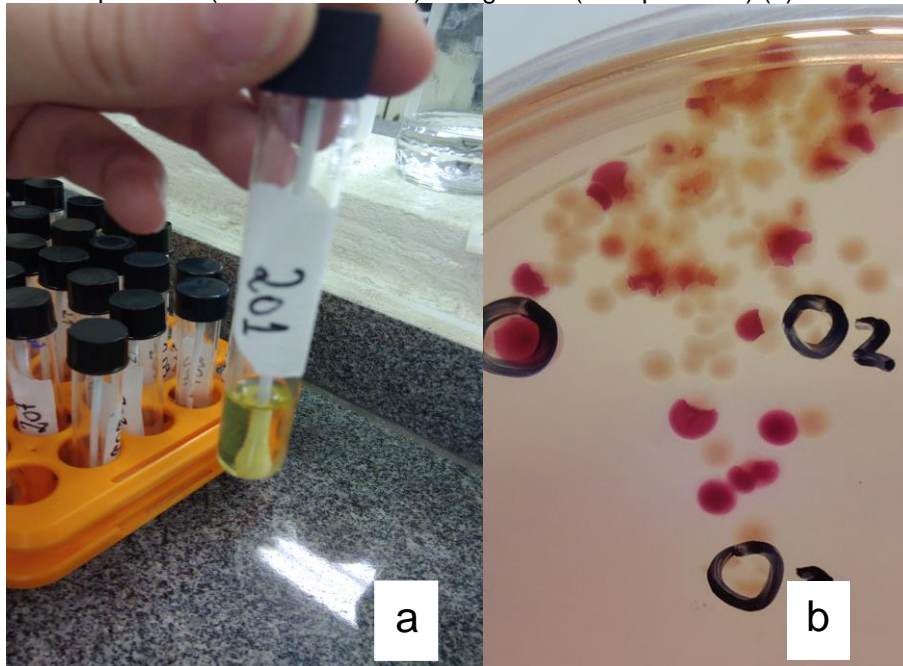
Para o segundo método de armazenamento, foi realizada uma mistura de 500 µl do material coletado (BHI com swabs) com 500 µl de BHI com glicerol 25% em um microtubo esterilizado, com posterior congelamento a -20°C (*freezer*). O

isolamento bacteriano nesse método foi realizado também por semeadura por esgotamento em ágar MacConkey; porém, a partir do material congelado.

O terceiro método foi realizado após o congelamento; porém, com incubação do material congelado, adicionando 500 µl de caldo LB em 500 µl da amostra congelada, sendo incubados posteriormente em estufa a 37°C, por 18 a 24 horas, sem agitação. O isolamento bacteriano em ágar MacConkey mais uma vez foi realizado da mesma forma que nos dois métodos anteriores.

Após o isolamento, as colônias foram identificadas como lactose-positivas ou lac+ (vermelhas/rosas), ou lactose negativas ou lac- (transparentes), devido à fermentação do açúcar lactose com produção de ácidos que altera sua coloração na presença do indicador de pH (Figura 3b).

**Figura 3** – Armazenamento dos swabs em tubos com BHI (a), colônias lactose positivas (vermelhas/rosas) e negativas (transparentes) (b).



#### 4.4 ANÁLISE BIOQUÍMICA

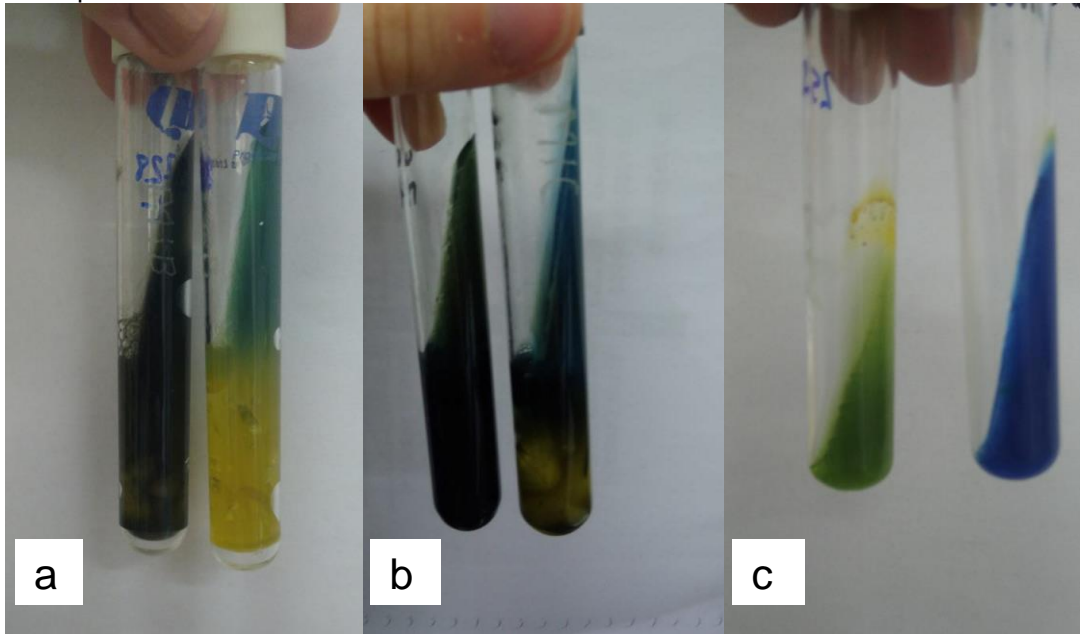
Para identificação das bactérias Gram negativas fermentadoras encontradas após o crescimento em ágar MacConkey, realizou-se uma série bioquímica para identificação da espécie bacteriana da família Enterobacteriaceae. Os meios utilizados foram EPM (Escola Paulista de Medicina, onde o meio foi desenvolvido), MILi (Motilidade, Indol e Lisina) e Citrato de Simmons.

No meio EPM (Anexo D), as bactérias foram inoculadas com uma “picada” profunda (usando fio de platina), até o final do meio no tubo (base do tubo), e posteriormente, estriada na superfície (fase superior do meio do tubo ou ápice). Neste tubo, pode-se observar a fermentação de glicose, com alteração do meio azulado para amarelo; a produção de gás, com formação de bolhas ou deslocamento do meio; a produção de H<sub>2</sub>S, que altera a pigmentação do meio para enegrecido; a hidrólise da ureia, formando um anel azulado na base; e a desaminação do triptofano pela enzima L-triptofano desaminase (LTD), com mudança do meio para verde mais escuro (Figura 4).

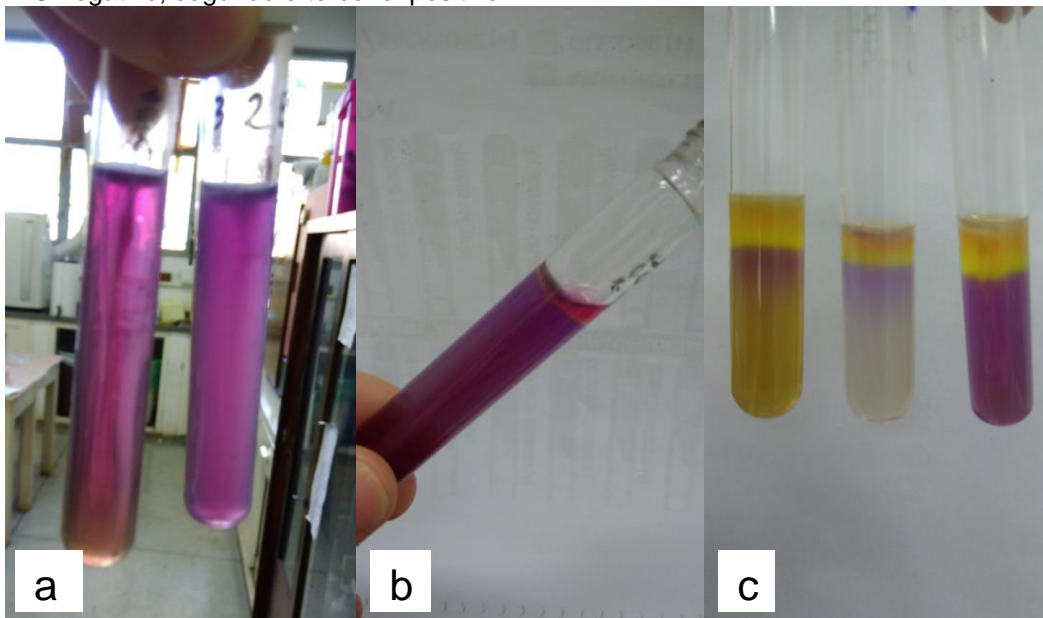
Já no tubo com meio MILi (Anexo D), apenas foi realizada a “picada” central e profunda para verificar a motilidade das bactérias, que, quando móveis, crescem além da picada, turvando o meio, enquanto as imóveis crescem apenas na linha da picada. Também foi determinada a utilização da descarboxilação da lisina pela enzima lisina descarboxilase (LDC), através da alteração da coloração do meio para cinza a roxo quando utilizada, ou amarelo, quando não utilizada a lisina, variação que se deve à mudança do pH. Após a leitura da motilidade e presença de LDC, foram adicionadas três gotas do reativo de Kovacs para análise da produção de indol. A formação de um anel com coloração rosa ou vermelha na parte superior indicou positividade para produção de indol, devido à presença da enzima triptofanase; quando inalterada a coloração, teste negativo (Figura 5).

O meio citrato de Simmons (Anexo E) tem como princípio a determinação da capacidade do microrganismo utilizar o citrato como única fonte de carbono para o seu metabolismo. A inoculação foi realizada apenas estriando a bactéria na superfície no meio (fase superior ou ápice). Todos os meios foram incubados por 24 horas a 37°C. A mudança de coloração do meio de cultura de verde para azul representou o crescimento bacteriano (Figura 4c). As análises dos resultados das leituras dos meios da série bioquímica foram realizadas através do fluxograma e da tabela de características bioquímicas com percentagem de positividade específica para determinação de enterobactérias (PESSOA; SILVA, 1972; Anexo F e G).

**Figura 4** – Prova bioquímica com meio EPM e Citrato, utilizada para identificação de bactérias Gram negativas fermentadoras. Da esquerda para direita: (a) primeiro frasco produção de  $H_2S$  e gás; segundo frasco: fermentação da glicose e produção de gás; (b) primeiro frasco: produção de  $H_2S$  e segundo frasco: urease positiva; (c) citrato negativo e citrato positivo.



**Figura 5** – Prova bioquímica com meio Mili utilizada para identificação de bactérias Gram negativas fermentadoras. Da esquerda para direita: (a) prova da motilidade: primeiro frasco negativo e segundo frasco: positivo; (b) indol positivo; (c) primeiro frasco LDC negativo, segundo e terceiro: positivo.



#### 4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para esse estudo realizou-se análise estatística descritiva, calculando-se as frequências absolutas e relativas, cujo objetivo básico foi sintetizar uma série de valores, permitindo organizar e descrever os dados de três maneiras: por meio de tabelas, de gráficos e medidas descritivas (SAMPAIO, 2007). Foi utilizado o programa R Studio, com nível de significância de 5%.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 CONDENAÇÕES DE CARÇAÇAS DE PERUS POR AEROSSACULITE

Durante os cinco meses de coleta, de setembro de 2017 até janeiro de 2018, foi realizado um levantamento dos documentos de condenação do SIF, os quais ficam registrados as condenações de cada mês correspondente (Tabela 2). Neste, período foram abatidos 1.469.049 perus, dos quais 299.533 (20,39%) apresentaram aerossaculite e as carcaças foram encaminhadas para o departamento de inspeção federal (DIF) para condenação das vísceras e corte das demais partes. O mês de outubro apresentou maior número de condenações.

**Tabela 2** – Condenações de carcaças de perus por aerossaculite realizadas pelo Serviço de Inspeção Federal nos meses de setembro de 2017 a janeiro de 2018.

	<b>Perus abatidos</b>	<b>Condenações parciais</b>	<b>Porcentagem de condenações</b>
Setembro/2017	292.255	48.833	16,70%
Outubro/2017	312.839	76.807	24,55%
Novembro/2017	271.970	59.933	22,04%
Dezembro/2017	288.882	55.643	19,26%
Janeiro/2018	303.103	58.317	19,24%
<b>Total</b>	<b>1.469.049</b>	<b>299.533</b>	<b>20,39%</b>

### 5.2 GRAUS DE AEROSSACULITE EM PERUS

Das 110 carcaças de perus com aerossaculite que foram analisados para detecção bacteriana e realização simultânea da avaliação dos graus das lesões de cada carcaça, verificou-se que 6,36% (7/110) apresentaram lesões padronizadas em grau 1, 32,73% (36/110) com grau 2, 46,36% (51/110) com grau 3 e 14,55% (16/110) com grau 4 (Tabela 3). Os sacos aéreos mais atingidos foram os torácicos 79,09% (87/110), enquanto que as lesões em sacos aéreos abdominais representam 20,91% das carcaças.

Não houve relação entre a presença de agentes bacterianos com os graus das lesões, já que todos os tipos padronizados apresentaram positividade.

Porém, das oito espécies bacterianas isoladas, no grau 1, foi encontrada apenas contaminação por *E. coli*; no grau 2, foram isolados quatro gêneros distintos (*E. coli*, *Citrobacter*, *Morganella* e *Proteus*); no grau 3, isolaram-se seis gêneros (*E. coli*, *Proteus* sp., *Edwardsiella* sp., *Morganella*, *Kluyvera* sp., *Salmonella* sp.); e no grau 4, sete gêneros (*E. coli*, *Citrobacter* sp., *Edwardsiella* sp., *Morganella*, *Kluyvera* sp., *Salmonella* sp. e *Klebsiella* sp.).

**Tabela 3-** Carcaças de perus com aerossaculite relacionadas aos graus de acometimento dos sacos aéreos.

	<b>Carcaças acometidas</b>	<b>% de acometimento</b>
Grau 1	07	6,36
Grau 2	36	32,73
Grau 3	51	46,36
Grau 4	16	14,55
<b>Total</b>	<b>110</b>	<b>100</b>

### 5.3 AGENTES BACTERIANOS GRAM-NEGATIVOS FERMENTADORES EM AEROSSACULITES

Dos materiais coletados de carcaças com aerossaculite, foi evidenciado o crescimento bacteriano em 43,64% (48/110) das amostras em pelo menos uma das metodologias de armazenamento e semeadura. Através das provas bioquímicas, foi possível identificar oito gêneros de enterobactérias e isolar 50 colônias, pois algumas amostras apresentavam mais do que uma colônia concomitantemente. Das 16 amostras controles coletadas, nenhuma apresentou crescimento bacteriano, sendo considerado negativo. Durante o processo de adaptação da metodologia foram perdidas algumas amostras, pelo fato do processo de congelamento não ser adequado, sendo estas descartadas da pesquisa.

As espécies e gêneros encontrados nos sacos aéreos e exsudatos de carcaças com aerossaculite foram *Escherichia coli* (54%), *Citrobacter* sp. (10%), *Proteus* sp. (8%), *Edwardsiella* sp. (8%), *Morganella* (8%), *Kluyvera* sp. (4%), *Salmonella* sp. (4%) e *Klebsiella* sp. (2%); (Tabela 4). Uma amostra continha uma bactéria não fermentadora e quatro amostras não foram identificadas, porque estas só cresceram no meio resfriado. Também foi isolado um fungo filamentoso em uma

das amostras através da microscopia óptica (*Aspergillus fumigatus*).

**Tabela 4** – Enterobactérias isoladas de swabs de sacos aéreos de perus acometidos por aerossaculite, coletados em um frigorífico do estado do Paraná com Serviço de Inspeção Federal.

<b>Enterobactéria</b>	<b>N</b>	<b>%</b>
<i>Escherichia coli</i>	27	54
<i>Citrobacter</i> sp.	05	10
<i>Proteus</i> sp.	04	08
<i>Edwardsiella</i> sp.	04	08
<i>Morganella</i>	04	08
<i>Kluyvera</i> sp.	02	04
<i>Salmonella</i>	02	04
<i>Klebsiella</i> sp.	01	02
Não fermentadora	01	02
<b>Total</b>	<b>50</b>	<b>100</b>

#### 5.4 MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO PARA ISOLAMENTO DAS ENTEROBACTÉRIAS

Com os resultados da análise, foi possível observar que os três métodos utilizados apresentaram crescimento bacteriano em ágar MacConkey; porém, o número de amostras positivas variou em cada metodologia.

As amostras que foram apenas armazenadas imediatamente, após a coleta, em BHI e recipiente isotérmico, demonstraram maior crescimento bacteriano, sendo que 41,82% (46/110) das amostras foram positivas, enquanto que, quando estas amostras foram congeladas com adição de 25% de glicerol, houve uma redução drástica no isolamento, passando para 18,18% (20/110). Já o crescimento após congelamento, mas com adição de meio LB e incubação em estufa bacteriológica, a 37°C, por 18 a 24 horas, ainda teve resultados menores que quando resfriados; porém, menos acentuados 40% (44/110) das amostras apresentaram-se positivas (Apêndice A).

## 6 DISCUSSÃO

Não há nenhum relato que especifique os graus de aerossaculite, sendo esta a primeira descrição na literatura. Apesar dos graus padronizados não apresentarem relação com a presença de agentes bacterianos, observou-se que, os graus categorizados como grau 3 e 4, que são as lesões mais extensas causadas pela aerossaculite, apresentaram maior variedade de gêneros bacterianos. Assim; quanto maior o grau de aerossaculite, maior variabilidade de gêneros bacterianos isolados, indicando que as lesões causadas são um ambiente favorável para o crescimento bacteriano.

Durante o processo de abate, na maioria das vezes, a condenação ocorre apenas parcialmente, descartando as vísceras e realizando o corte das demais partes para aproveitamento condicional. Este estudo sugere que a condenação parcial ou total indicadas pela portaria nº210 do MAPA (1998) necessita ser reestruturada, já que todas as extensões de aerossaculite apresentaram algum tipo de contaminação bacteriana. Assim, sugere-se o aproveitamento condicional por esterilização por calor, depois de removidas e retiradas partes atingidas, o que eliminaria as enterobactérias.

Há apenas quatro levantamentos registrados na literatura em relação ao índice de condenação em abatedouros de perus, são estes Macahyba *et al.*, 2005; Schletein, 2007; Abujamra, 2010 e Moura *et al.*, 2012, sendo que no presente estudo a condenação por aerossaculite foi muito mais elevada em três deles, apenas Moura *et al.*, 2012 no estado de Minas Gerais teve índices mais elevados (41,24%, 722.119 carcaças condenadas). Todos os autores realizaram o estudo em abatedouros de perus com SIF e três deles apresentaram a aerossaculite como a maior causa de condenações. Esta variação tão elevada no estado do Paraná (20,39% de condenações por aerossaculite em perus) pode estar correlacionada ao clima presente na região e ao tipo de construção dos galpões, já que estes podem estar associados a fatores ambientais. Estes valores demonstram perdas consideráveis e uma diminuição da velocidade do abate durante o processo.

O maior número de condenações por aerossaculite ocorreu no mês de outubro provavelmente porque os perus abatidos neste mês foram alojados entre maio e junho, quando a região apresenta uma queda na temperatura, realizando ventilação nos galpões com menor frequência. Vários agentes virais e bacterianos

podem estar envolvidos nas infecções do trato respiratório, sozinhos ou associados, além de sofrerem a influência de fatores não infecciosos, como condições climáticas ou manejo impróprio, o que condiz com o estudo apresentado (CANAL, 2003).

O Brasil possui significativa diversidade climática e, por isso, diferentes tipos de aviários são construídos, para fins de ventilação os aviários brasileiros podem ser classificados em abertos e fechados (ABREU; ABREU, 2000; BAÊTA, 1998). Na integração onde foi realizada a coleta das amostras todos os aviários foram construídos da forma aberta. Os aviários abertos são mais simples e possuem porosidade considerável mesmo quando as cortinas se encontram fechadas. Normalmente são utilizados devido ao seu baixo custo e em regiões onde as condições climáticas se apresentam amenas. Nesse sistema prioriza-se a ventilação natural devido ao termo-sifão e ao vento (BAÊTA, 1998).

Esta forma de apresentação dos galpões pode interferir e colaborar com o aumento de umidade da cama dos aviários no período do inverno e uma escassez de umidade no verão, sendo que os galpões não possuem exautores, e desta forma não se consegue ter um controle eficaz de temperatura e umidade no seu interior, onde o clima externo vai apresentar maior influência, estes fatores podem estar relacionados diretamente ao aumento de problemas respiratórios nos perus.

O trato respiratório superior nas aves é a principal porta de entrada na infecção por *E. coli*, com posterior disseminação para os sacos aéreos e tecidos adjacentes, sendo a aerossaculite uma das principais lesões encontradas (CHEVILLE *et al.*, 1978). Em frangos de corte, os agentes bacterianos mais frequentes em casos de aerossaculite; na Jordania, foram *E. coli* (88,2%), seguido pelo *Ornithobacterium rhinotracheale* (8%), e em menos frequência, *Bordetella avium* (3%) (EL-SUKHON *et al.*, 2002). O levantamento corrobora com os dados encontrados em perus, que mostraram *E.coli* como o agente etiológico mais isolado dos sacos aéreos afetados. Segundo Poss (1998), a presença de poeira e particulados em galpões também pode levar a ocorrência de pneumonia e aerossaculite por infecção de *A. fumigatus*, o que se identifica com os achados neste estudo.

Já foi relatada alta prevalência de genes de virulência de *E. coli* em isolados de órgãos de perus suspeitos de colibacilose com alto índice de resistência a antimicrobianos (HOEPERS, 2016), o que pode estar correlacionado com o

encontrado no presente trabalho nos sacos aéreos acometidos, pois a colibacilose pode se manifestar na forma de aerossaculite e, em graus avançados, as carcaças apresentam septicemia intensa levando ao favorecimento do crescimento de enterobactérias. Perus, ao contrário de frangos de corte, têm vida longa e por isso são mais susceptíveis ao aparecimento de doenças, a colibacilose respiratória e septicemia são uma delas (HOEPERS, 2016).

No estudo de Segabinazi *et al.* (2005) foram avaliados enterobactérias presentes na superfície externa e interna de cascudinhos de aviários de frangos, foram isoladas 14 espécies, sendo *E. coli* (36,96%) a mais isolada, seguida da *K. pneumoniae* (18,11%) e *Proteus mirabilis* (8,34%), enquanto apenas duas espécies bacterianas *E. coli* (88%) e *K. pneumoniae* (12%) foram encontradas nos cascudinhos de aviários de perus. Estes dados indicam que pode existir correlação no manejo das camas dos aviários, que possuem parasitas como o cascudinho, e a presença de doenças respiratórias agravadas por bactérias concomitantes como a aerossaculite, já que duas enterobactérias isoladas dos cascudinhos dos aviários de perus também foram identificadas nos sacos aéreos com aerossaculite e seis isoladas de cascudinhos em frangos também se assemelham aos isolados das amostras dos sacos aéreos. As enterobactérias mais encontradas correspondem aos encontrados neste estudo em lesões dos sacos aéreos acometidos por aerossaculite.

O único estudo encontrado que correlaciona a presença de aerossaculite em perus com agentes bacterianos é o de Abujamra (2010), porém foi avaliada outra classe de bactérias por PCR (reação em cadeia da polimerase), sendo detectada a *B. avium* em 28,8% dos swabs analisados. Dos isolados já descritos na literatura presentes em casos de aerossaculite que se assemelham a este trabalho, apenas há relatado em frangos, sendo que *E. coli* foi identificada com maior relevância, porém, as mesmas enterobactérias isoladas dos sacos aéreos já foram identificadas em proporção semelhantes em fezes de frango, órgãos de perus e em cascudinhos de camas de aviários de frangos e perus (EL-SUKHON *et al.*, 2002, HOEPERS, 2016; OLIVEIRA *et al.*, 2004; SEGABINAZI *et al.*, 2005). Estes dados demonstram que estas bactérias encontradas estão presentes no ambiente, no trato gastrointestinal e em outras afecções podendo ser agentes oportunistas.

No presente trabalho durante o crescimento bacteriano, foi possível observar que, mesmo quando o crescimento foi positivo em todos os métodos

(imediate, congelado e pré-incubado) houve diferença no crescimento bacteriano. Quando apenas resfriados, foi mais eficaz e o congelado foi o menos eficaz; porém, quando congelados, adicionado LB e incubados, as colônias se apresentaram mais evidentes e em maior quantidade, sendo menores nas amostras resfriadas e ainda menores nas apenas cogeladas.

O segundo método também foi utilizado por Hoepers (2016), o qual utilizou o Ágar MacConkey para selecionar as colônias positivas para fermentação de lactato e a prova bioquímica para diferenciação de outras enterobactérias, já que seu interesse era apenas *E. coli*; depois armazenou as amostras em criotubos a -20°C em BHI e 50% de glicerol; porém, ele não descreve que existe uma diminuição no crescimento bacteriano com o congelamento.

Há poucos dados na literatura relacionada às condenações em abatedouros de perus e da presença de agentes bacterianos relacionados à aerossaculite, além de não apresentar descrições de uma padronização das diferentes extensões de comprometimento dos sacos aéreos, demonstrando a necessidade de rever a forma de condenação destas carcaças.

## 7 CONCLUSÃO

As padronizações dos graus de acometimento dos sacos aéreos definidas deste estudo como grau 1, leve presença de trabéculas de infecção, grau 2, moderada opacidade dos sacos aéreos, grau 3, presença de exsudado localizado e grau 4, severa presença de exsudado envolvendo vários sacos aéreos demonstraram que não importa a extensão das lesões, pois todos apresentaram positividade; porém, os graus 3 e 4 relevaram maior variação de gênero de enterobactérias, sendo possível concluir que ambientes ricos em infecção são propícios para o desenvolvimento bacteriano.

Os dados revelaram a prevalência de oito enterobactérias em lesões de sacos aéreos de perus, sendo que as mesmas também foram isoladas em outros ambientes e órgãos mostrando que podem estar correlacionadas com as lesões de aerossaculite.

Dos três métodos de armazenamento e cultivo das amostras, o congelado apresentou-se menos eficiente. Já o método resfriado foi mais eficiente; porém, o pré-incubado apresentou resultados semelhantes, porém um maior crescimento bacteriano, mostrando que pode ser utilizado quando as amostras precisarem ser armazenadas por um período prolongado.

## REFERÊNCIAS

- ABREU, P.G.; ABREU, V.M.N. Ventilação na avicultura de corte. **Embrapa Suínos e Aves**, Concórdia, 2000, 50p.
- ABUJAMRA, T. **Deteção de agentes bacterianos envolvidos nos quadros de aerossaculite em perus através da reação em cadeia pela polimerase (PCR)**. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2010, p.48.
- ABPA **Associação Brasileira de Proteína Animal**. Relatório Anual, São Paulo, 2018. Disponível em: [www.abpa.gov.br](http://www.abpa.gov.br) Acesado em: 28 de novembro de 2018.
- BAÊTA, F. C. Sistemas de ventilação natural e artificial na criação de aves. In: Simpósio Internacional sobre Ambiência e Sistemas de Produção Avícola, 1998, Campinas, SP. **Anais. Concórdia: EMBRAPA**, 1998, p.96-117.
- BANGERT, R.L.; WARD, A.C.S.; STAUBERS, B.R. Cho and P.R. Widders. A survey of the aerobic bacteria in the feces of captive raptors. **Avian Dis**, n.32, 1988, p. 53–62.
- BARROW, P.A. Salmonella - present, past and future. **Avian Pathology**, v.22, 1993, p.651-669.
- BERCHIERI JUNIOR, A.; MACARI, M. **Doenças das aves**. Campinas: FACTA, Fundação APINCO de Ciências e Tecnologia Avícolas. 2009, p.455-469.
- BRASIL. **Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento**. Portaria DAS nº 210, de 10 de novembro de 1998. Regulamento Técnico da Inspeção Tecnológica e Higiênico-Sanitária de Carnes de Aves. Brasília, DF:1998.
- BRASIL 2013, **Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento**, 2013, [http://sigsif.agricultura.gov.br/sigsif\\_cons](http://sigsif.agricultura.gov.br/sigsif_cons).
- BRASIL. **Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento**. Decreto nº 9.013, de 29 de março de 2017. Alterado pelo Decreto nº 9.069, de 31 de maio de 2017. Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA). Brasília, DF: 2017.

- BROOKS, G.F.; BUTEL, J.S.; ORNSTON, L.N.; JAWETZ, E.; MELNICK, J.L.; ADELBERG, E.A. **Microbiologia médica**. 20.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998, p. 524.
- CALNEK, B. W; BARNES, H. J; BEARD, C. W.; McDOUGALD, L. R.; SAIF, Y. M. **Diseases of Poultry**. Editorial Board for the American, cap. 4, 1997, p.131 – 134.
- CANAL, C.; ROCHA, S. L.; LEÃO, A.; FALLAVENA, L. C.; OLIVEIRA, S. D.; BELTRÃO, N. Detecção de *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT) por meio da reação em cadeia polimerase (PCR). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 33, n.2, 2003, p. 1-5.
- CARDOSO, T. G.; CARVALHO, V. M. Toxifecção alimentar por *Salmonella* spp. **Rev. Inst. Ciênc. Saúde**. v. 24, n. 2, 2006, , p. 95–101.
- CARDOSO, A. L. S. P.; TESSARI, E. N. C.; CASTRO, A. G. M.; ZANATTA, G. F. Avaliação da susceptibilidade a antimicrobianos de cepas de *Escherichia coli* de origem aviária. **Arquivo Instituto Biológico**, São Paulo, v. 69, n.2, 2002, p. 1-5.
- CHERNAKI-LEFFER, A.M.; BIESDORF, S.M.; ALMEIDA, L.M.; LEFFER, E.V.B; VIGNE, F. Isolamento de enterobactérias em *Alphitobius diaperinus* e na cama de aviários no oeste do estado do Paraná, **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, vol. 4, núm. 3, septiembre-diciembre, 2002, p. 243-247.
- CHEVILLE, N. F.; ARP, L. H. Comparative pathologic findings of *Escherichia coli* infection in birds. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 173, 1978, p.548-557.
- CORRÊA, F. A. F. Características dos patótipos de *E. coli* e implicação de *E. Coli* patogênica para aves em achados de abatedouros frigoríficos. Universidade Federal de Goiás. Programa de Pós-graduação em Ciências Animal, 2010, p.37.
- CORREIA, S. C. C. A operação carne fraca e as estratégias do Governo de Michel Temer para minimizar o escândalo da venda ilegal de carnes. **Revista OKARA: Geografia em debate**, v.12, n.2, 2018, p. 577-602.
- DAVIES, Y.M.; CUNHA, M.P.V; OLIVEIRA, M.G.X.; OLIVEIRA, M.C.V.; PHILADELPHO, N., ROMERO, D.C., SÁ, L.R.M. Virulence and

antimicrobial resistance of *Klebsiella pneumoniae* isolated from passerine and psittacine birds. **Avian Pathol**, 45 (2), 2016, p.194-201.

DIPEMAR. Projeto identifica problema que afeta a produção de frangos no Brasil. **Revista Nacional de Carne**, v. 207, maio 1994, p. 73-74.

DOYLE, M. P., BEUCHAT, L. R., MONTVILLE, T. J., **Food Microbiology-Fundamentals and Frontiers**. 2 ed. ASM Press, Washington, DC, 2001, p.1-5.

DYCE, K.M.; SACK, W.O.; WENSING, C.J.G. **Tratado de Anatomia Veterinária**. Anatomia das Aves, 3ª ed., cap. 39, 2004, p.787-789.

EL-SUKHON, MUSA, A.; AL-ATTAR, M. 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 Diseases**, v.. 46, 2002, p. 605-612.

FALLAVENA, L.C.B.; MORAES, H.L.S.; SALLE, C.T.P; DA SILVA, A.B.; VARGAS, R.S.; DO NASCIMENTO, V.P.; CANAL, C.W. **Diagnosis of Skin lesions in condemned or downgraded broiler carcasses -A microscopic and macroscopic study**. **Avian Pathology**, v. 29, 2000, , p. 557-562.

FARMER, J.J. III; FANNING, G.R.; HUNTLEY-CARTER; G.P, HICKMAN, H.; BRENNER, R. *Kluyvera*, a new (redefined) genus in the family Enterobacteriaceae: identification of *Kluyvera ascorbata* sp nov and *Kluyvera cryocrescens* sp nov in clinical specimens. **J Clin Microbiol** ; n.13, 1981, , p.919–933.

FARMER, J.J. III; DAVIS, B.R.; HICKMAN-BRENNER, F.W., Biochemical identification of new species and biogroups of Enterobacteriaceae isolated from clinical specimens. **J Clin Microbiol**, n.21, 1985, p.46–76.

FERREIRA, A.J.P; KNÖBL, T. Colibacilose. In: BERCHIERI, A.J.; SILVA, E.N.; DI FÁBIO, J.; SESTI, L.; ZUANASE, M.A.F. **Doença das aves**. Campinas, SP: Facta, 2009, p.457-471.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo, Ed. Atheneu, 1996, p.196.

- HAFEZ, H. M. Doenças respiratórias em perus. In: REVOLLEDO, L.; FERREIRA, A. J. P. **Patologia Aviária**, Barueri: Manole, 2009, p. 468-479.
- HOEPERS, P.G. **Caracterização de *Escherichia coli* isoladas de perus**. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, 2016, p.87.
- HOLT, G.J., KRIEG.R.N., SNEATH, A.H.P., STALEY, T.J. **BERGEY'S Manual of Determinative Bacteriology**. 9 ed. Ed: Willians & Wilkins, V.2, 1994, p.345-348.
- INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS (ICMSF). **Microrganismos de los alimentos. Su significado y métodos de enumeración**. 2. ed. Zaragoza: Editorial Acribia, 2000, p.147-150.
- JUAN, C.S; VIDAL, A.M.; ROBET, C. K III. Infections Caused by Kluyvera Species in Humans. **Clinical Infectious Diseases**, n.33, 2001, p. 69–74.
- KEUSCH, G.T.; ACHESON, D.W.K. **Bactérias Entéricas: Diarreia Secretória**. In: SCHAECHTER, M.; ENGLEBERG, N.C.; EISENSTEIN, B.I.; MEDOFF, G. Microbiologia: mecanismos das doenças infecciosas. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009, , p.157-164.
- KIM, J. H.; CHO, C. R.; UM, T. H.; RHU, J. Y; KIM, E. S.; JEONG, J.W; LEE, H. R. **Morganella Morganii Sepsis with Massive Hemolysis**. J Korean Med Sci; 22, 2007, p. 1082-1084.
- KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN, W.C. **Diagnóstico Microbiológico: Texto e Atlas Colorido**. 6ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008, p.430-432.
- LEVINSON, W.; JAWETZ, E. **Microbiologia médica e imunologia**. 7 ed. Porto Alegre. Artmed, 2005, p. 133–136.
- LEVY, C. E.; VAZ, T. M. I. Enterobactérias. In: Brasil. Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. **Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção**

**Relacionada à Assistência a Saúde.** Modulo 6 : Detecção e identificação de bactérias de importância médica /Agencia Nacional de Vigilância Sanitária.– Brasília: Anvisa,cap.3, 2013, p. 35-53.

LIMA, D.F.; SANTOS, R.M.R; ALBUQUERQUE, A.L.M.C; MARQUES, E.A.; LEÃO, R.S. Meningite neonatal causada por *Edwardsiella tarda*: relato de caso. **Anais: 4º Simpósio Internacional de Microbiologia Clínica (SIMC)**, Paraíba, 2014, p.15.

LOPES, E. S. **Perfil de enterobactérias isoladas de psitacídeos do tráfico de aves silvestres do estado do Ceará.** Tese (Doutorado). Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, Fortaleza, 2016, p. 23-24.

MACAHYBA, R.B.; MANO, S.B.; FREITAS, M.Q.; BAPTISTA, R.F. Condições post mortem em perus (*Meleagris gallopavo*) criados na região oeste catarinense e abatidos sob Inspeção Federal. **Revista brasileira de Ciências Veterinária**, v. 12, n. 1/3, jan./dez. 2005, p. 53-57.

MARTÍNEZ, J.; MARTÍNEZ, L.; ROSENBLUETH, M.; SILVA, J., MARTÍNEZ, R. How are genes sequence analyses modifying bacterial taxonomy. **Intern Microbiol**, 2004, p.261-268.

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

MOURA, M.S.; REIS, D.O.; CARREON, R.S.; ARAÚJO, L.B.; ARAÚJO, M.F.C.; CARRIJO, K.F.; CARDOSO, R. Causas de condenação *post-mortem* de perus abatidos em estabelecimentos com Serviço de Inspeção Federal (SIF) no estado de Minas Gerais, Brasil. **Revista brasileira de Ciências Veterinária**, v. 19, n. 1, jan./abr. 2012, p. 7-12.

MURRAY, P. R.; ROSEBTHAL, K.S.; KOBAYASHI, G. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia Médica**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara KOOGAN., 2000, p.189.

OLIVEIRA, W.F.; CARDOSO, W.M.; MAEQUES, L.C.L.; SALLES, R.P.R.; AGUIAR FILHO, J.L.C; TEIXEIRA, R.S.C.; ROMÃO, J.M.; LIMA, A.C.P. Utilização de diferentes meios de cultura para o isolamento de enterobactérias em amostras fecais de frangos de corte procedentes de explorações industriais

do Estado do Ceará, Brasil. **Revista portuguesa de ciências veterinárias**, 99 (552), 2004, p. 211-214.

ORR, R. T. **Biologia dos Vertebrados**. 5ª. ed. São Paulo: Rocca, 1986, p. 508.

PANG, Y.; WANG, H.; GIRSHICK, T.; XIE, Z.; KHAN, M. I. Development and application of a multiplex polymerase chain reaction for avian respiratory agents. **Avian Diseases**, Connecticut, v. 46, 2002, p.691-699.

PAULA, A.M.R. **Deteção de Salmonella em Alimentos Crus de Origem Animal Empregando os Imunoensaios Rápidos TECRA™ Salmonella VIA, TECRA™ Salmonella UNIQUE e o método convencional de cultura**. Dissertação Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2002, p.49.

PESSOA, I. C. **Perfil de resistência a antimicrobianos de bactérias isoladas de amostras de água das escolas estaduais de Boa Vista-RR**. Dissertação (mestrado); Universidade Federal de Roraima, Boa Vista-RR, UFRR, 2011, p. 101.

PESSOA, G.V.A.; SILVA, E.A.M. Meios de Rugai e lisinamotilidade combinados em um só tubo para a identificação presuntiva de enterobactérias. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 32, n. 1, 1972, p. 97-100.

PIANHO, C. R.; BASSANI, C. A; LEONARDO, J. M. L. O; MARIN, D. F., BASSANI, P. G. Principais causas de condenação de origem patológica em abatedouro de aves na região noroeste do Paraná. **42º Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária**. Curitiba-PR, 2015, p.148-151.

PODSCHUM, R.; ULLMANN, U. Klebsiella spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. **Clin. Microbiol. Rev.**, n.11, 1998, p.589-603.

POSS, P.E. Turkey industry strategies for controlo f respiratory and enteric diseases. **Poltry Science**, v.77, 1998, , p.1181-1185.

QUINN, P. J.; CARTER, M. E.; MARKEY, B.; CARTER, G. R. **Clinical Veterinary Microbiology**. London: Mosby, 1994, p. 648.

- QUINN, P. J.; MARKEY, B.; LEONARD, F.C.; FIZTPATRICK, E.S.; FANNING, S.; HARTIGAN, P.J. **Veterinary Microbiology and Microbial Diseases**. 2ed. Wiley-Blackwell Scienc, 2011, p.1231.
- REIS, R.S. **Abordagem proteômica da interação bactéria-hospedeiro na colibacilose aviária**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, p.90, 2011.
- SAMPAIO, I. B. M. **Estatística Aplicada À Experimentação Animal**. 3ed. Belo Horizonte:FEP MVZ Editora, p. 265, 2007.
- SCHLETEIN, A. **Avaliação das causas de condenações de perus (*Meleagris Gallopovo*) em 2005 e 2006 no estado do Rio Grande do Sul**. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Santa Maria. Centro de Ciências Rurais Programa de pós graduação em Medicina Veterinária, 2007, p. 75.
- SAVIOLLI, J.Y. **Pesquisa e caracterização de Escherichia coli patogênica (E. coli produtora de toxina Shiga – STEC; E. coli aviária patogênica - APEC) de fragatas (Fregata magnificens) da Costa do Estado de São Paulo**. Dissertação mestrado. Universidade de São Paulo, 2010, p.84.
- SECRETÁRIA DE COMÉRCIO EXTERIOR – SECEX. MINISTÉRIO DA INDÚSTRIA, COMÉRCIO EXTERIOR E SERVIÇOS – MDIC. **Exportações do agronegócio brasileiro: 2014 2015 e 2016**. UOL ECONOMIA. Carne Fraca 29/03/2017. Disponível: <https://economia.uol.com.br/carnefraca>. Acessado: 02/08/2018.
- SEGABINAZI, S. D.; FLÔRES, M. L.; BARCELOS, A. S.; JACOBSEN, G.; ELTZ, R. D.Bactérias da família Enterobacteriaceae em *Alphitobius diaperinus* oriundos de granjas avícolas dos Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**, vol. 33, núm. 1, 2005, p. 51-55.
- SHINOHARA, N. K. S.; BARROS, V. B.; JIMENEZ, S. M. C.; MACHADO, E. C. L.; DUTRA, R. A. F.; FILHO, J. L. L. Samonella spp., importante agente patógeno veiculado em alimentos. **Revista Ciências & Saúde Coletiva**, v. 13, n. 5, 2008, p. 1675-1683.
- SPANAMBERG, A.; MACHADO, G.; CASAGRANDE, R. A.; SALES, G. M.; FRAGA, C. F.; CORBELLINI, L. G.; DRIEMEIER, D.; FERREIRO, L. *Aspergillus*

*fumigtus* from and condemned carcasses with airsacculitis in commercial poultry. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 2013, p. 1071-1075.

TRABULSI, L.R. ALTERTHUM, F.; **MICROBIOLOGIA**. In: Microbiologia. 4<sup>a</sup> ed. São Paulo: Atheneum, 2004, p.98.

TALAMINI, D.J.D.; FILHO SANTOS, J.I. Panorama da avicultura 2017. A avicultura brasileira tem demonstrado ao longo dos anos grande capacidade de resistir às dificuldades. **Anuário 2018 da avicultura industrial**, n.11, 2017, p.16-21.

UBABEF **União** Brasileira de Avicultura, São Paulo, 2014. Disponível em: [www.ubabef.com.br](http://www.ubabef.com.br) Acessado: 31 de agosto de 2017.

WANG I.K.; KUO H.L.; CHEN Y.M.; LIN C.L.; CHANG H.Y.; CHUANG F.R.; LEE M.H. Extraintestinal manifestations of *Edwardsiella tarda* infection. **Int. Journal Clinic. Pract.**, 59, 2005, 917-921.

## APÊNDICE A

**Apêndice A** - Resultados dos métodos utilizados para isolamento de enterobactérias em carcaças com aerossaculite, coletados em um frigorífico do estado do Paraná com SIF.

Amostra	Escala de grau/ localização	BHI (Resfriadas)	BHI+Glicerol (Congeladas)	Congeladas+ LB (Estufa 35°)	Enterobactéria
01	3T	+	-	-	Não identificado
02	3T	+	+	+	<i>E. coli</i> <i>Aspegillus fum.</i>
03	4A	-	-	+	<i>Morganella</i> <i>Salmonella sp.</i>
04	2T	+	+	+	<i>Citrobacter</i>
05	3T	+	+	+	<i>Morganella</i> <i>Salmonella sp.</i> <i>Citrobacter</i>
06	2T	+	+	+	<i>Citrobacter</i>
07	2T	+	+	+	<i>Proteus mirabilis</i>
08	3T	+	-	-	Não idetificada
09	4A	-	-	+	<i>Citrobacter</i>
10	1A	+	-	+	<i>E. coli</i>
11	3 A	+	+	+	<i>E. coli</i>
12	4A	+	-	+	<i>E. coli</i> <i>Citrobacter</i>
13	3T	+	-	+	<i>Proteus mirabilis</i> <i>Kluyvera sp.</i>
14	3T	+	-	+	<i>E. coli</i>
15	2T	+	+	+	<i>Proteus mirabilis</i>
16	2T	+	-	-	Não identificada
17	3T	+	-	+	<i>E. coli</i>
18	3T	+	-	+	<i>Edwardsiella sp.</i>
19	3T	+	+	+	<i>E. coli</i>
20	3T	+	-	+	<i>E. coli</i>
21	3T	+	+	+	<i>Proteus vulgaris</i>
22	1T	+	-	+	<i>E. coli</i>

Continua...

...Continuação

23	2T	+	-	+	<i>E. coli</i>
24	4A	+	-	+	Não fermentadora
25	4A	+	+	+	<i>E. coli</i> <i>Klebsiella</i>
26	2T	+	-	+	<i>E.coli</i>
27	2T	+	-	+	<i>E.coli</i>
28	2T	+	+	+	<i>E.coli</i>
29	2T	+	-	+	<i>E.coli</i>
30	2T	+	-	+	<i>E.coli</i>
31	3T	+	+	+	<i>Edwardsiella sp.</i>
32	2T	+	-	-	Não identificada
33	1A	+	+	+	<i>E. coli</i>
34	1A	+	-	+	<i>E.coli</i>
35	3T	+	+	+	<i>Morganella</i>
36	3T	+	-	+	<i>Edwardsiella sp.</i>
37	2T	+	+	+	<i>Morganella</i>
38	3T	+	-	+	<i>E.coli</i>
39	2T	+	-	+	<i>E.coli</i>
40	2T	+	+	+	<i>E.coli</i>
41	3T	+	-	+	<i>E.coli</i>
42	3T	+	+	+	<i>E.coli</i>
43	4A	+	-	+	<i>Kluyvera</i>
44	3T	+	-	+	<i>E.coli</i>
45	2T	+	-	+	<i>E. coli</i>
46	4A	+	+	+	<i>Edwardsiella sp.</i>
47	3T	+	+	+	<i>E. coli</i>
48	3T	+	+	+	<i>E.coli</i>
TOTAL		46	20	44	

\*T = saco aéreo torácico com lesões.

\*\*A = saco aéreo abdominal com lesões

**ANEXO A****CALDO CÉREBRO-CORAÇÃO  
BRAIN-HEART INFUSION BRHOTH (BHI)****Fórmula/Litro**

Infusão Cérebro-Coração.....	17,5g
Digestão Enzimática de Gelatina.....	10g
Dextrose.....	2g
Cloreto de Sódio.....	5g
pH Final:7,4 ± 0,2 a 25°C	

**Modo de Preparo**

1. Dissolva 37g do meio em 1L de água purificada.
2. Aqueça, agitando frequentemente para dissolver completamente o meio.
3. Autoclave a 121°C por 15 minutos.

Oxoid, USA

**ANEXO B****CALDO LB MILLER – LB BRHOTH, MILLER****Fórmula/Litro**

Digestão Enzimática de Caseína.....	10g
Extrato de Levedura .....	5g
Cloreto de Sódio.....	10g
pH Final: 7,3 ± 0,2 a 25°C	

**Modo de Preparo**

1. Dissolva 25g do meio em 1L de água purificada.
2. Misture completamente.
3. Autoclave a 121°C por 15 minutos.

Oxoid, USA

**ANEXO C****ÁGAR MacConkey****Fórmula/Litro**

Peptona de Caseína.....	1,5g
Peptona de Carne.....	1,5g
Peptona de Gelatina.....	17g
Sais Biliares (mistura).....	1,5g
Lactose.....	10g
Cloreto de Sódio.....	5,0g
Vermelho Neutro.....	0,03g
Cristal Violeta.....	0,001g
Ágar.....	13,5g
Água Destilada q.s.p.	
pH Final: 7,1 ± 0,2	

Oxoid, USA

## ANEXO D

### Meio EPM-MILi

#### **Fórmula**

Triptona, Extrato de Carne, Cloreto de Sódio, Fosfato de Sódio/Fosfato de Sódio Anidro, L\_triptofano, Agar Bacteriológico, Azul de Bromotimol, Ácido Clorídrico, Triptona de Caseína, Peptona de Carne, Extrato de Levedura, L\_lisina, Dextrose, Agar Bacteriológico, Púrpura de Bromocresol e Água Purificada.

#### **Indicação**

Kit para identificação bioquímica de bactérias da Família Enterobacteriaceae.

Oxoid, USA

**ANEXO E****ÁGAR CITRATO****Fórmula/Litro**

Diidrogenofosfato de Amônia.....	1g
Hidrogenofosfato Dipotássico.....	1g
Cloreto de Sódio.....	5g
Citrato de Sódio.....	2,5g
Sulfato de Magnésio.....	0,2g
Azul de Bromotimol.....	0,08g
Ágar-Ágar.....	15g
Água Destilada.....	q.s.p

pH Final: 6,8 ± 0,2

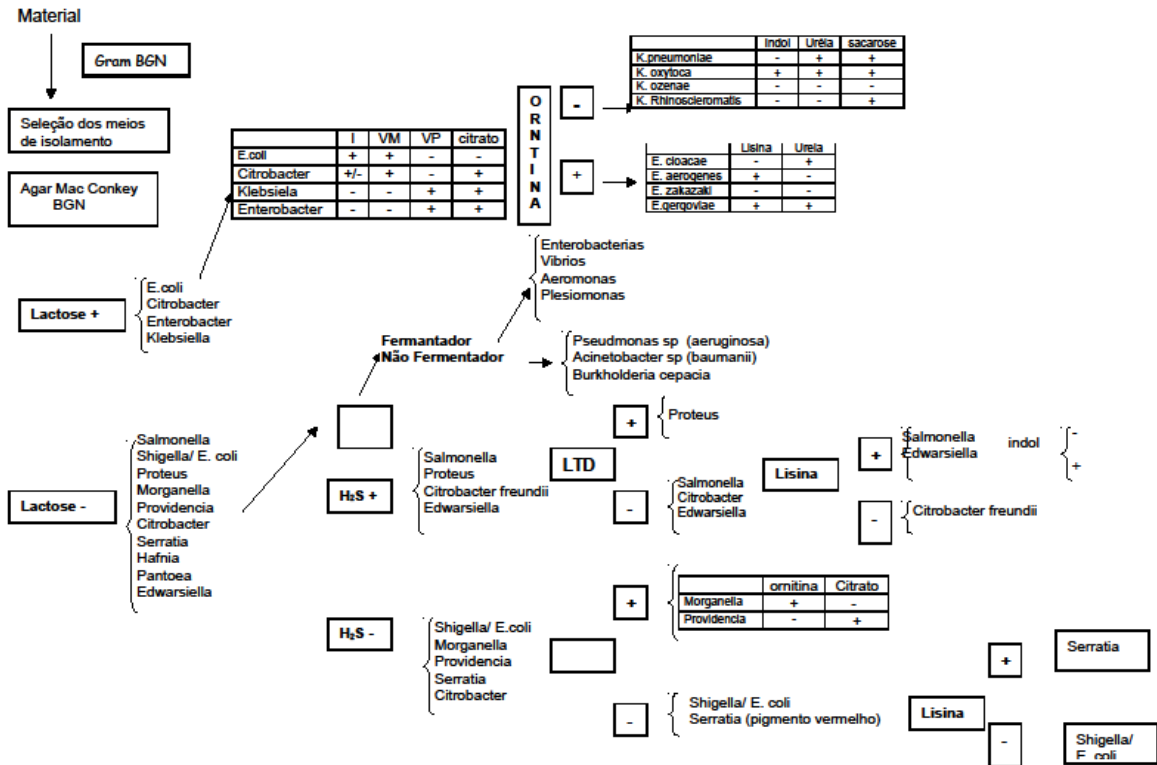
**Indicação**

É utilizado na identificação de bactérias, principalmente as enterobactérias, que o utilizam como fonte de carbono.

Oxoid, USA

## ANEXO F

Fluxograma para Identificação de Enterobactérias



(PESSOA & SILVA, 1972)

