

UFSM

Dissertação de Mestrado

**AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA, HISTOPATOLÓGICA
E BACTERIOLÓGICA DE FÍGADOS DE FRANGOS
(*Gallus gallus*) CONDENADOS NO ABATE PELA
INSPEÇÃO SANITÁRIA**

Aleverson da Silva Barcelos

PPGMV

Santa Maria, RS, Brasil

2005

**AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA, HISTOPATOLÓGICA
E BACTERIOLÓGICA DE FÍGADOS DE FRANGOS
(*Gallus gallus*) CONDENADOS NO ABATE PELA
INSPEÇÃO SANITÁRIA**

por

Aleverson da Silva Barcelos

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado
do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária,
Área de Concentração em Medicina Veterinária Preventiva, da
Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS),
como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Medicina Veterinária

PPGMV

Santa Maria, RS, Brasil

2005

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária**

A comissão examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA, HISTOPATOLÓGICA E
BACTERIOLÓGICA DE FÍGADOS DE FRANGOS (*Gallus
gallus*) CONDENADOS NO ABATE PELA INSPEÇÃO
SANITÁRIA**

elaborada por
Aleverson da Silva Barcelos

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Medicina Veterinária

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof. Dra. Maristela Lovato Flôres
(Presidente/Orientadora)

Prof. PhD. Glauca Denise Kommers

Prof. PhD. Vladimir Pinheiro do Nascimento

Santa Maria, 23 de Fevereiro de 2005.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Paulo Ernani Soares Barcelos e minha mãe Cleuza Regina da Silva Barcelos, que, tenho certeza olha por mim de onde estiver.

A minha mãe emprestada Ilda Carvalho da Silva, para a qual não existem quaisquer palavras que demonstrem meu amor incondicional.

A minha esposa Enedina Maria Teixeira da Silva, que, sem dúvida, é o que de melhor aconteceu na minha vida.

A minha orientadora Prof^a Dra. Maristela Lovato Flôres, pela oportunidade de crescimento profissional e pessoal.

A Prof^a PhD. Glaucia Denise Kommers, sempre atenciosa e que, com imensurável gentileza e boa vontade contribuiu de maneira inestimável para a realização desse trabalho.

Aos médicos veterinários responsáveis pelo Serviço de Inspeção Federal onde foram realizadas as coletas, Paulo Armendaris e Adriana Fernandes de Fernandes.

As acadêmicas e bolsistas do projeto, Taiane Antoniazzi e Patrícia Aristimunha, pela preciosa dedicação em todas as etapas desse trabalho.

A colega Médica Veterinária Joana Bassan, pela amizade e pelo significativo auxílio na execução laboratorial;

As colegas Médicas Veterinárias Stefanie Dickel Segabinazi e Gislaine Jacobsen pela colaboração e amizade;

A Técnica de Laboratório Rosângela Dariva Eltz, pela elaboração do material utilizado durante as análises bacteriológicas;

A coordenação, professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da UFSM;

A CAPES;

A DEUS, por seu persistente entusiasmo em renovar a criação a cada manhã, e nunca levar em conta a dignidade ou merecimento de cada um de nós.

SUMÁRIO

LISTA DE QUADROS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
1 INTRODUÇÃO	01
2 REVISÃO DE LITERATURA	04
2.1 <i>Escherichia coli</i>	04
2.2 <i>Salmonella</i> sp.....	12
2.3 <i>Staphylococcus</i> sp.....	21
3 Material e Método	27
3.1 Procedência das amostras.....	27
3.2 Coleta das amostras.....	27
3.3 Envio da amostras para o LCDPA.....	28
3.4 Avaliação macroscópica das amostras.....	28
3.5 Avaliação bacteriológica para <i>Salmonella</i> sp.....	28
3.5.1 Pré-enriquecimento das amostras.....	29
3.5.2 Enriquecimento seletivo.....	29
3.5.3 Plaqueamento seletivo.....	29
3.5.4 Identificação bioquímica.....	30
3.6 Avaliação bacteriológica para <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus</i> sp..	32
3.6.1 Determinação de <i>Staphylococcus</i> sp.....	32
3.6.2 Determinação de <i>E. coli</i>	33
3.7 Avaliação histopatológica.....	33
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4.1 Avaliação macroscópica.....	34
4.2 Avaliação histopatológica e bacteriológica.....	41

5 CONCLUSÕES.....	58
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - Fígados de frango (<i>Gallus gallus</i>) condenados pelo Serviço de Inspeção Sanitária de Produtos de Origem Animal, com alteração na cor, forma, tamanho e/ou consistência	35
QUADRO 2 - Fígados de frango (<i>Gallus gallus</i>) condenados pelo Serviço de Inspeção Sanitária de Produtos de Origem Animal, com alteração na cor, forma, tamanho e/ou consistência (continuação).....	36
QUADRO 3 - Fígados de frango (<i>Gallus gallus</i>) amarelos ou amarelados e com outras alterações macroscópicas associadas, condenados pelo Serviço de Inspeção Sanitária de Produtos de Origem Animal.....	37
QUADRO 4 - Fígados de frango (<i>Gallus gallus</i>) marrom-pálidos e com outras alterações macroscópicas associadas, condenados pelo Serviço de Inspeção Sanitária de Produtos de Origem Animal.....	38
QUADRO 5 - Fígados de frango (<i>Gallus gallus</i>) verdes ou esverdeados e com outras alterações macroscópicas associadas, condenados pelo Serviço de Inspeção Sanitária de Produtos de Origem Animal.....	39
QUADRO 6 – Resultados das análises histopatológica e bacteriológica em fígados de frango (<i>Gallus gallus</i>) condenados pelo Serviço de Inspeção Sanitária de Produtos de Origem Animal.....	41

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** – Esquema de pesquisa de *Salmonella* sp. em fígados de frangos (*Gallus gallus*), modificado de SIQUEIRA (1995)..... 31
- FIGURA 2** - Fígado de *Gallus gallus*. Colângio-hepatite heterofílica multifocal. A) Amostra 93. Observa-se acentuação do padrão lobular e aumento de volume com bordas arredondadas. B) Amostra 96. Há infiltrado heterofílico (intra e periductal), hiperplasia de ductos biliares e fibrose periportal. Há vacuolização de hepatócitos adjacentes. Hematoxilina-eosina. Obj. 10x..... 51
- FIGURA 3** - Fígado de *Gallus gallus*. Pericolangite heterofílica multifocal. A) Amostra 30. Observa-se coloração marrom-pálida entremeada por áreas avermelhadas. B) Amostra 92. Há infiltrado heterofílico periportal, proliferação de ductos biliares e degeneração gordurosa nos hepatócitos adjacentes. Hematoxilina-eosina. Obj. 10x..... 52
- FIGURA 4** - Fígado de *Gallus gallus*. Hepatite necrosante aleatória. Amostra 36. A) Há áreas claras multifocais a coalescentes próximos aos bordos. B) Há áreas extensas de necrose infiltradas por heterófilos e por agregados de bactérias basofílicas sugestivas de infecção por *Staphylococcus aureus*. Hematoxilina-eosina. Obj. 10x. C) Aproximação da Figura 4B evidenciando os agregados de bactérias cocóides. Hematoxilina-eosina. Obj. 40x..... 53

FIGURA 5 - Fígado de *Gallus gallus*. Hepatite necrosante aleatória com microtrombose sinusoidal (sugestiva de infecção de *E. coli*). Amostra 46. A) Apresenta-se difusamente esverdeado e friável. B) Há microtrombos de fibrina intrasinusoidais (seta). Hematoxilina-eosina. Obj. 20x..... 54

FIGURA 6 - Fígado de *Gallus gallus*. Hepatite necrosante aleatória. A) Amostra 13. Há aumento de volume, com leve pontuado esbranquiçado na superfície capsular. B) Amostra 31. Há intenso pontuado branco multifocal a coalescente na superfície capsular (mesma lesão vista em A, porém mais severa e de maior duração). C) Amostra 6. Áreas multifocais de necrose infiltradas por fibrina. Hematoxilina-eosina. Obj. 20x. D) Amostra 6. Observam-se granulomas heterofílicos. Hematoxilina-eosina. Obj. 20x... 55

FIGURA 7 - Fígado de *Gallus gallus*. Peri-hepatite fibrinosa. **A)** Amostra 24. Há espessamento da cápsula com deposição de fibrina. **B)** Amostra 22. Saco hepatoperitonal e cápsula hepática espessados por fibrina em organização e células inflamatórias. Hematoxilina-eosina. Obj. 10x.....56

FIGURA 8 - Fígado de *Gallus gallus*. Lesão associada a hipóxia (sugestiva de insuficiência cardíaca direita). Amostra 18. A) Degeneração e necrose centrolobular e em ponte (lesão aguda). Hematoxilina-eosina. Obj. 20x. B) Há espessamento da cápsula hepática e aspecto irregular e nodular na superfície (lesão crônica)..... 57

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA, HISTOPATOLÓGICA E BACTERIOLÓGICA DE FÍGADOS DE FRANGOS (*Gallus gallus*) CONDENADOS NO ABATE PELA INSPEÇÃO SANITÁRIA

AUTOR: ALEVERSON DA SILVA BARCELOS
ORIENTADOR: MARISTELA LOVATO FLÔRES
SANTA MARIA, 23 DE FEVEREIRO DE 2005.

Este trabalho avaliou através da macroscopia, histopatologia e bacteriologia, fígados de frangos (*Gallus gallus*) condenados pelo Serviço de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Foram coletadas 100 amostras de fígados de frangos, das quais 90 apresentavam alterações macroscópicas e 10 amostras sem alterações. As coletas foram feitas em dois abatedouros localizados no Estado do Rio Grande do Sul. Estes trabalham sob o Serviço de Inspeção Federal, um deles abatendo 120.000 frangos/dia e o outro com um abate superior a 300.000 frangos/dia. Para avaliação macroscópica os parâmetros considerados foram a forma, coloração, tamanho, consistência, odor e presença ou não de lesões visíveis. Neste trabalho foi considerada a cor do órgão como sendo o principal parâmetro para caracterização das lesões macroscópicas, tendo-se observado fígados com alteração na cor, forma, tamanho e/ou consistência em 47/90 amostras; fígados marrom-pálidos e com outras alterações macroscópicas associadas perfizeram 19/90 amostras; fígados amarelos ou amarelados e com outras alterações associadas perfizeram 5/90 amostras e fígados verdes ou esverdeados e com outras alterações associadas perfizeram 19/90. Os diagnósticos histopatológicos incluíram colângio-hepatite heterofílica multifocal, degeneração e/ou necrose hepatocelular centrolobular e em ponte, hepatite necrosante aleatória, pericolangite heterofílica multifocal, peri-hepatite fibrinosa subaguda difusa acentuada e ainda outras alterações inespecíficas. A avaliação bacteriológica foi direcionada para pesquisa de *Escherichia coli*, *Salmonella* sp. e *Staphylococcus* sp. Utilizando-se cultivo direto das amostras de fígado em meios de cultura seletivos, isolou-se *E. coli* em 26/100 amostras e

Staphylococcus sp. em 24/100 amostras, independentemente do diagnóstico morfológico obtido na avaliação histopatológica. Para pesquisa de salmonelas utilizou-se a metodologia convencional preconizada pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, entretanto não houve isolamento de nenhuma bactéria do gênero *Salmonella*. Pode-se observar o predomínio de lesões macroscópicas e microscópicas compatíveis com infecção bacteriana e concluir que os critérios de condenação de vísceras utilizados pela inspeção sanitária foram, neste caso, adequados e eficientes na eliminação de fígados com risco de transmissão de enfermidades.

Palavras-chave: fígado, frango de corte, inspeção de carnes, patologia, bacteriologia.

ABSTRACT

Master's Dissertation

Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

**GROSS, MICROSCOPIC, AND BACTERIOLOGIC EVALUATION OF BROILER
LIVERS (*Gallus gallus*) CONDEMNED AT THE SLAUGHTER BY THE
SANITARY INSPECTION**

AUTHOR: ALEVERSON DA SILVA BARCELOS
ADVISER: MARISTELA LOVATO FLORES
Santa Maria, February 23rd 2005.

*Gross, microscopic, and bacteriologic evaluation of broiler livers condemned by the Federal Inspection Service of Animal Products was performed. One hundred broiler livers were sampled at slaughter. Ninety of them had gross changes and 10 of them were grossly normal. The sampling was done in two slaughter houses located in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. One of these two places slaughters 120,000 broilers/day, and the other one slaughters over 300,000 broilers/day. For the gross evaluation, the considered parameters were shape, color, size, texture, odor, and the presence of other visible lesions. The color of the liver was considered as the main gross change. Livers with gross changes in color, shape, size and/or texture were 47/90; brown-pale livers with other associated macroscopic lesions were 19/90; yellow or yellowish livers with other associated gross changes were 5/90; and green or greenish livers with other associated lesions were 19/90. The microscopic (morphologic) diagnoses consisted of multifocal heterophilic colangio-hepatitis, degeneration and/or centrilobular to bridging hepatic cellular necrosis, random necrotizing hepatitis, multifocal heterophylic pericolangitis and other unspecific changes. The bacteriological evaluation was leaded to the search of *Escherichia coli*, *Salmonella* sp. and *Staphylococcus* sp. It was utilized direct culture of the liver samples in selective culture medias. *E. coli* was isolated in 26/100 samples and *Staphylococcus* sp. in 24/100 samples, regardless the morphologic diagnosis. For the *Salmonella* sp. search it was used the conventional method indicated by the Department of Agriculture, however, there was no isolation of any bacteria of the *Salmonella* genus. The main gross and microscopic lesions were compatible with bacterial infections. It is concluded*

that the criteria for visceral condemnation used by the sanitary inspection was appropriated and efficient in the detection and elimination of the livers with potential infectious hazard.

Keywords: *liver, broiler, meet inspection, pathology, bacteriology.*

1 INTRODUÇÃO

O problema da fome não é uma preocupação recente. Muitos homens, desde a Antigüidade, já se preocupavam com o futuro da alimentação. A necessidade de uma maior produção de alimentos vem, a cada dia, modificando os hábitos alimentares da população mundial, com o consumo e produção de carnes e subprodutos comestíveis de diferentes espécies animais.

Devido à alta qualidade protéica, bem como ao preço mais baixo em relação a outras carnes, a carne de frango e seus subprodutos comestíveis têm tomado o lugar de outras carnes no mercado mundial, constituindo-se em melhor alternativa de consumo. Isto se reflete na produção.

A produção brasileira de frangos de corte tem protagonizado um dos maiores sucessos no competitivo setor do agronegócio nessas últimas décadas, que tem colocado o país no topo do comércio internacional de carne de frangos. Assim, o Brasil se posiciona hoje, como o terceiro maior produtor, o segundo maior exportador de carne de frangos e o primeiro em receita cambial (PONTES, 2004).

O fígado de frango (*Gallus gallus*), in natura ou processado, como alimento para o homem é passível de sofrer contaminações por microorganismos devido à sua constituição química, condições de obtenção e manipulação.

Em muitas espécies de aves o fígado é o primeiro e o maior órgão interno visto na necropsia quando a cavidade corporal é aberta e usualmente é selecionado para análise histopatológica, por ser um dos órgãos mais importantes para o diagnóstico. Muitas lesões do fígado não são específicas, bem como as causas das mesmas, mas proporcionam uma

importante informação sobre os mais generalizados processos patológicos (RANDALL & REECE 1996).

O serviço oficial permanente de inspeção sanitária dos abatedouros avícolas, representado pelo SIF (Serviço de Inspeção Federal) do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento e suas representações estaduais e municipais, constituem os órgãos responsáveis pela garantia de qualidade (PONTES, 2004).

Os fiscais sanitários removem as carcaças da linha de abate quando estas apresentam qualquer sinal de doença ou outra condição que afete a aparência das mesmas. Dependendo da lesão, os inspetores procedem a uma condenação parcial ou total das carcaças afetadas. A inspeção sanitária é compulsória e legalizada no Brasil desde 1950. Assim, as causas de condenação podem ser de origem infecciosa ou não (PONTES, 2004).

As causas não patológicas representam a principal perda de carcaças nos abatedouros; mais de 80% das condenações são causadas por elas. As causas patológicas específicas de condenação de carcaças incluem inúmeras doenças e síndromes que deixam lesões (quase nunca patognomônicas) generalizadas, ou simplesmente, reduzem o rendimento das aves sem, necessariamente representar riscos à saúde do consumidor.

Para efeito de classificação de causas de condenação, os inspetores são treinados para o reconhecimento visual dos seguintes problemas na linha de inspeção dos abatedouros: abscessos, aerossaculite, artrite, aspecto repugnante, caquexia, celulite, colibacilose, neoplasias, salpingite, septicemia, ascite e síndrome hemorrágica (PONTES, 2004).

Com relação às vísceras de frangos, o critério de condenação das mesmas, em especial os fígados é bastante subjetivo, baseando-se no aspecto visual (cor, forma e tamanho); consistência e odor, de acordo com

QUADRO 1 – Fígados de frango (*Gallus gallus*) condenados pelo Serviço de Inspeção Sanitária de Produtos de Origem Animal, com alteração na cor, forma, tamanho e/ou consistência. 1
Agricultura.

Existe ainda a prerrogativa de que determinadas alterações macroscópicas em fígados de frangos, evidenciadas no momento da inspeção dos mesmos, estejam relacionadas com uma ou mais enfermidades específicas, o que pode não ser uma realidade. Estas, isoladamente, não necessariamente os tornariam impróprios para o consumo, e, dessa forma, seria necessária uma avaliação mais detalhada do órgão.

Na maioria das vezes os critérios de condenação utilizados não traduzem as reais condições do órgão condenado e patologias que possam estar relacionadas às alterações visualizadas, proporcionando, por fim, um descarte de uma quantidade significativa de fígados. Outro aspecto muito importante é a saúde pública, uma vez que a carne de frango e seus subprodutos, como todos os produtos de origem animal, são uma das mais importantes fontes de enfermidades transmitidas por alimentos.

Este trabalho se propõe a: fornecer subsídios que possam ser utilizados pelos envolvidos no trabalho de inspeção de aves no que tange aos critérios de condenação de fígados de frangos, através da avaliação macroscópica, histopatológica e bacteriológica de fígados condenados pela inspeção sanitária.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Escherichia coli*

Com o advento da avicultura moderna, industrial, que tem como modelo de criação quase que exclusivamente o confinamento, as patologias aviárias se incrementam e a *Escherichia coli*, neste tipo de atividade, aparece como um dos mais frequentes agentes etiológicos, causando enormes prejuízos econômicos (SILVA, 1992). O termo colibacilose aviária refere-se a qualquer infecção, localizada ou sistêmica, causada pela *E. coli* patogênica das aves (APEC) (BARNES *et al.*, 2003).

Escherichia coli foi descrita pela primeira vez em 1885 por Theodor von Escherich e denominada *Bacterium coli commune*. (BERCHIERI JUNIOR, 2000). É uma bactéria integrante da flora intestinal das aves e dos mamíferos, pertencente à família *Enterobacteriaceae*, gênero *Escherichia*. A colonização do intestino ocorre logo após o nascimento, e embora o papel da microbiota entérica ainda não tenha sido completamente elucidado, existem evidências da participação destes microorganismos na nutrição, servindo como fonte de vitaminas, e na ocupação dos sítios intestinais, impedindo a colonização do epitélio por microrganismos patogênicos (LEITE, 2001).

Segundo BARNES *et al.* (2003) é comum encontrar-se, no trato intestinal de aves, concentrações acima de 10^6 unidades formadoras de colônia (UFC) de *E. coli* por grama de fezes, sendo que 10-15% destas são potencialmente patogênicas. Há uma excreção contínua de *E. coli* portadora de fatores de virulência através das fezes, o que torna a sua distribuição cosmopolita. A bactéria pode permanecer nas criações por longos períodos, contaminando o alimento e a água que servirão como via de disseminação. A contaminação fecal da casca do ovo é uma das

principais vias de transmissão para os pintinhos, resultando em alta mortalidade embrionária. Roedores e aves silvestres também podem funcionar como reservatórios. (BERCHIERI JUNIOR, 2000)

O gênero *Escherichia* compreende as espécies *E. coli*, *E. blattae*, *E. fergusonii*, *E. hermannii*, *E. vulneris*. No entanto, a única espécie de importância prática é a *E. coli*. Esta espécie compreende um grande número de grupos e sorovares, identificados por meio de anti-soros preparados contra as três variedades de antígenos que ocorrem na espécie, que são O, K e H (CAMPOS & TRABULSI, 2002), sendo o antígeno O somático, o K capsular e o H flagelar. Existe uma grande variedade destes antígenos O, K e H, que são designados por números arábicos colocados após cada uma das três letras (CAMPOS & TRABULSI, 2002).

O antígeno somático O é um lipopolissacarídeo (LPS) componente da parede celular das bactérias Gram-negativas; divide-se em antígeno somático (que determina os diferentes sorogrupos em uma mesma espécie), o lipídeo A (endotoxina, atua na ativação de macrófagos e liberação de mediadores da inflamação, causando choque séptico) e Core (oligossacarídeos que ligam o lipídeo A ao antígeno somático). O antígeno flagelar H não é utilizado com frequência na identificação antigênica e a presença de flagelo não tem sido correlacionada com a patogenicidade. O antígeno capsular K é relacionado à resistência aos efeitos bactericidas causados pelo sistema complemento. Já o antígeno fimbrial F recobre a superfície bacteriana e é capaz de reconhecer receptores específicos na superfície de células eucarióticas; é um fator de virulência de fundamental importância no processo de aderência e colonização dos tecidos do hospedeiro (BERCHIERI JUNIOR, 2000).

Alguns sorovares de *E. coli* são associados a diversas patologias em humanos e animais domésticos. Entre estes sorovares são conhecidos: *E.*

coli enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroagregativa (EaggEC) e *E. coli* que adere difusamente (DAEC), todos patogênicos ao homem. Existem ainda a *E. coli* uropatogênica que afeta humanos e animais (UPEC), *E. coli* da meningite neonatal (NMEC), *E. coli* enteropatogênica para coelhos (REDEC), *E. coli* patogênica para aves (APEC), todas com mecanismos de virulência específicos (LEITE, 2001).

Os sorovares potencialmente patogênicos às aves podem ser encontrados nas fezes e na cama. A bactéria pode ser inalada pelas aves (pó em suspensão), transmitida por vetores e veículos ou penetrar via casca, no ovo (SILVA, 1992).

Os fatores de virulência associados às amostras de *E. coli* isoladas de aves são: sorogrupos O1, O2, O21, O36, O45, O78; presença de cápsula K1, K80; produção de colicinas (col V); produção de sideróforos (aerobactina); presença de fimbrias (P, S, Tipo 1); produção de citotoxinas; endotoxina (LPS); resistência sérica e invasão celular (BERCHIERI JUNIOR, 2000).

A maior parte das APEC isoladas de aves de produção são patogênicas apenas para aves e apresentam um baixo risco de doença para humanos ou outros animais. No entanto, frangos são susceptíveis à colonização por *E. coli* O157:H7, um importante patógeno enterohemorrágico em humanos (BARNES *et al.*, 2003).

A bactéria consiste em um bacilo gram-negativo, medindo de 2 a 3 µm de comprimento por 0,6 µm de largura, não esporulado, móvel, possuindo flagelos peritríquios (HIRSH & ZEE, 2003).

De acordo com BERCHIERI JUNIOR (2000) fragmentos ou suabes dos órgãos acometidos devem ser cultivados em caldos nutrientes (caldo BHI ou nutriente) e incubados a 37°C por 24 horas. Em seguida deve-se

semear o crescimento do caldo nutriente em meios seletivos. Também pode ser feito cultivo direto nos meios seletivos, no entanto, deve-se considerar a possibilidade de obtenção de menor número de colônias.

Os meios seletivos mais indicados para o isolamento de *E. coli* são o ágar MacConkey, ágar Eosina Azul de Metileno (EMB), ágar Hektoen e ágar Verde Brilhante (AVB). *E. coli*. apresenta colônias rosadas ou avermelhadas no ágar MacConkey, esverdeadas com aspecto metálico no meio EMB, amareladas no meio AVB e Hektoen. Colônias lisas são convexas e brilhantes, possuem bordos regulares, e se dispersam em solução fisiológica 0,85% (solução salina), enquanto colônias rugosas apresentam um aspecto grosseiro, contorno irregular e dificilmente se dispersam em solução salina (BERCHIERI JUNIOR, 2000).

E. coli cresce em temperaturas que podem variar de 18 a 44°C, sendo ideal a temperatura de 37°C. A produção de ácido e gás ocorre após a fermentação da glicose, maltose, manose, manitol, xilose, glicerol, ramanose, sorbitol e arabinose. As fermentações de adonitol, sacarose, salicina, rafinose, ornitina, dulcitol e arginina são variáveis. A maioria das amostras possui capacidade de fermentar a lactose, embora algumas amostras apresentem uma fermentação tardia. Produz reação de vermelho de metila positiva e Voges-Proskauer negativa. As provas de motilidade, lisina, e produção de indol são positivas enquanto as provas de oxidase, utilização do citrato, hidrólise de uréia, liquefação de gelatina e produção de H₂S são negativas (BERCHIERI JUNIOR, 2000).

HIRSH & ZEE (2003) acrescentam que a bactéria não desdobra o malonato de sódio; pode ser cultivada em meios simples como ágar, ágar-sangue e em meios indicadores com substâncias inibidoras, como o ágar-azul água e amarelo de meta-cromo de Gassner. Em cerca de 18 horas à

temperatura de 37°C, formam-se colônias de tamanho médio, geralmente redondas e lisas, podendo alguns tipos serem mucóides.

Segundo PEIGHAMBARI *et al.* (1994), para isolamento e identificação de *E. coli* a partir de fezes, os suabes são semeados em MacConey ágar e incubados por 24 horas à 37°C. Uma colônia bem isolada, lactose positiva, é transferida do MacConkey para o meio TSA. O sistema de replicação (Cathra Gram negative Identification System, MCT Medical Inc.) é usado para determinar as características biológicas das colônias isoladas.

Para estudos de fatores da patogenicidade e mecanismos de invasibilidade, são usados modelos biológicos, como a infecção experimental em animais (como pintos SPF de um dia), que são caros e de difícil aplicabilidade (SILVA & FIORENTIN, 1995).

Para BERCHIERI JUNIOR (2000) a determinação dos fatores de virulência associada à inoculação de pintinhos de um dia de idade é fundamental para estabelecer uma classificação da virulência destas bactérias, pois muitas amostras podem ser de origem fecal e não estar associada à doença em aves.

O aquecimento a 60°C por quinze minutos consegue matar a maioria das estirpes; são sensíveis aos desinfetantes comuns, antibióticos e quimioterápicos como a tetraciclina, estreptomicina, cloronitrina, neomicina, sulfonamidas e aos derivados nitrofuramínicos (HIRSH & ZEE, 2003).

Nas aves, a infecção por *E. coli* é considerada secundária a outros agentes e a manifestação da doença é extra-intestinal. A colibacilose é uma das principais doenças da avicultura industrial moderna, devido aos grandes prejuízos econômicos causados no mundo inteiro por quadros como: colisepticemia, peritonite, pneumonia, pleuropneumonia,

aerosaculite, pericardite, celulite, coligranuloma, doença respiratória crônica complicada (DRCC), onfalite, salpingite, síndrome de cabeça inchada (SCI), panoftalmia, osteomielite, ooforite e sinovite (BERCHIERI JUNIOR, 2000). Aparece, normalmente, associada a *Mycoplasma sp*, ao vírus da bronquite infecciosa, doença de Newcastle além das doenças imunossupressoras (LEITE, 2001).

Existem fatores que predisõem à colibacilose, entre eles a superpopulação, ventilação precária, acumulação excessiva de amônia no ambiente, alimentação inadequada, avitaminoses e hipovitaminoses (principalmente A), presença de coccidioses e verminoses em geral, micoplasmas e viroses respiratórias, manejo incorreto dos ovos férteis e incubadoras (SILVA, 1992).

Os principais sorogrupos relacionados com a colibacilose aviária são O1:K1, O2:K1, O36 e O78:K80. No Brasil os sorogrupos mais prevalentes são: O2, O21, O36, O50, O88, O100 e O 119 (BERCHIERI JUNIOR, 2000). Em pintinhos afetados observam-se sinais inflamatórios na cicatriz umbilical, comprometimento do saco vitelino, septicemia e generalização das lesões. Em adultos ocorrem conjuntivites, corrimento nasal, espirros, ruídos respiratórios, perda de peso e diminuição do consumo, arossaculite, pericardite, peri-hepatite e salpingite (SILVA, 1992; SEYED *et al.*, 1997).

GOMIS *et al.* (1997) constataram peri-hepatite em 80% dos frangos inoculados com *E. coli* via subcutânea. Os autores acrescentam que a bactéria não foi isolada de frangos que sobreviveram entre 7 e 14 dias pós-infecção. PEIGHAMBARI *et al.* (2000) observaram 9% de incidência de peri-hepatite em frangos de corte experimentalmente infectados com cepas de *E. coli* associadas ao vírus da bronquite infecciosa das galinhas.

A presença de *E. coli* na corrente sangüínea caracteriza a colisepticemia. A virulência do organismo e a eficiência do sistema imune determinam a duração, desenvolvimento e as conseqüências da doença, assim como o padrão e severidade das lesões (BARNES *et al.*, 2003).

Os estágios da colisepticemia são: septicemia aguda, poliserosite subaguda e inflamação granulomatosa aguda. Características da colisepticemia, encontradas na necropsia, são tecidos que desenvolvem odor característico e uma coloração esverdeada após a exposição ao ar. A bursa de Fabricius está freqüentemente atrófica ou inflamada; há pericardite usualmente associada à miocardite. A exsudação no pericárdio pode resultar em pericardite e fígado fibroso devido à congestão crônica nos sobreviventes (BARNES *et al.*, 2003).

SEYED *et al.* (1997) relatam, em pintinhos experimentalmente inoculados nos sacos aéreos caudais com uma cepa de *E. coli*, a presença de graus variáveis de hiperemia no baço, rim e fígado, além de infiltrado inflamatório com exsudato fibrinoso e debris celulares, indicando colisepticemia.

Na septicemia aguda, as aves apresentam-se com o papo cheio de alimento, fígado esverdeado e congestão dos músculos peitorais e, em alguns casos, pequenos focos brancos estão presentes no fígado (BARNES *et al.*, 2003).

Os sinusóides hepáticos estão alargados pela congestão, infiltrado heterofílico, tumefação das células de Kupffer, alargamento do espaço perisinusoidal, trombos de fibrina e trombócitos (HOERR, 1996).

NAKAMURA *et al.* (1985) observaram, em casos de colibacilose espontânea, necrose dos folículos linfóides do baço e trombos de fibrina nos sinusóides hepáticos com necrose ocasional de células hepáticas.

Cepas avirulentas de *E. coli* incitam respostas heterofílicas mais rapidamente que *E. coli* virulentas. A bactéria pode ser vista livre nos sinusóides e nos macrófagos sinusoidais. Necrose não é um aspecto significativo na forma aguda da infecção por *E. coli* (HOERR, 1996).

A doença respiratória crônica complicada e a colisepticemia ocorrem freqüentemente em aves com 4 a 9 semanas de idade e evolui para septicemia. A porta de entrada mais freqüente da bactéria é o trato respiratório superior, ocorrendo a colonização e multiplicação do agente na traquéia, com posterior disseminação para os sacos aéreos e tecidos adjacentes. As principais lesões são: traqueíte, aerossaculite, pericardite e peri-hepatite. As aves que sobrevivem ao quadro colisepticêmico podem apresentar salpingite, panoftalmite, meningoencefalite, celulite, osteomielite e sinovite, esplenomegalia, fígado com coloração esverdeada e descolorido e congestão do tecido muscular (BERCHIERI JUNIOR, 2000).

Outra forma da doença é o coligranuloma (doença de Hjarre) que atinge galinhas e perus; é caracterizada por granulomas, principalmente no fígado, cecos, duodeno, mesentério, mas não é comum no baço. É esporádica mas pode atingir algumas criações com elevada mortalidade. As lesões na serosa assemelham-se aos tumores da leucose. Logo no início da doença, há uma necrose de coagulação confluyente envolvendo mais da metade do fígado (BARNES *et al.*, 2003).

2.2 *Salmonella* sp.

A *Salmonella* sp. é um microorganismo amplamente difundido na natureza, sendo o homem e os animais seus principais reservatórios naturais. Trata-se de um patógeno muito envolvido em casos de doenças de origem alimentar em diversos países (BARROS *et al.*, 2002).

Oriunda de fontes de contaminações diversas, principalmente de origem fecal direta ou indireta, a *Salmonella* sp. é um microorganismo presente na maioria dos tipos de alimentos de origem animal, como carnes suínas, ovos, e carne de frango, sendo estes os maiores responsáveis pela veiculação deste patógeno ao homem e suas conseqüentes implicações em saúde pública (JAY, 1994).

A salmonelose é a enfermidade transmitida por alimentos que se apresenta com maior freqüência há muitos anos em todo o mundo. A doença atinge o homem e praticamente todos os animais, e tem sido verificada a elevação de sua freqüência, sobretudo nos últimos 10 anos, em virtude do aumento de infecções por *Samonella* Enteritidis, principalmente nos países desenvolvidos (ARRUDA PINTO, 2000). É um problema mundialmente persistente e está associada com dificuldades comerciais, prejuízos econômicos e queda na produção. A redução da sua presença é crítica em abatedouros e no processamento de produtos aviários como ovos, carne e derivados.

No Brasil não se sabe ao certo o número de casos e surtos de enfermidades transmitidas por alimentos, como a salmonelose, em virtude da quase total falta de notificação de ocorrência desse tipo de doença (PICOLLO *et al.*, 1992). Em trabalho realizado por PINTO (1999) houve a descrição de 889 surtos de toxinfecção alimentar no estado do Rio Grande do Sul (RS), no período de 1988 a 1997 e, dentre os casos, 299 foram identificados como provocados por alimentos contaminados com *Salmonella* sp., totalizando 33,63%. O autor conclui que a ocorrência de enfermidades transmitidas por alimentos no RS não é notificada, assim como ocorre em todos os locais do mundo onde houve o levantamento bibliográfico do trabalho.

As bactérias do gênero *Salmonella* pertencem à família *Enterobacteriaceae* e são encontradas na forma de bastonetes gram-negativos, com tamanho de aproximado de 0.7-1.5 e 2.0-5.0 µm. A maioria delas são móveis e movimentam-se através de flagelos peritríquios; exceção faz-se a *Salmonella Pullorum* e *Salmonella Gallinarum* que são imóveis (POPOFF, 2001). De todos os membros da família *Enterobacteriaceae* as salmonelas são as mais complexas devido a grande variedade de sorovares (KONEMAN *et al.*, 1992).

O pH ótimo para a multiplicação das salmonelas fica próximo de 7.0, sendo que valores superiores a 9.0 e inferiores a 4.0 são bactericidas. As salmonelas não toleram concentrações de sal superiores a 9% e a temperatura ideal para multiplicação é 35-37°C, sendo a mínima de 5°C e a máxima de 47°C. No entanto, vários estudos indicam que valores máximo e mínimos dependem do sorovar (FRANCO & LANDGRAF, 1996).

O gênero *Salmonella* compreende duas espécies: a) *S. enterica*, que é dividida em 6 subespécies: *S. enterica* subespécies *enterica* (I), *S. enterica* subespécies *salamae* (II), *S. enterica* subespécies *arizonae* (IIIa), *S. enterica* subespécies *diarizonae* (IIIb), *S. enterica* subespécies *houtenae* (IV) e *S. enterica* subespécies *indica* (VI) e b) *S. bongori* (formalmente chamada de *S. enterica* subespécies *bongori* V) (POPOFF, 2001).

As denominações foram mantidas apenas para as subespécies do sorotivar *enterica*, no qual se encontram a maioria das cepas isoladas de *Salmonella*. Na prática clínica, por exemplo, para a subespécie entérica tem sido utilizada a seguinte fórmula: *Salmonella* sorovar Typhimurium ou *Salmonella* Typhimurium (POPOFF & LE MINOR, 1997).

As espécies e subespécies podem ser distinguidas por diferentes características, e estas, através de fórmulas antigênicas em 2.501 sorovares. Usualmente, os 1.478 sorovares que fazem parte da *S. enterica* subespécie

enterica (I), colonizam o trato intestinal de animais de sangue quente, enquanto os outros 1.023 sorovares das subespécies II, IIIa, IIIb, IV e V e as 20 espécies de *S. bongori* são encontradas em animais de sangue frio e no meio ambiente (POPOFF, 2001).

Segundo EVANGELISTA (1994) as espécies e cepas de *Salmonella* são determinadas por antígenos específicos que provocam formação de anticorpos próprios no soro de animais injetados com bactérias inativadas. Esses antígenos são constituídos por dois grupos: somáticos (polissacarídeos) e flagelares (proteínas) diferenciados respectivamente pelas letras O e H. Algumas poucas salmonelas têm antígenos capsulares (K), denominados Vi, que interferem com a aglutinação por anti-soros O e estão associados à capacidade de invasão (JAWETZ *et al.* 1991; POPOFF & LE MINOR, 1997).

O principal habitat das espécies de *Salmonella* é o trato intestinal de animais tais como aves, répteis, animais de granja, pessoas e, acidentalmente, os insetos. Embora seu hábitat seja o trato intestinal, a *Salmonella* poderá, às vezes, encontrar-se em outras partes do organismo. Como formas intestinais, os microorganismos são encontrados nas fezes, onde, por meio de insetos ou de outros seres vivos, irão contaminar inúmeros lugares (JAY, 1994).

Em se tratando de alimentos, o número e a variedade de alimentos envolvidos no aparecimento de surtos de infecções por salmonela é grande, sendo os ovos, a carne de aves e seus derivados os que com maior frequência veiculam a salmonelose humana (JAY, 1994). As aves são consideradas um importante reservatório de *Salmonella* sp. e representam riscos para a saúde pública, uma vez que os métodos de abate e práticas de processamento podem disseminar a bactéria de uma carcaça para outra (CARTER, 1988).

Em aves, as salmoneloses apresentam-se sob a forma de pulorose, causada por *Salmonella Pullorum*, tifo aviário, por *Salmonella Gallinarum* (FRASER, 1997) e infecções paratifóides, determinadas pelas demais espécies de *Salmonella* (SILVA & FIORENTIN, 1995; SHIVAPRASAD, 2003).

A pulorose é uma enfermidade que pode acometer as aves em qualquer idade, mas é mais comum em aves jovens, nas três primeiras semanas de vida, com diarréia branca e alta mortalidade. Não é comum observar-se a doença em aves adultas, mas ocorre; aves jovens que sobrevivem à doença podem se tornar portadoras. A transmissão mais importante é a transovariana, porém, a disseminação pode ocorrer através de alimentos, água e cama contaminados, bem como por pessoas, animais, aves silvestres, moscas entre outras (BERCHIERI JUNIOR, 2000).

O tifo aviário, embora seja descrito mais comumente em aves adultas, pode acometer aves em qualquer idade de vida. O contato entre a ave doente e sadia, canibalismo, presença de aves mortas na granja, presença de moscas, pássaros, roedores, veículos de transporte, presença de pessoas e a falta de higiene e limpeza são fatores importantes da transmissão do tifo aviário (BERCHIERI JUNIOR, 2000).

A infecção por *S. Gallinarum* geralmente é septicêmica, afeta aves mais velhas e produz anorexia, diarréia amarelo-esverdeada à esverdeada, altas taxas de mortalidade e morbidade e quando afeta aves jovens pode ser confundida com a pulorose (SHIVAPRASAD, 2003).

O agente mais comum do paratifo aviário é a *Salmonella Typhimurium*, mas *Salmonella Enteritidis*, *S. Agona*, *S. Infantis*, *S. Hadar*, *S. Senftenberg* e *S. Heidelberg* já foram identificadas como agentes etiológicos desta enfermidade (BERCHIERI JUNIOR, 2000).

De acordo com HOERR (1996) as salmonelas são infectivas para aves, mas a severidade das lesões é altamente variável. *Salmonella Pullorum* e *Salmonella Enteritidis* são as espécies mais patogênicas em frangos, causando severas lesões. Na necropsia as lesões características compreendem tiflíte, hepatite, esplenite, miocardite, ventriculite e artrite. Segundo o mesmo autor, o fígado apresenta-se aumentado de volume e congesto, pálido e brilhante, com aspecto bronzeado comumente acompanhado de pequenos focos brancos. A progressão histológica no fígado assemelha-se a outras infecções bacterianas agudas, mas com zonas de necrose multifocais a coalescentes dos hepatócitos acompanhadas por inflamação linfocítica. A inflamação linfocítica permanece como seqüela da infecção por *Salmonella sp.*, embora esta não seja específica.

GAST (2003) acrescenta que em pintinhos, em casos agudos de pulorose e tifo, o fígado apresenta aumento de volume e congestão. Ainda, segundo o autor, ocasionalmente nódulos no coração podem ser vistos, os quais podem levar a uma distorção da forma do mesmo, levando, conseqüentemente, a uma congestão passiva crônica do fígado e ascite. Esplenomegalia, focos necróticos cinza com petéquias nos pulmões e fígados pálidos e descorados podem ser vistos. Em aves adultas podem ser vistas ainda, peritonite fibrinosa e peri-hepatite com ou sem envolvimento do trato reprodutivo.

KINDE *et al.* (2000) relatam, em poedeiras infectadas experimentalmente com *S. Enteritidis*, fígados com aumento de volume e pontos focais brancos e microscopicamente, áreas de necrose coagulativa multifocal dos hepatócitos e inflamação.

GAST (2003) cita que há uma quantidade limitada de informações sobre os achados microscópicos de tifo e pulorose, pois os relatos, em sua maioria, são de achados de campo, os quais podem estar associados e/ou

complicados por outras bactérias ou agentes virais. Entretanto o autor acrescenta que, embora as lesões sejam bastante diversas, achados microscópicos de necrose multifocal dos hepatócitos com acúmulo de fibrina e infiltração heterofílica no parênquima hepático podem ser vistas em casos agudos.

O isolamento e identificação de *Salmonella* sp. ainda é um problema para as indústrias de alimento devido ao longo tempo necessário para obtenção dos resultados, mas apesar da morosidade e labor o método tradicional ainda é amplamente utilizado em laboratórios de controle de qualidade das indústrias.

FREITAS *et al.* (1986) analisaram amostras de fígados de aves obtidos em abatedouros comerciais e verificaram que, das quinze amostras analisadas, duas apresentaram-se positivas para *Salmonella* sp. Entretanto, CARVALHO *et al.* (1994), em estudo realizado na avaliação bacteriológica de miúdos de frangos, não isolaram nenhuma bactéria do gênero *Salmonella* nessas vísceras comestíveis.

As metodologias recomendadas para o diagnóstico nas aves pelo ministério da Agricultura e do Abastecimento, conforme a Portaria nº 126 de 03/11/95, retificadas pela Instrução Normativa nº 22, de 12/08/99 são as seguintes:

- Bacteriológico: isolamento, identificação bioquímica e caracterização antigênica.
- Sorológico: soroaglutinação rápida, soroaglutinação lenta e microaglutinação.

A metodologia bacteriológica utilizada como padrão para o diagnóstico de *Salmonella* sp. apresenta boa sensibilidade. Por exemplo: a expectativa é que se identifique a presença de uma célula bacteriana em 25 g de alimento. Este método tradicional consiste de procedimentos que

envolvem duas ou três etapas de cultivo: 1º) pré-enriquecimento, necessitando um dia; 2º) enriquecimento seletivo, durante um dia; 3º) isolamento em ágar seletivo e identificação bioquímica, em um período de 2 a 3 dias (BRASIL, 1995).

O procedimento de pré-enriquecimento tem como objetivo principal aumentar as chances de isolamento do agente quando há um número muito baixo de células bacterianas, ou quando estão estressadas ou parcialmente danificadas. Pode-se usar os caldos água peptonada, triptose-soja ou BHI (brain heart infusion). O caldo deve ser incubado por 24 horas a 37°C (SIQUEIRA, 1995).

O enriquecimento seletivo tem por objetivo inibir a multiplicação da microbiota acompanhante e promover o aumento no número de células de *Salmonella*. É recomendado o uso de dois meios de enriquecimento, porque a resistência do microorganismo aos agentes seletivos varia de cepa para cepa (SILVA & JUNQUEIRA, 1995).

Os meios mais usados são os caldos Tetracionato (TT), caldo Selenito Cistina (SC) e o caldo Rappaport-Vassiliadis (RV), aprovado pela International Organization for Standardization (ISO), muitas vezes usado como alternativa ao TT. Esta etapa promove o crescimento preferencial de colônias de *Salmonella* com características típicas que as distinguem dos competidores, para posterior confirmação bioquímica e sorológica. O período de incubação varia de 18 a 24 horas a 41-42°C (SILVA & JUNQUEIRA, 1995).

O isolamento bacteriano deve ser feito através de plaqueamento em meios sólidos, sendo recomendado a utilização de mais de um meio de cultura. O Ministério da Agricultura recomenda os meios MacConkey, Ágar Verde Brillante com novobiocina (BGN), Ágar Hektoen, Ágar

Rambach e ainda o ágar XLT4. A incubação desses meios a 37°C por 24 horas proporciona um aumento significativo da recuperação de salmonelas.

Colônias suspeitas de *Salmonella*, que cresceram no meio sólido, são selecionadas e submetidas a provas bioquímicas e sorológicas. A identificação sorológica do gênero *Salmonella* pode ser feita com antisoros somáticos polivalentes O (BACK, 2002).

A diferença básica entre os meios sólidos são substâncias cromogênicas que permitem desdobramentos com mudança de cor nos subprodutos utilizados e diferentes substratos como fontes para as reações bioquímicas (ALLEN *et al.*, 1991). A característica de cor das colônias esperada para as salmonelas em meio MacConkey são colônias incolores, no Hektoen são verde azuladas com ou sem centro escuro; no verde brilhante aparecerão rosadas.

O ágar Rambach é outro meio seletivo utilizado na diferenciação de espécies de *Salmonella* não tíficas de outras bactérias da família *Enterobacteriaceae*. Este meio se baseia na habilidade de muitas *Salmonellas* produzirem ácido a partir do propilenoglicol, o que proporciona o aparecimento de cor vermelha nas colônias de salmonelas (GARRICK & SMITH, 1994).

Neste meio, enquanto as colônias de salmonelas aparecem vermelhas brilhantes, coliformes aparecem azuis, verdes ou violetas. Uma vez que as características bioquímicas utilizadas no ágar Rambach são altamente específicas para as salmonelas não tíficas, somente poucos resultados falso positivos são esperados (DUSCH & ALTWEGG, 1993).

As provas bioquímicas são realizadas em tubos, onde células de uma única colônia são inoculadas em cada tubo, e as provas são lidas às 24 horas e algumas vezes também às 48 horas após a inoculação (FARMER III, 1995).

Em meio TSI (ferro tríplice açúcar) a produção de ácido sulfúrico (H₂S) é positiva, provocando coloração negra no fundo do tubo. Não produzem indol. O citrato é normalmente utilizado como fonte de carbono. A descarboxilação da lisina e da ornitina são reações quase sempre positivas. A urease, fenilalanina e triptofânio são negativos. Não produz lipase e desoxiribonuclease (JAWETZ *et al.*, 1991; HOLT *et al.*, 1994; OLIVEIRA, 2000; CAMPOS, 2002).

A produção de H₂S é baseada na capacidade da bactéria para liberar enxofre a partir de aminoácidos e outros compostos que os contenham. Na forma de gás H₂S, e se constitui em importante característica para sua identificação (KONEMAN *et al.*, 1992). A urease é uma enzima que degrada uréia produzindo duas moléculas de amônia e, para detectar essa produção, é utilizado o caldo de uréia altamente tamponado com sais de fosfato. Quando há uma quantidade suficiente de amônia para elevar o pH do meio, ocorre mudança na cor do indicador (no caso vermelho de fenol). Como as salmonelas não produzem urease, o meio permanece na mesma cor amarelo-alaranjado.

A motilidade é importante para a identificação final de uma espécie e para sua avaliação utilizam-se meios com ágar semi-sólido. Interpreta-se através de um exame macroscópico do meio, observando uma zona de desenvolvimento difuso a partir da linha de inoculação.

A produção de indol se dá através da desaminação do aminoácido triptofano. No resultado positivo a presença do indol no meio é revelada pela adição do reativo de Kovacs (paradimetilaminobenzaldeído) que se liga ao indol produzindo um composto que é evidenciado pela formação de um anel de cor vermelha na camada superficial do meio. Como o gênero *Salmonella* não produz esta enzima, não é observada nenhuma reação após a adição do reativo de Kovacs (RIBEIRO & SOARES, 1993).

2.3 *Staphylococcus sp.*

O gênero *Staphylococcus* é o principal embro da Família *Micrococcaceae*, e apresenta aproximadamente 29 espécies. Destas, apenas 3 a 4 espécies apresentam potencial patogênico para as aves comerciais e silvestres, sendo a espécie mais importante e patogênica, *Staphylococcus aureus* (FERREIRA & FERREIRA, 2000).

Os *Staphylococcus* são cocos gram-positivos, imóveis, não formam esporos e são catalase-positivos, que tendem a formar agrupamentos semelhantes a cachos de uva (MARTINS, 2002). Entretanto, culturas envelhecidas podem tornar-se gram-negativas devido à presença de autolisinas que destroem a superfície celular (FERREIRA & FERREIRA 2000).

As espécies de *Staphylococcus* são facilmente isoladas em meios de cultura em aerobiose ou microaerofilia, contendo 5 a 8% de sangue de carneiro ou coelho, podendo apresentar atividade hemolítica, dependendo da origem do sangue (FERREIRA & FERREIRA, 2000). Nesse meio, crescem bem a 37°C e dentro de 18 a 24 horas formam colônias circulares com 1 a 3 mm de diâmetro, de bordos regulares, pigmentadas de branco ou amarelo (OLIVEIRA, 2000).

No meio de cultura ágar Baird-Parker, as colônias crescem negras, lustrosas, convexas, 1 a 2mm de diâmetro, rodeados por halo claro de 2 a 5 mm de largura. A formação de colônias negras circundadas por um halo é devido à redução do telurito à telúrio, e a lipólise e proteólise da gema, respectivamente (SIQUEIRA, 1995).

O teste de catalase diferencia *Staphylococcus* de *Streptococcus*. A catalase é uma enzima que quebra o peróxido de hidrogênio em água e

oxigênio com formação de bolhas por desprendimento de oxigênio (BARTELT, 2000).

BARTELT (2000) também cita o teste da coagulase, enzima que converte o fibrinogênio em fibrina. O reagente para detecção da enzima é o plasma. Conforme STROHL *et al.* (2003), quase todos os isolados de *Staphylococcus aureus* secretam coagulase e de acordo com FERREIRA & FERREIRA (2000) este fator aumenta a virulência e auxilia no diagnóstico.

Ainda, segundo FERREIRA & FERREIRA (2000), muitas amostras de *S. aureus* produzem fibrinolisinase ou estafiloquinase que podem ser confundidas com amostras coagulase-negativa devido a capacidade de hidrolisar o fibrinogênio.

Outro meio seletivo e diferencial usado por alguns laboratórios para isolamento de *Staphylococcus* é o ágar sal manitol, que, devido à alta concentração de sal (7,5%) inibe mais gram-negativos e muitos organismos gram-positivos. Quando o manitol é fermentado e produz ácido, o indicador de pH muda de vermelho para amarelo (BARTELT, 2000).

SIQUEIRA (1995) cita ainda o ágar Vogel-Johnson e ágar Chapman como meios utilizados para isolamento e identificação de colônias de *Staphylococcus*, especialmente *S. aureus*.

De acordo com MARTINS (2002), os *Staphylococcus* são amplamente distribuídos na natureza e fazem parte da microbiota normal da pele e mucosas de mamíferos e aves. São relativamente resistentes ao calor e à dessecação, podendo, portanto, persistir por longos períodos em fômites, que podem servir como fonte de infecção (STROHL *et al.*, 2003).

A produção de enterotoxinas, toxinas capazes de causar gastroenterites ou enterites, ocorre entre amostras de *S. aureus*, tendo sido

identificadas e caracterizadas biológica e imunologicamente cinco tipos de enterotoxinas denominadas de A, B, C, D e E (FERREIRA & FERREIRA, 2000).

Na epidemiologia do *Staphylococcus aureus*, o homem e animais representam seus principais reservatórios (FRANCO & LANDGRAF, 1996). A presença nas mãos e em outras superfícies isentas de lesões, resulta da disseminação por contato com áreas de habitat natural do microrganismo (PEREIRA *et al.*, 1999).

A presença de *Staphylococcus* em número de células compatível com a produção de enterotoxinas pode ocasionar quadro clínico de intoxicação alimentar (ICMSF, 1998) indicando um risco potencial a Saúde Pública, além de sugerir condições inadequadas de manipulação, limpeza e desinfecção (FRANCO & ALMEIDA, 1992).

As intoxicações alimentares estafilocócicas são de distribuição mundial. Em alguns países essa enfermidade é de grande importância. Por ser uma doença leve e autolimitante, a maioria dos casos esporádicos não é registrada (HAYES, 1993).

Em animais, *S. aureus* está associado a lesões purulentas da pele que, ocasionalmente, podem tornar-se disseminadas (JONES *et al.*, 2000). Em aves comerciais *Staphylococcus*, incluindo *Staphylococcus aureus* é causa de diversas enfermidades, desde uma septicemia aguda à osteomielite (SKEELES, 1997). Como as aves podem ser reservatórios dessa bactéria, estas podem representar um potencial significativo nos surtos de intoxicações por *S. aureus* enterotoxigênicos (FERREIRA & FERREIRA, 2000).

Cepas de *S. aureus* produtores de enterotoxinas, as quais contaminam carcaças de aves no seu processamento, tem sua origem tanto dos equipamentos contaminados como das pessoas da linha de produção.

Na produção de perus, essa associação foi feita entre fígados verde-descoloridos e *Staphylococcus* interno, ou outras infecções bacterianas (SKEELES, 1997).

Infecções estafilocócicas mais freqüentes em frangos são causadas por *S. aureus* e os lugares mais freqüentes são ossos, bainhas tendíneas, e articulações da perna. Estas ocorrem menos freqüentemente em outros locais como a pele, bolsa esternal, coração, vértebras, pálpebra, fígado e pulmões, nestes dois últimos sob a forma de granulomas (SKEELES, 1997).

AWAN & MATSUMOTO (1998), investigando a heterogeneidade de *Staphylococcus* e outras bactérias isoladas de frangos de corte com seis semanas de idade observaram que entre os 132 isolados bacterianos, 60% tratavam-se de *Staphylococcus*, dos quais 77 apresentavam-se negativos ao teste de coagulase. Segundo os autores, entre os 79 isolados de *Staphylococcus*, 30 foram obtidos dos fígados das aves e os 49 restantes, da articulação do joelho e sangue.

Em perus as taxas de colonização variam acentuadamente. Alguns plantéis não apresentam *S. aureus* detectável; em outros, aproximadamente 30% das aves apresentam fígados e articulações dos jarretes infectados. Quase todas as galinhas poedeiras são colonizadas por volta de 50 semanas de idade (FRASER, 1997).

Conforme FERREIRA & FERREIRA (2000), as infecções em aves são causadas em sua maioria por *S. aureus* e têm sido associadas a várias patologias como: osteomielite, salpingite, ooforite, onfalite, artrite, septicemia, conjuntivite, blefarite, foliculite, bursite, dermatite gangrenosa e celulite. A estafilococose nas galinhas pode, em alguns casos, ser secundária a uma infecção reoviral (FRASER, 1997).

Dependendo da virulência do agente, idade dos animais e fatores que diminuem a resistência, a infecção aparece sob a forma de distintos quadros. Deve-se levar em consideração, junto a septicemias e artrite, a infecção umbilical dos pintos e as dermatites vesiculares, acompanhadas, mais freqüentemente, de processos flegmonosos (SCHULZ, 1988). A colonização do fígado, baço e fluido sinovial resulta de um alastramento sistêmico, mas não leva necessariamente a uma doença clínica (FRASER, 1997). As lesões presentes em infecções sistêmicas consistem em necrose e congestão nos órgãos internos como baço, fígado, rins e pulmão (FERREIRA & FERREIRA, 2000).

O fígado apresenta-se tumefeito, congesto e esverdeado (FRASER, 1997). O órgão pode apresentar pontos esbranquiçados de tamanhos variados, desde 1 a 4 mm com hepatomegalia e necrose focal. Esses mesmos focos necróticos também podem ser encontrados no tecido esplênico (FERREIRA & FERREIRA 2000).

Segundo SKEELES (1997), carcaças com lesões das quais *Staphylococcus* ou outras bactérias são isoladas também têm descoloração no fígado, mas freqüentemente perus com esse fígado não têm demonstrado osteomielite ou lesões associadas, ou se presente, a bactéria não pode ser isolada das lesões. O autor acrescenta que em pesquisa realizada, quando dois lotes com história de alta condenação de fígados foram examinados, a maioria dos fígados afetados não demonstrou bactéria aeróbia ou facultativamente anaeróbia. Entretanto, *Staphylococcus cohnii* e outros *Staphylococcus* foram isolados com mais freqüência das poucas culturas de fígado positivas.

De acordo com JENSEN *et al.* (1987) pulmões e fígados de perus foram colonizados com *S. aureus* virulento após exposição experimental por aerossóis. Traquéias, fígados e articulações da perna de alguns perus

em idade de abate foram naturalmente colonizados com *S.aureus* e várias espécies de *Staphylococcus* coagulase negativos.

Avaliação histológica de fígados verdes, de aves com osteomielite, realizada por BAYYARI *et al.* (1994), revelou hiperplasia do ducto biliar, dilatação dos sinusóides e pigmentação nas células de Kupffer, alguns dos quais apresentaram reação positiva para o ferro.

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 Procedência das amostras

Nos meses de agosto, setembro e outubro de 2004, foram coletadas 100 amostras de fígados de frangos (*Gallus gallus*), das quais 90 fígados apresentavam alterações macroscópicas, sendo os mesmos condenados, e 10 amostras sem alterações macroscópicas, portanto, fígados que seriam liberados para o consumo. As coletas foram feitas em dois abatedouros de frangos localizados no Estado do Rio Grande do Sul. Estes trabalham sob o Serviço de Inspeção Federal, um deles abatendo 120.000 frangos/dia e o outro com um abate superior a 300.000 frangos/dia.

3.2 Coleta das amostras

Cada amostra foi constituída de um único fígado de frango, com ou sem vesícula biliar, coletado na linha de inspeção com o auxílio do Médico Veterinário encarregado do Serviço de Inspeção Federal. Uma vez coletadas, as amostras eram armazenadas individualmente em recipientes plásticos estéreis, era adicionada a numeração do lote de frangos à que pertenciam e mantidas sob refrigeração em caixa térmica com gelo reciclável.

3.3 Envio das amostras para o LCDPA

As amostras eram mantidas sob refrigeração por um período não superior a 36 horas (tempo decorrido entre a coleta e a chegada no laboratório), onde foram realizadas as análises bacteriológicas e a avaliação macroscópica. No laboratório, porções de cada amostra foram colocadas em frascos com formol a 10% e enviadas ao Laboratório de Patologia Veterinária da UFSM para realização dos exames histopatológicos.

3.4 Avaliação macroscópica das amostras

No laboratório as amostras eram retiradas dos potes estéreis, recebiam uma numeração seqüencial, e então avaliadas a fim de observar-se as alterações macroscópicas das mesmas. Os parâmetros considerados foram a forma, coloração, tamanho, consistência, odor e a presença ou não de lesões visíveis. Após, as mesmas eram fotografadas.

3.5 Avaliação bacteriológica para *Salmonella* sp.

De cada fígado foram retiradas amostras de 2,5g de tecido, sendo processadas conforme a metodologia para pesquisa de *Salmonella* sp. de SIQUEIRA (1995), compreendendo as etapas de pré-enriquecimento, enriquecimento seletivo, plaqueamento em meios sólidos e identificação bioquímica, conforme pode ser visto na Figura 1. A pesquisa de *Salmonella* sp. foi realizada em todas as amostras coletadas (100).

3.5.1 Pré-enriquecimento das amostras

Cada amostra de 2,5g, devidamente identificada, foi macerada e semeada em 22,5 mL de água peptonada 1% para o pré-enriquecimento, e incubada em estufa bacteriológica a 37°C durante 24 horas.

3.5.2 Enriquecimento seletivo

Para realização do enriquecimento das amostras, foram utilizados dois caldos seletivos: caldo Tetrionato e caldo Rappaport-Vassiliadis. Foram retirados com auxílio de pipeta estéril, 2 mL da água peptonada das amostras e inoculados em tubos de ensaio contendo 18 mL dos caldos de enriquecimento acima citados. O material foi incubado em estufa bacteriológica a 42°C durante 24 horas.

3.5.3 Plaqueamento seletivo

Após o enriquecimento, com o auxílio de uma alça de platina, as amostras de cada um dos meios de enriquecimento foram semeadas em placas de Petri contendo meios sólidos seletivos. No processo foram utilizados ágar MacConkey e ágar Rambach. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C durante 24 horas.

3.5.4 Identificação bioquímica

Transcorrido o tempo de incubação do plaqueamento seletivo, colônias suspeitas de *Salmonella* sp., as quais eram identificadas conforme a apresentação nos meios sólidos MacConkey e Rambach, neste último primordialmente pela coloração vermelho brilhante das colônias, foram transferidas com o auxílio de agulha de platina para os meios bioquímicos.

Fazendo-se estrias no bisel e inoculação em profundidade nos meios, as colônias suspeitas de *Salmonella* sp. foram semeadas em: ágar três açúcares e ferro (TSI), ágar lisina-ferro (LIA), meio SIM (*Sulphide Indol Motility*), caldo uréia (prova hidrólise da uréia), meio vermelho de metila (VM), Voges-Proskauer (VP) e citrato de Simmons.

Os meios foram incubados em estufa bacteriológica a 37°C durante 24-48 horas. Após isto foram realizadas leitura e interpretação das provas bioquímicas de acordo com QUINN *et al.* (1994). Nas colônias suspeitas de *Salmonella* sp. foram realizadas provas sorológicas com antisoro somático polivalente O.

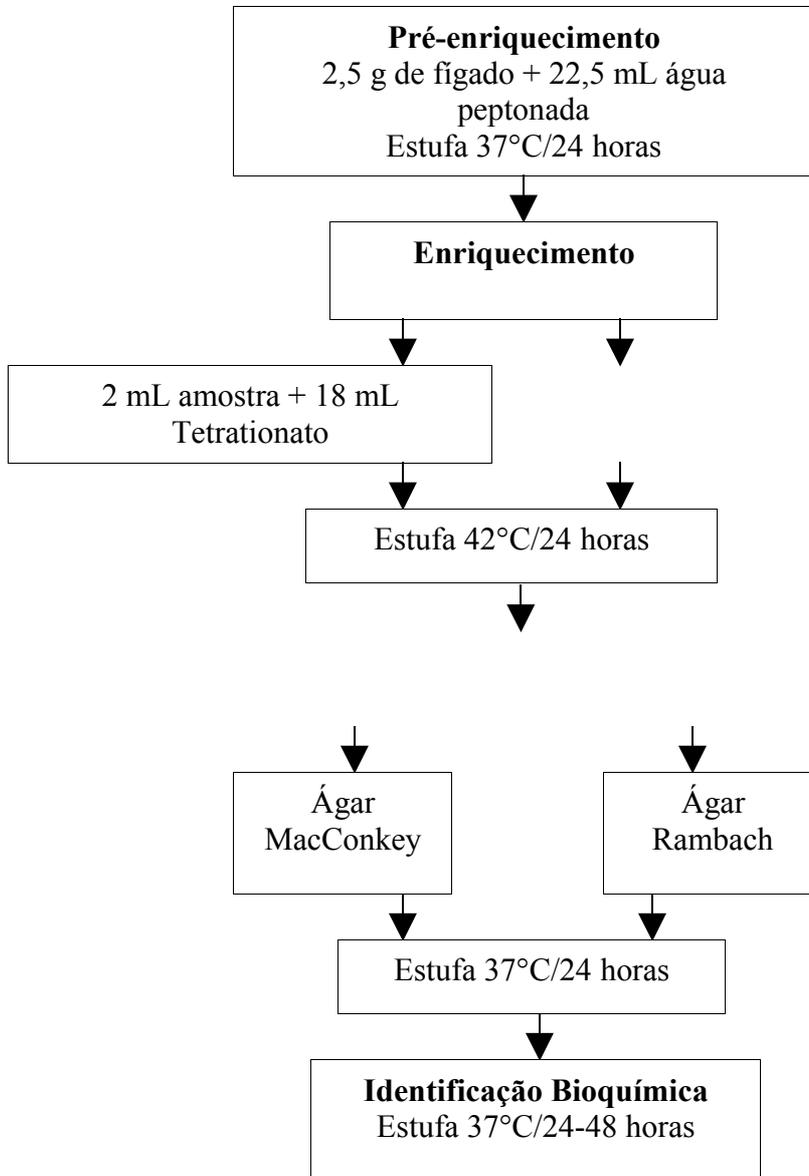


FIGURA 1 – Esquema de pesquisa de *Salmonella* sp. em fígados de frangos (*Gallus gallus*), modificado de SIQUEIRA (1995).

3.6 Avaliação bacteriológica para *Escherichia coli* e *Staphylococcus sp.*

Para a avaliação bacteriológica de *E. coli* e *Staphylococcus sp.* a superfície dos fígados, já devidamente identificados, foi flambada com espátula incandescente e, posteriormente, uma alça de platina foi inserida no local flambado e na seqüência estriada em meios de cultura. Para a pesquisa de *E. coli* as amostras foram semeadas em ágar sangue e ágar MacConkey e incubadas em posição invertida em estufa bacteriológica a 37°C durante 24-48 horas. Para pesquisa de *Staphylococcus sp.* as amostras foram semeadas em ágar Baird-Parker e ágar sangue e da mesma forma incubadas em posição invertida em estufa bacteriológica a 37°C durante 24-48 horas. A análise bacteriológica para *E. coli* e *Staphylococcus sp.* foi realizada em todas as amostras coletadas (100).

3.6.1 Determinação de *Staphylococcus sp.*

A partir de unidades formadoras de colônias (UFCs) negras, com ou sem halo branco opaco rodeado por halo claro transparente no meio Baird-Parker, foi preparado um esfregaço em lâminas de vidro para microscopia, fixados ao calor da chama do bico de Bunsen e em seguida efetuada a coloração pelo método de Gram a fim de verificar a presença de cocos gram-positivos.

Após verificação das características morfotintoriais pelo Gram, presença de cocos gram-positivos, procedeu-se, a partir das UFCs, a realização do teste de catalase, conforme OLIVEIRA (2000).

3.6.2 Determinação de *E. coli*

Colônias de bactérias gram-negativas, lisas e brilhantes em ágar sangue, e rosas-avermelhada em meio MacConkey foram consideradas suspeitas de *E. coli*. Para identificação bioquímica, uma colônia característica foi semeada nos tubos com os meios TSI, Citrato, Urease, SIM e LIA, incubados em estufa bacteriológica a 37°C durante 24-48 horas. Após isto foram realizadas, leitura e interpretação das provas bioquímicas de acordo com QUINN *et al.* (1994).

3.7 Avaliação histopatológica

As 100 amostras de fígado coletadas, das quais 90 apresentavam alterações macroscópicas e 10 sem alterações macroscópicas, foram fixadas em formol a 10% e processadas rotineiramente para histopatologia. Duas seções histológicas por amostra de fígado foram examinadas sob microscopia de luz. Esta avaliação foi feita sem o conhecimento prévio dos resultados bacteriológicos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação macroscópica

De acordo com os critérios de avaliação de fígados de aves estabelecidos pela Portaria nº 210 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento de 10 de novembro de 1998, que determina na inspeção do fígado de aves a avaliação do aspecto visual (cor, forma e tamanho); consistência e odor, foi considerado neste trabalho a cor do órgão como sendo o principal parâmetro para caracterização das lesões macroscópicas responsáveis pela condenação de fígados de aves pelo Serviço de Inspeção de Produtos de Origem Animal.

Por conseguinte, o resultado das alterações macroscópicas observadas em cada amostra, individualmente, estão ordenados em quadros (1 a 5), que ilustram as alterações macroscópicas visualizadas em fígados marrom-pálidos, verdes ou esverdeados, amarelos ou amarelados, e fígados cuja principal alteração não reside exclusivamente na cor do órgão, e sim em um conjunto de alterações envolvendo a cor, forma, tamanho e/ou consistência.

PRINCIPAL ALTERAÇÃO	AMOSTRAS	ALTERAÇÕES MACROSCÓPICAS OBSERVADAS						
		Áreas claras	Aumento de volume	Consistência firme	Engrossamento de bordas	Pontos brancos	Pontos verdes	Superfície irregular
ALTERAÇÃO NA COR, FORMA, TAMANHO E/OU CONSISTÊNCIA	05				X		X	
	06		X			X		
	07		X			X		
	10		X	X				
	11	X						
	12	X	X					
	13		X			X		
	14		X					
	16							
	18					X		X
	19			X			X	
	20			X				
	27	X	X					
	28		X				X	
	31		X				X	
	33	X				X		
	36	X						
	38							
	49						X	
	53			X				
	55			X		X	X	
	56			X		X	X	
	57			X			X	X
	59					X	X	
	63				X		X	
	65							
	67					X		
68						X		
69	X				X	X		
70						X		
TOTAL	30	06	15	02	08	15	02	01

No quadro 1 observa-se que fígados que apresentavam alterações na cor, forma, tamanho e/ou consistência com outras alterações

macroscópicas perfizeram 33,33% dos fígados condenados (30/90) e as demais alterações macroscópicas observadas em maior frequência neste tipo de fígado foram: áreas claras (6/30), engrossamento de bordas (8/30), pontos brancos (15/30) e engrossamento de bordas (15/30).

QUADRO 2 – Fígados de frangos (*Gallus gallus*) condenados pelo Serviço de Inspeção Sanitária de Produtos de Origem Animal, com alteração na cor, forma, tamanho e/ou consistência (continuação).

Associando-se os resultados demonstrados no quadro anterior aos resultados do quadro 1 observa-se que fígados cuja alteração residia na

		ALTERAÇÕES MACROSCÓPICAS OBSERVADAS						
PRINCIPAL ALTERAÇÃO	AMOSTRAS	Áreas claras	Aumento de volume	Consistência friável	Engrossamento de bordas	Pontos brancos	Pontos vermelhos e/ou áreas vermelhas	Superfície irregular
ALTERAÇÃO NA COR, FORMA, TAMANHO E/OU CONSISTÊNCIA	71					X		
	72					X	X	
	74					X	X	
	75						X	
	78			X		X		
	80	X	X	X			X	
	81						X	
	82	X						
	85						X	
	88					X		
	89			X			X	
	91	X					X	
	92					X		
	93					X	X	
	97					X		
99			X		X	X	X	
100							X	
TOTAL	17	03	03	02	01	09	10	01

cor, forma, tamanho e/ou consistência e com outras alterações

macroscópicas perfizeram um total de 52,22% dos fígados condenados (47/90). Ainda extrai-se dos quadros 1 e 2 que as alterações macroscópicas visualizadas com maior freqüência neste tipo de fígado foram: engrossamento de bordas (9/47), aumento de volume do órgão (18/47) e presença de pontos brancos (24/47);

		OUTRAS ALTERAÇÕES MACROSCÓPICAS ASSOCIADAS					
PRINCIPAL ALTERAÇÃO	AMOSTRAS	Áreas claras	Aderências	Aumento de volume	Consistência friável	Engrossamento de bordas	Pontos brancos
FÍGADOS MARROM-PÁLIDOS	02	X					
	04					X	
	22					X	
	29				X	X	
	30	X				X	
	32					X	
	34			X		X	
	37						
	52	X					
	54			X		X	X
	58	X					
	64			X			X
	66					X	X
	76						X
	77	X					
	86	X					
	87						X
94							
98						X	
TOTAL	19	06	01	02	02	08	05

		OUTRAS ALTERAÇÕES MACROSCÓPICAS ASSOCIADAS					
FÍGADOS AMARELOS OU AMARELADOS							

QUADRO 3 – Fígados de frangos (*Gallus gallus*) amarelos ou amarelados e com outras alterações macroscópicas associadas, condenados pelo Serviço de Inspeção Sanitária de Produtos de Origem Animal.

Do quadro 3 infere-se que fígados amarelos ou amarelados perfizeram apenas 5,55% dos fígados condenados (5/90) e que, pelo pequeno número de amostras com esta alteração na coloração, da mesma forma a quantidade das demais alterações macroscópicas associadas apresenta-se pouco expressiva.

QUADRO 4 – Fígados de frangos (*Gallus gallus*) marrom-pálidos e com outras alterações macroscópicas associadas, condenados pelo Serviço de Inspeção Sanitária de Produtos de Origem Animal.

Observa-se no quadro 4 que fígados marrom-pálidos perfizeram 21,11% ou 19/90 amostras analisadas e as demais alterações macroscópicas em maior frequência nestes tipos de fígados foram: pontos brancos (5/19), áreas claras (6/19) e engrossamento de bordas (8/19).

QUADRO 5 – Fígados de frangos (*Gallus gallus*) verdes ou esverdeados e com outras alterações macroscópicas associadas, condenados pelo Serviço de Inspeção Sanitária de Produtos de Origem Animal.

		OUTRAS ALTERAÇÕES MACROSCÓPICAS ASSOCIADAS							
PRINCIPAL ALTERAÇÃO	AMOSTRAS	Ade- rência	Áreas claras	Au- men- to de volu- me	Con- sistê- ncia firm- e	Con- sistê- ncia friáv- el	Engr- ossa- men- to de bord- as	Pont- os bran- cos	Tam- anho men- or que o nor- mal
FÍGADOS VERDES OU ESVERDEADOS	01			X				X	
	03								
	08						X		
	17		X				X		
	21			X			X		
	23								
	26							X	
	35			X				X	
	39						X		
	45						X		
	46								
	47								
	48								
	50					X		X	X
	51								
	61								X
	73								X
	83								
	90	X							
TOTAL	19	01	01	03	01	02	04	05	01

Analisando-se o quadro 5 pode-se inferir que fígados verdes ou esverdeados perfizeram 21,11% dos fígados condenados (19/90) e que as demais alterações macroscópicas em maior frequência neste tipo de fígado foram: aumento de volume (3/19), engrossamento de bordas (4/19) e pontos brancos (5/19).

Analisando-se em conjunto os quadros 1, 2, 3, 4 e 5 é possível observar que, independentemente da principal alteração nas amostras examinadas, as alterações macroscópicas vistas com maior frequência, no total de fígados condenados, foram a presença de pontos brancos, aumento de volume do órgão, áreas claras e engrossamento de bordas.

BORDIN (1978) explica que essas alterações têm etiologias variadas. Pontos brancos e/ou áreas claras podem sugerir infecção bacteriana, parasitária ou ter etiologia tóxica e usualmente a causa é confirmada pela bacteriologia e histopatologia. O autor acrescenta que em geral os processos septicêmicos que comumente acometem os frangos determinam graus variáveis de comprometimento hepático, semelhantes muitas vezes em suas manifestações, de modo que tão somente pela observação macroscópica do órgão se torna difícil individualizar a doença específica, necessitando-se exames complementares.

Neste trabalho as alterações macroscópicas evidenciadas nos fígados analisados variaram significativamente, observados os critérios de condenação utilizados pelo Serviço de Inspeção de Produtos de Origem Animal, de acordo com a Portaria nº 210 de 10 de novembro de 1998 do Ministério da Agricultura.

Dessa forma, procurou-se exemplificar através de ilustrações os aspectos macroscópicos (figuras 2 a 8) mais tipicamente relacionados aos diagnósticos morfológicos obtidos pela histopatologia e, embasado nestes últimos, foram atribuídas possíveis etiologias para as lesões, procurando-se, quando possível, relacioná-las aos achados bacteriológicos como demonstrado no quadro 6.

4.2 Avaliação histopatológica e bacteriológica

QUADRO 6 – Resultados das análises histopatológica e bacteriológica em fígados de frango (*Gallus gallus*) condenados pelo Serviço de Inspeção Sanitária de Produtos de Origem Animal.

ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA			ANÁLISE BACTERIOLÓGICA	
DIAGNÓSTICO MORFOLÓGICO	AMOSTRAS	COMENTÁRIO	<i>Escherichia Coli</i>	<i>Staphylococcus sp.</i>
Colângio-hepatite heterofílica multifocal	67, 68, 69, 70, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 81, 87, 89, 91, 93, 94, 96, 97, 98 e 99	Sugestivo de infecção subaguda a crônica por <i>Clostridium perfringens</i>	67, 70, 73, 74, 75, 76, 78, 91 e 94	67
Degeneração e/ou necrose hepatocelular centrolobular e em ponte	10, 16, 18, 32, 34 e 38	Sugestivo de lesão secundária à hipóxia	32	32 e 34
Hepatite necrosante aleatória	01, 06, 13, 14, 19, 20, 21, 26, 28, 31, 35, 49, 51, 54, 55, 57, 59, 61, 63, 64, 71, 82, 83, 88 e 90	Sugestivo de hepatite bacteriana	01, 21, 49, 61, 64 e 71	01, 13, 14, 21 e 49
Hepatite necrosante aleatória com bactérias basofílicas intralesionais	7 e 36	Sugestivo de infecção por <i>S. aureus</i>	36	36
Hepatite necrosante aleatória com microtrombose sinusoidal	4, 9, 29, 39, 46, 47, 53, 56 e 58	Sugestivo de infecção aguda por <i>Escherichia coli</i>	09, 39 e 56	09 e 39
Pericolangite heterofílica multifocal	3, 5, 30, 45, 50, 80, 85, 86 e 92	Sugestivo de infecção aguda por <i>Clostridium perfringens</i>	85 e 92	03, 30, 80, 85 e 86
Peri-hepatite fibrinosa subaguda difusa acentuada	22 e 24	Sugestivo de infecção por <i>E.coli</i> (colisepticemia)	-	24
Outras alterações	2, 8, 11, 15, 17, 23, 25, 27, 33, 37, 48, 52, 65 e 66	Inespecíficas	27 e 65	15, 17, 65 e 66
Sem alterações	12*, 40, 41, 42, 43, 44, 60, 62, 79, 84, 95 e 100*	Sem alterações *Com alt. macroscópica	44 e 95	44, 84 e 95

Observa-se no quadro 6 que em 21 amostras de um total de 100 analisadas microscopicamente, obteve-se diagnóstico morfológico de colângio-hepatite heterofílica multifocal (figura 2). Nesses fígados havia lesões com severidade leve, moderada ou acentuada; infiltrados de heterófilos (ou, em menor número, infiltrados mistos com linfócitos e macrófagos) periportais, intraductais e estendendo-se ao parênquima hepático; hiperplasia de ductos biliares, lesões estas também relatadas por RANDALL & REECE (1996) e LOVLAND & KALDSHUSDAL (1999); bilestase ductal freqüente; fibrose periportal como descrito por BACK (2002); granulomas heterofílicos, achado citado por LOVLAND & KALDSHUSDAL (1999) e necrose multifocal com fibrina em algumas amostras.

Em 9/100 das amostras analisadas pela histopatologia constatou-se pericolangite heterofílica multifocal (figura 3) com achados microscópicos constituídos por infiltrado acentuado periportal de heterófilos, necrose multifocal e hiperplasia de ductos biliares leve a acentuada. Bilestase ductal, degeneração gordurosa e hemorragia multifocal leve foram ocasionalmente vistas.

Ambos diagnósticos morfológicos, colângio-hepatite heterofílica multifocal e pericolangite heterofílica multifocal com os respectivos achados microscópicos são sugestivos de infecção por *Clostridium perfringens*. LOVLAND & KALDHUSDAL (1999) sugerem que um fígado de frango para ser classificado histologicamente como apresentando alterações compatíveis com infecção por *Clostridium perfringens* deve incluir no mínimo uma das seguintes lesões: proliferação de ductos biliares (com grau dois ou maior) e infiltrado inflamatório nas tríades portais; necrose ou granuloma com bastonetes gram-positivos (melhor visualizados

pela coloração de Gram, conforme RANDALL & REECE 1996); necrose periportal e colangite intra-hepática.

Em 30 das 100 amostras analisadas, geralmente mais de uma dessas lesões foi observada, e, portanto, as lesões eram sugestivas de infecção por *Clostridium perfringens*, apesar do agente não ter sido visto intralesionalmente. LOVLAND & KALDHUSDAL (1999) em exames histopatológicos de 45 carcaças de frangos, condenadas pelo serviço de inspeção, que apresentavam lesões hepáticas, observaram alterações consistentes com hepatite associada a *Clostridium perfringens* em 33 amostras de fígados, o que é muito superior ao encontrado neste trabalho.

Embora a bactéria *Clostridium perfringens* não tenha sido objeto de investigação neste trabalho, foi expressivo o seu possível envolvimento nos diagnósticos de hepatite bacteriana nas amostras analisadas, chegando a 30 %. Acrescenta-se que 27 destas amostras foram coletadas no abatedouro com capacidade de abate de 120.000 frangos/dia, com emprego de dieta, manejo e nível técnico diferente daquele com abate superior a 300.000 frangos/ dia.

WAGES & OPENGART (2003) sugerem que a manipulação da dieta e a natureza da ração das aves podem afetar a população intestinal de *Clostridium perfringens*, favorecendo a emergência de enfermidades associadas a essa bactéria em frangos. Os autores acrescentam que a ocorrência de enterite necrótica em frangos pode ser monitorada através do uso de dados de inspeção de carnes em lesões hepáticas, o que precisa ser investigado para a situação atual apresentada neste trabalho onde uma percentagem significativa demonstrou que havia ocorrência de lesões sugestivas de clostridiose no grupo de frangos abatidos durante a coleta.

Em 36/100 amostras obteve-se o diagnóstico morfológico de hepatite necrosante aleatória (figuras 4 e 5) e dentre essas, 2/100 apresentavam ao exame histopatológico aglomerados de bactérias cocóides basofílicas intralesionais (figuras 4B e 4C), com lesão sugestiva de infecção por *Staphylococcus aureus*, achado concordante com RANDALL & REECE (1996) em casos de hepatites associadas a essa bactéria; 9/100 com presença de necrose, geralmente multifocal leve, com fibrina e/ou heterófilos nas áreas necróticas e microtrombose nos sinusóides hepáticos (figura 5B), achados não patognomônicos, mas sugestivos de infecção aguda por *Escherichia coli*.

Os achados histopatológicos são concordantes com NAKAMURA *et al.* (1985), os quais observaram, em casos de colibacilose espontânea, trombos de fibrina sinusoidais com necrose ocasional de células hepáticas e HOERR (1996) que descreveu, nos casos de septicemia aguda por *E. coli*, alargamento dos sinusóides hepáticos, infiltrados heterofílicos, tumefação das células de Kupffer, trombos de fibrina e trombócitos.

Nas 25/100 amostras restantes, igualmente com diagnóstico morfológico de hepatite necrosante aleatória, observou-se lesões microscópicas que incluíam necrose multifocal a coalescente com severidade leve, moderada ou acentuada, com fibrina nas áreas necróticas, presença variável de granulomas heterofílicos (figura 6), com células gigantes multinucleadas, hemorragias multifocais leves ocasionais e bilestase ductal ocasional.

Esse tipo de alteração patológica não pode ser atribuída a nenhuma bactéria específica como responsável pelas lesões, uma vez que as lesões observadas apenas sugeriam tratar-se de infecção associada a bactérias, de

acordo com os achados descritos por RANDALL & REECE (1996) em casos de hepatites bacterianas.

Em 2/100 das amostras obteve-se o diagnóstico morfológico de peri-hepatite fibrinosa (figura 7) subaguda difusa acentuada, compatível com infecção sistêmica por *E. coli*. GOMIS *et al.* (1997) constataram, em trabalho experimental, peri-hepatite em 80% dos frangos inoculados com *E. coli* pela via subcutânea. Microscopicamente, nessas duas amostras, observou-se espessamento do saco hepatoperitonal e da cápsula hepática em consequência de depósitos de fibrina em organização (figura 7B), heterófilos, linfócitos e macrófagos, sugerindo tratar-se de infecção por *E. coli* (colisepticemia). Esses achados histopatológicos são concordantes com RANDALL & REECE (1996), os quais citam que casos de infecção sistêmica por *E. coli* freqüentemente resultam em peri-hepatite e como parte desse processo, inflamação do saco hepatoperitonal pode resultar em exsudato fibrinoso depositado na cápsula hepática.

Em 6/100 amostras observaram-se alterações compatíveis com lesão secundária a hipóxia, com achados microscópicos de lesão aguda (5/100, com degeneração e/ou necrose hepatocelular centrolobular e em ponte), ou lesão crônica (1/100, com dilatação dos sinusóides, atrofia de cordões de hepatócitos e espessamento difuso da cápsula hepática) visualizadas na figura 8. As lesões agudas observadas neste estudo são indicativas de hipóxia, secundária à insuficiência cardíaca direita (RANDALL & REECE, 1996). HOERR (1996) cita que aves que morrem com hipertensão pulmonar, dilatação ventricular direita e ascite, têm fígados diminuídos de tamanho, com cápsula espessada e são firmes ao corte. De acordo com este autor, microscopicamente os sinusóides hepáticos estão dilatados por

material eosinofílico e a cápsula hepática apresenta-se significativamente espessada com tecido edematoso e fibroso.

NAKAMURA *et al.* (1999) observou em fígados de frangos alterações histopatológicas que consistiam de degeneração e necrose dos hepatócitos, e fibrose da cápsula hepática em 64, de 67 casos de ascite em consequência de falência cardíaca, mostrando que as alterações histopatológicas hepáticas podem ser comuns e fundamentais na patogênese deste tipo de patologia. Segundo SHIVAPRASAD & CRESPO (2003), na macroscopia, as alterações observadas nestes fígados são bastante variáveis.

Em 14/100 amostras observaram-se alterações microscópicas inespecíficas que incluíam congestão e hemorragias multifocais (1/100), deposição de glicogênio nos hepatócitos (2/100), necrose hepática multifocal (2/100), bilestase ductal (5/100) e degeneração gordurosa (6/100). A degeneração gordurosa ou lipidose hepática não é, obviamente, uma doença específica, mas pode ocorrer como uma seqüela de uma variedade de perturbações do metabolismo normal (CARLTON & McGAVIN, 1998). Sua causa é desconhecida, entretanto, fatores nutricionais, tóxicos, ambientais e de manejo podem estar envolvidos (SHIVAPRASAD & CRESPO, 2003).

Em relação aos resultados da análise bacteriológica realizada nas amostras de fígados de frangos observa-se no quadro 6 que nas lesões sugestivas de infecção por *Escherichia coli* (11/100), houve isolamento desta bactéria em 3/100 amostras analisadas. Quando comparado com LEITE (1995), nota-se que o número de isolados por este autor foi significativamente maior, chegando ao isolamento de *E. coli* em 29/30 amostras analisadas.

Tal diferença também pode ser vista quanto ao isolamento de *Staphylococcus* onde LEITE (1995) isolou a bactéria *Staphylococcus aureus* em 27/30 amostras analisadas e, neste trabalho, nas amostras com lesões sugestivas de infecção por *Staphylococcus aureus* (2/100), isolou-se *Staphylococcus sp.* em uma amostra, representando, portanto, 50% de isolamento bacteriano. Contudo, deve-se considerar que LEITE (1995) realizou as análises bacteriológicas em fígados de frangos resfriados, a partir de subamostras de 10g de fígado, macerado e pré-enriquecido em água peptonada a 10%, diferentemente da metodologia empregada neste trabalho, no qual as sementeiras em meios seletivos foram feitas a partir de uma alça de platina flambada e inserida internamente no órgão, com a superfície de contato do mesmo também flambada com espátula incandescente, descartando-se, dessa forma, qualquer contaminação externa.

Os achados deste trabalho vão ao encontro de OLIVEIRA (2000), o qual cita que em caso de sementeiras diretas a partir de vísceras, ou seja, sem qualquer forma de enriquecimento da amostra, devem ser consideradas as chances de redução de isolados bacterianos.

Fato que deve ser ponderado e que pode influenciar o número de isolados bacterianos refere-se ao tempo de infecção, pois resultados obtidos por FISCHER, *et al.* (1998) em inoculação experimental de *E. coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pasteurella multocida* em frangos, no intuito de determinar se as septicemias podem ser detectadas em órgãos viscerais de frangos antes do surgimento de alterações musculares esqueléticas, sugerem que não há uma relação linear entre o lapso de tempo de infecção transcorrido e os isolamentos bacterianos. Entretanto os autores sugerem

que em caso de infecção por *E. coli* parece ocorrer uma queda no número de isolados 144 horas pós-infecção.

Mesmo entendimento é dado por SEYED *et. al* (1997), os quais citam que o número de bactérias *E. coli* que colonizam o fígado de frango em casos de septicemia parece não depender do tempo transcorrido após a infecção. Não há, nesses fígados, como determinar quando ocorreu a infecção, uma vez que as aves foram encaminhadas para o abate, cumprindo-se o cronograma do mesmo e eram supostamente saudáveis.

Os autores acrescentam que as diferenças entre os diferentes órgãos com relação à dinâmica da infecção e colonização por *E. coli* pode ser atribuída a fatores de virulência do agente, susceptibilidade do hospedeiro e complexidade da interação deste com a bactéria, o que pode resultar em afinidade específica a órgãos que possuem receptores apropriados para tal.

Em relação aos *Staphylococcus*, entendimento semelhante é fornecido por JENSEN, *et. al* (1987), entretanto, estes autores sugerem um decréscimo nos isolamentos 44 dias pós-infecção experimental em perus. Acrescentam ainda que perus saudáveis foram colonizados com *S. aureus*, sugerindo que a colonização não levaria ao desenvolvimento da doença clínica, fato que pode explicar, em nosso trabalho, o isolamento de *Staphylococcus sp.* em 3 amostras sem alterações macroscópicas e histopatológicas.

Extrai-se ainda do quadro 6 que as bactérias *E. coli* e *Staphylococcus sp.* foram isoladas, respectivamente, em 11/30 e em 6/30 amostras com diagnóstico sugestivo de infecção por *Clostridium perfringens*, evidenciando a possibilidade daquelas bactérias coexistirem em casos de infecção por esta.

Observou-se também que em 6/100 amostras nas quais as lesões microscópicas eram compatíveis com alteração secundária a hipóxia houve isolamento de *E. coli* em 1/100 amostras e *Staphylococcus sp.* em 2/100 amostras, o que supõe que esta condição poderia favorecer a associação de outros agentes patogênicos.

Ainda, em 25/100 amostras com diagnóstico de hepatite necrosante aleatória, cujas lesões eram compatíveis com hepatite bacteriana obteve-se isolamento de *E. coli* em 6/100 amostras e *Staphylococcus sp.* em 5/100 amostras; em 14/100 amostras que apresentavam alterações inespecíficas obteve-se isolamento de *E. coli* em 2/100 amostras e *Staphylococcus sp.* em 4/100 amostras, demonstrando, novamente, que o isolamento direto não foi eficiente.

Por fim pode-se observar que, baseado no diagnóstico morfológico obtido através da histopatologia, 68/100 amostras apresentaram lesões microscópicas sugestivas de etiologia bacteriana, sendo a bactéria *E. coli* isolada em 21/100 amostras e *Staphylococcus sp.* em 15/100 amostras analisadas.

Apesar da presença de lesões macroscópicas e microscópicas sugestivas de infecção bacteriana em 25/100 amostras, não foram observadas lesões microscópicas indicativas de infecção por *Salmonella sp.* As infecções por bactérias do gênero *Salmonella* podem lembrar outras infecções bacterianas agudas, porém apresentam características zonas multifocais a coalescentes de necrose de hepatócitos acompanhadas de inflamação linfocítica. Inflamação linfocítica multifocal permanece como uma seqüela da necrose induzida por *Salmonella sp.*, embora isto não seja específico. *S. Gallinarum*, causadora do tifo aviário, provoca anemia hemolítica extravascular com aumento de volume e coloração bronzeada

do fígado devido à eritrofagocitose e hemossiderose (HOERR, 1996). Aglomerados de bastonetes podem ser observados em seções histológicas de fígados durante a infecção por *Salmonella* Enteritidis (RANDALL & REECE, 1996).

Este resultado vai ao encontro de CARVALHO *et al.* (1994), em estudo realizado na avaliação bacteriológica de miúdos de frangos. Entretanto, FREITAS *et al.* (1986), analisaram amostras de fígados de aves obtidos em abatedouros comerciais e verificaram que, das 15 amostras analisadas, duas apresentaram-se positivas para *Salmonella* sp. OLIVEIRA *et al.* (2004) isolaram salmonelas em nove, de um total de 36 pools de fígados de frango condenados pelo Serviço de Inspeção Federal em um abatedouro do estado de Goiás, sendo em sete, isolamento de *Salmonella* Enteritidis e em dois, *Salmonella* Thyphimurium.

Em virtude do não isolamento de salmonelas neste trabalho, supõe-se sua ausência ou que a presença de outros microorganismos possam ter contribuído para que não se desenvolvessem, pois são fracas competidoras na presença de uma microbiota variada no alimento conforme relatado por ROITMAN *et al.* (1988).

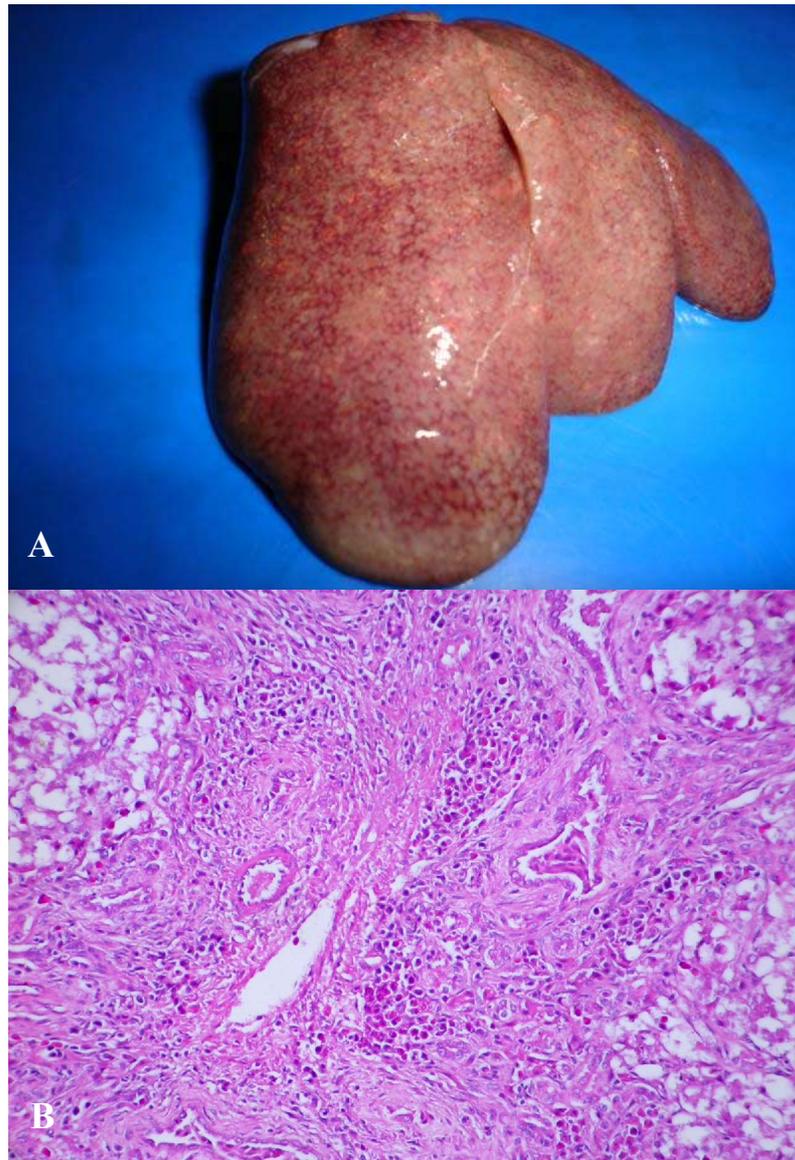


FIGURA 2 - Fígado de *Gallus gallus*. Colângio-hepatite heterofílica multifocal. **A)** Amostra 93. Observa-se acentuação do padrão lobular e aumento de volume com bordas arredondadas. **B)** Amostra 96. Há infiltrado heterofílico (intra e periductal), hiperplasia de ductos biliares e fibrose periportal. Há vacuolização de hepatócitos adjacentes. Hematoxilina-eosina. Obj. 10x.

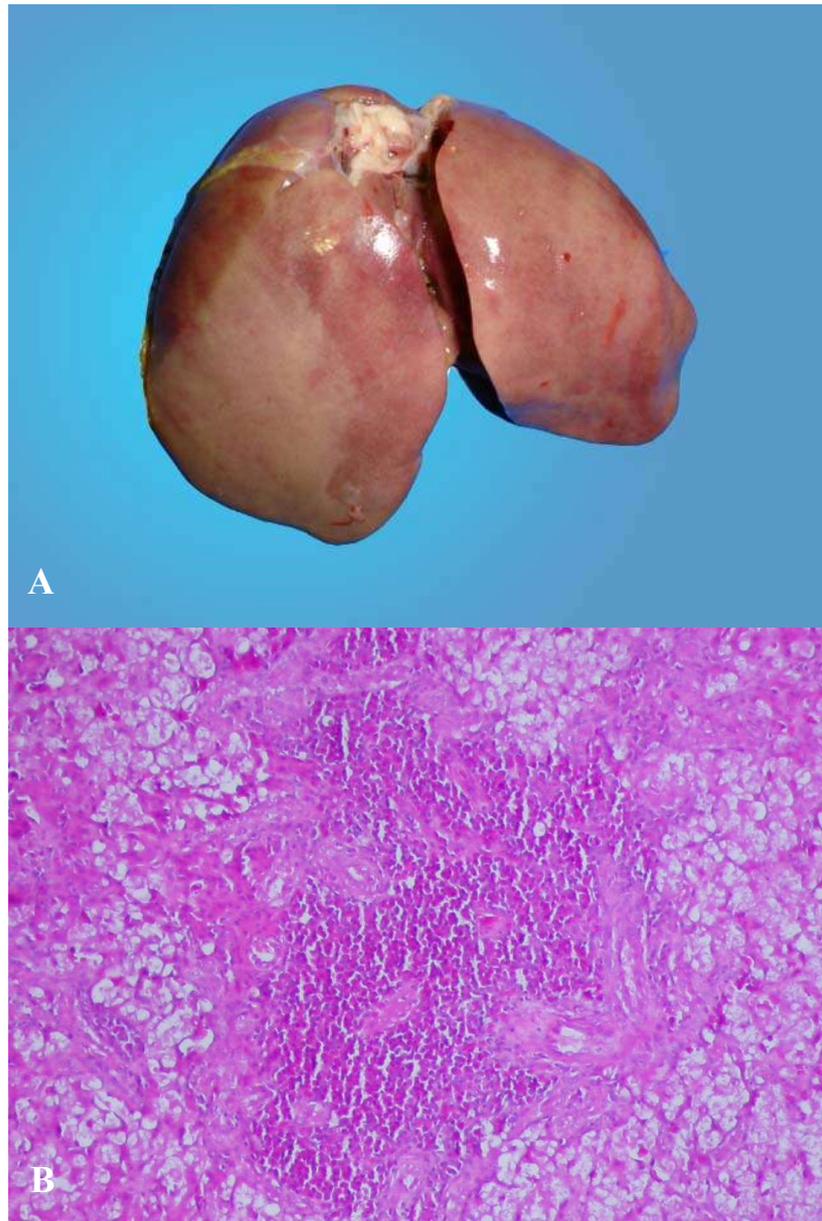


FIGURA 3 – Fígado de *Gallus gallus*. Pericolangite heterofílica multifocal. **A)** Amostra 30. Observa-se coloração marrom-pálida entremeada por áreas avermelhadas. **B)** Amostra 92. Há infiltrado heterofílico periportal, proliferação de ductos biliares e degeneração gordurosa nos hepatócitos adjacentes. Hematoxilina-eosina. Obj. 10x.

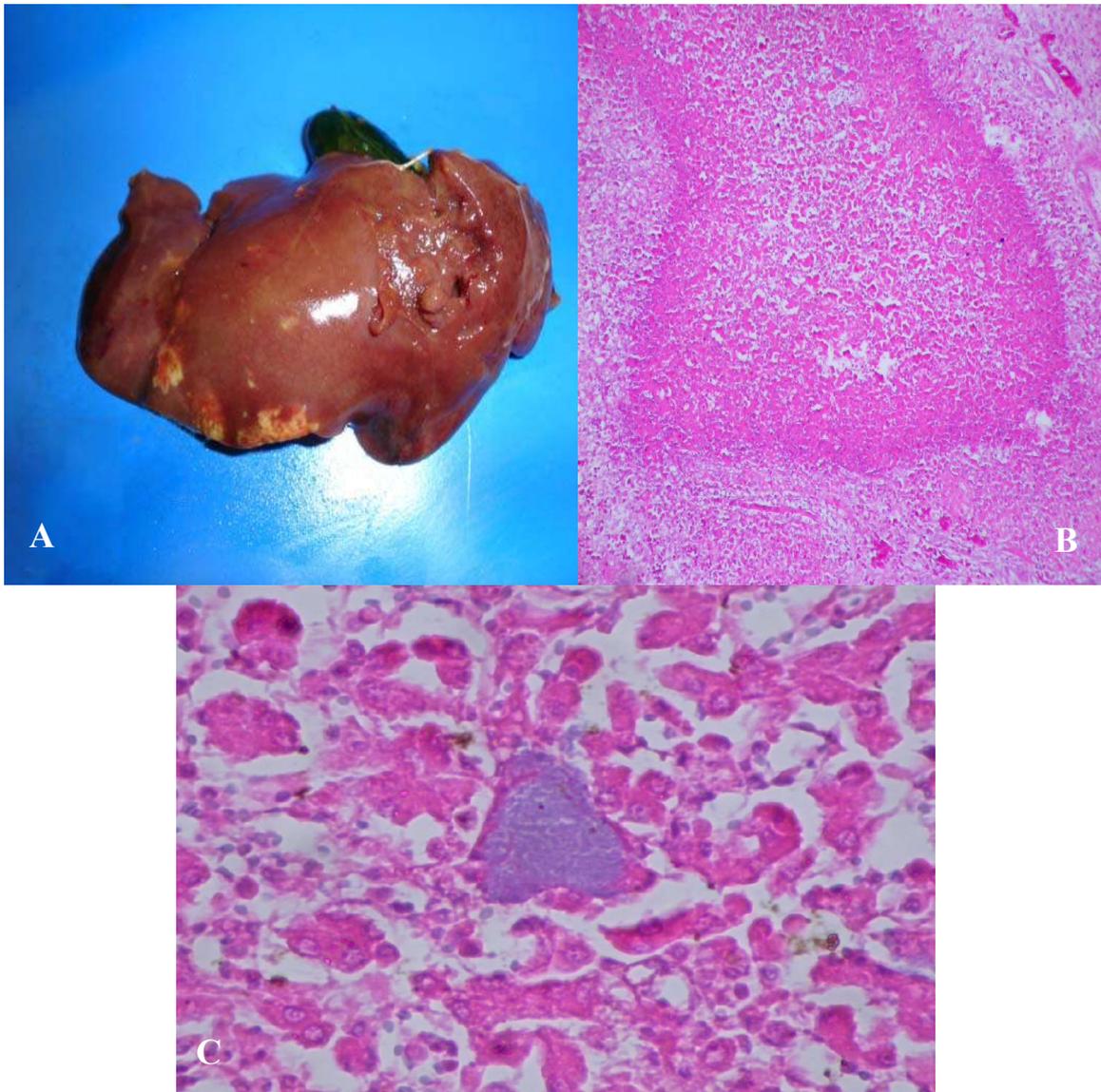


FIGURA 4 – Fígado de *Gallus gallus*. Hepatite necrosante aleatória. Amostra 36. **A)** Há áreas claras multifocais a coalescentes próximos aos bordos. **B)** Há áreas extensas de necrose infiltradas por heterófilos e por agregados de bactérias basofílicas sugestivas de infecção por *Staphylococcus aureus*. Hematoxilina-eosina. Obj. 10x. **C)** Aproximação da figura 4B evidenciando os agregados de bactérias cocóides. Hematoxilina-eosina. Obj. 40x.

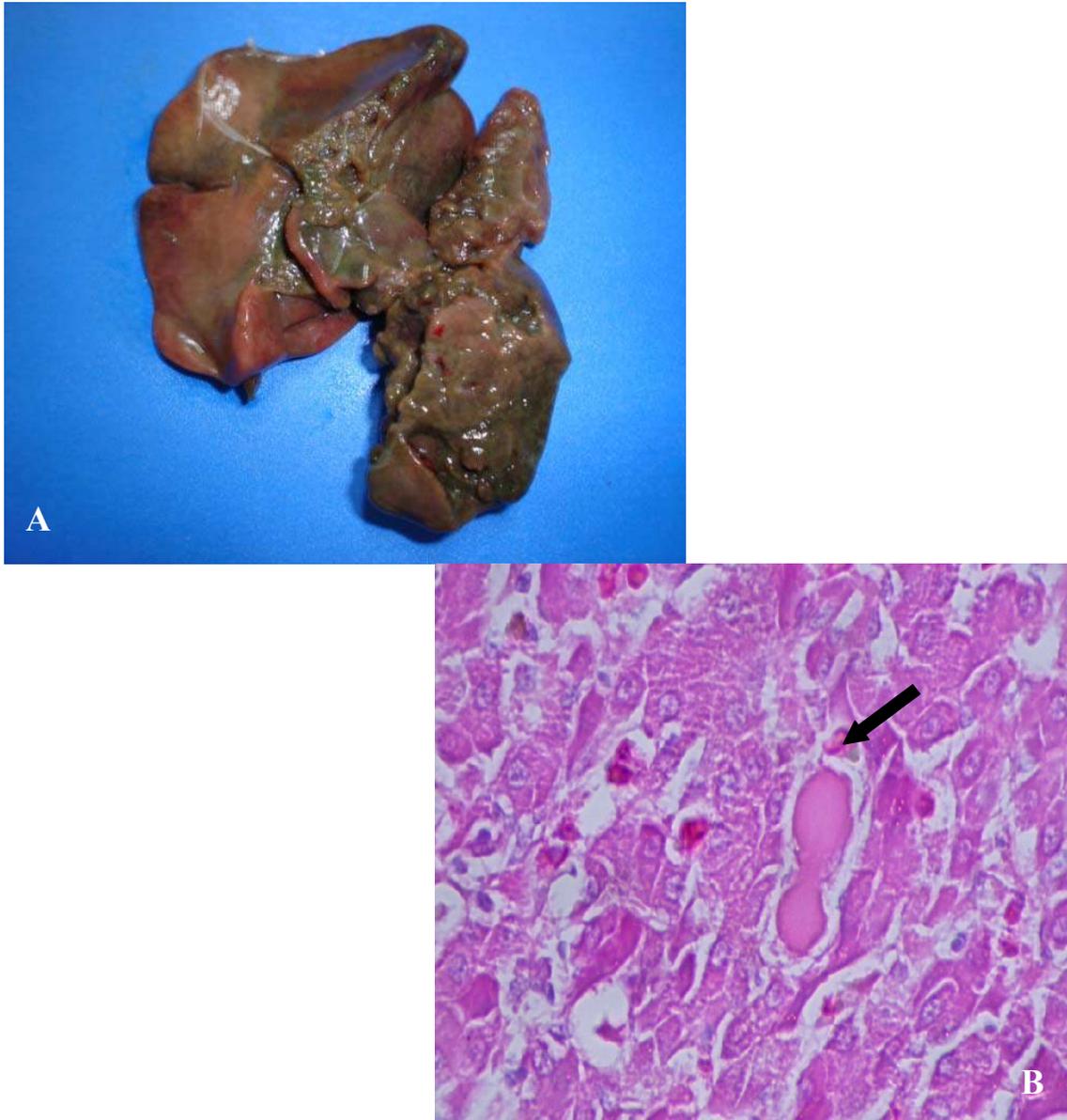


FIGURA 5 – Fígado de *Gallus gallus*. Hepatite necrosante aleatória com microtrombose sinusoidal (sugestiva de infecção de *E. coli*). Amostra 46. **A)** Apresenta-se difusamente esverdeado e friável. **B)** Há microtrombos de fibrina intrasinusoidais (seta). Hematoxilina-eosina. Obj. 20x.



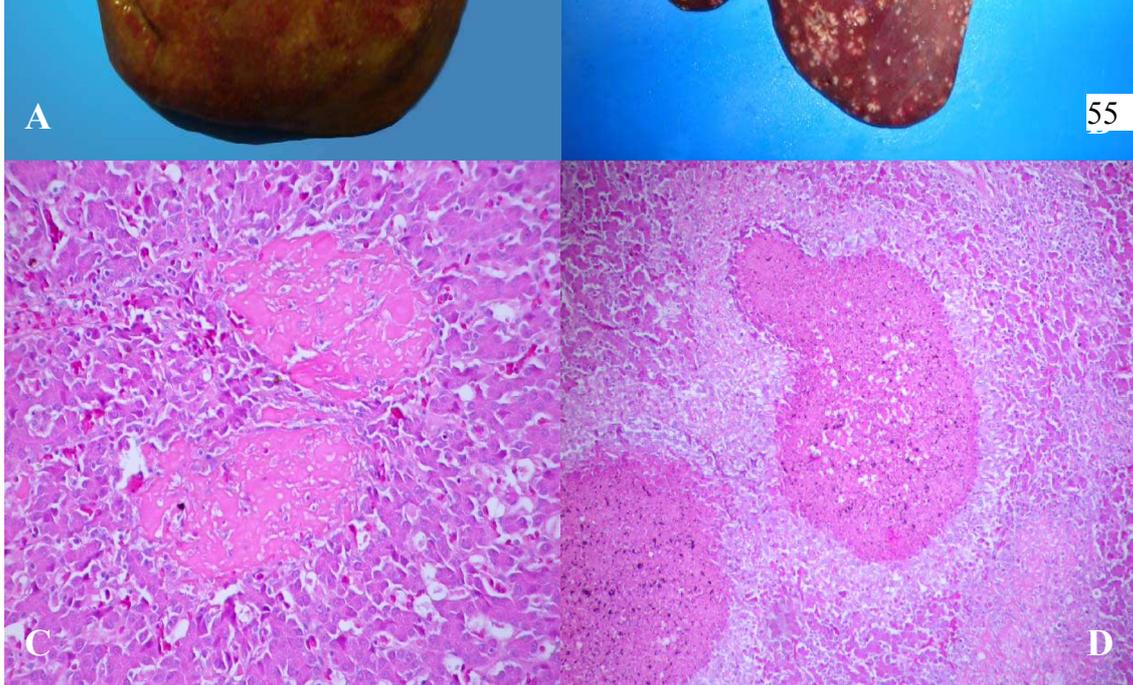


FIGURA 6 – Fígado de *Gallus gallus*. Hepatite necrosante aleatória. **A)** Amostra 13. Há aumento de volume, com leve pontuado esbranquiçado na superfície capsular. **B)** Amostra 31. Há intenso pontuado branco multifocal a coalescente na superfície capsular (mesma lesão vista em A, porém mais severa e de maior duração). **C)** Amostra 6. Áreas multifocais de necrose infiltradas por fibrina. Hematoxilina-eosina. Obj. 20x. **D)** Amostra 6. Observam-se granulomas heterofílicos. Hematoxilina-eosina. Obj. 20x.



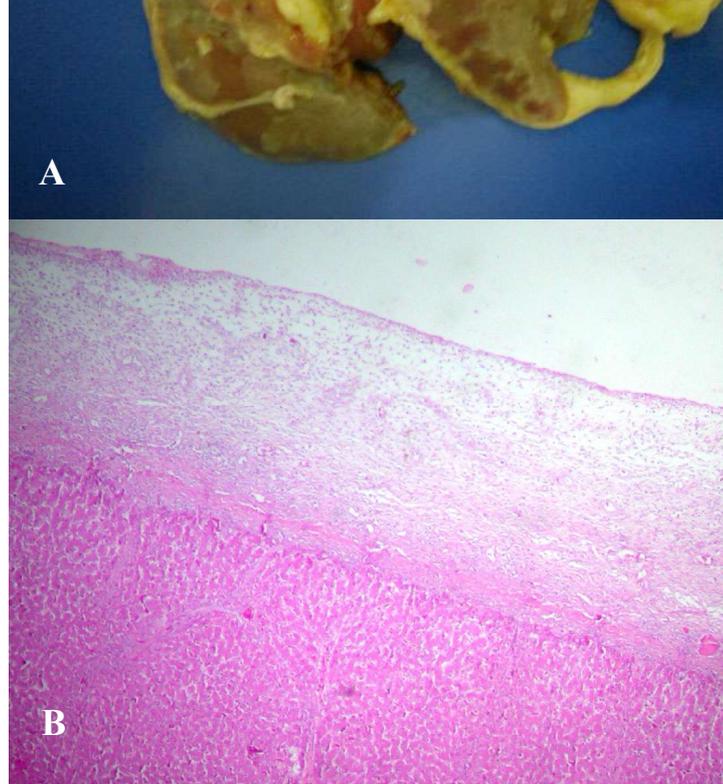


FIGURA 7 – Fígado de *Gallus gallus*. Peri-hepatite fibrinosa. **A)** Amostra 24. Há espessamento da cápsula com deposição de fibrina. **B)** Amostra 22. Saco hepatoperitoneal e cápsula hepática espessados por fibrina em organização e células inflamatórias. Hematoxilina-eosina. Obj. 10x.

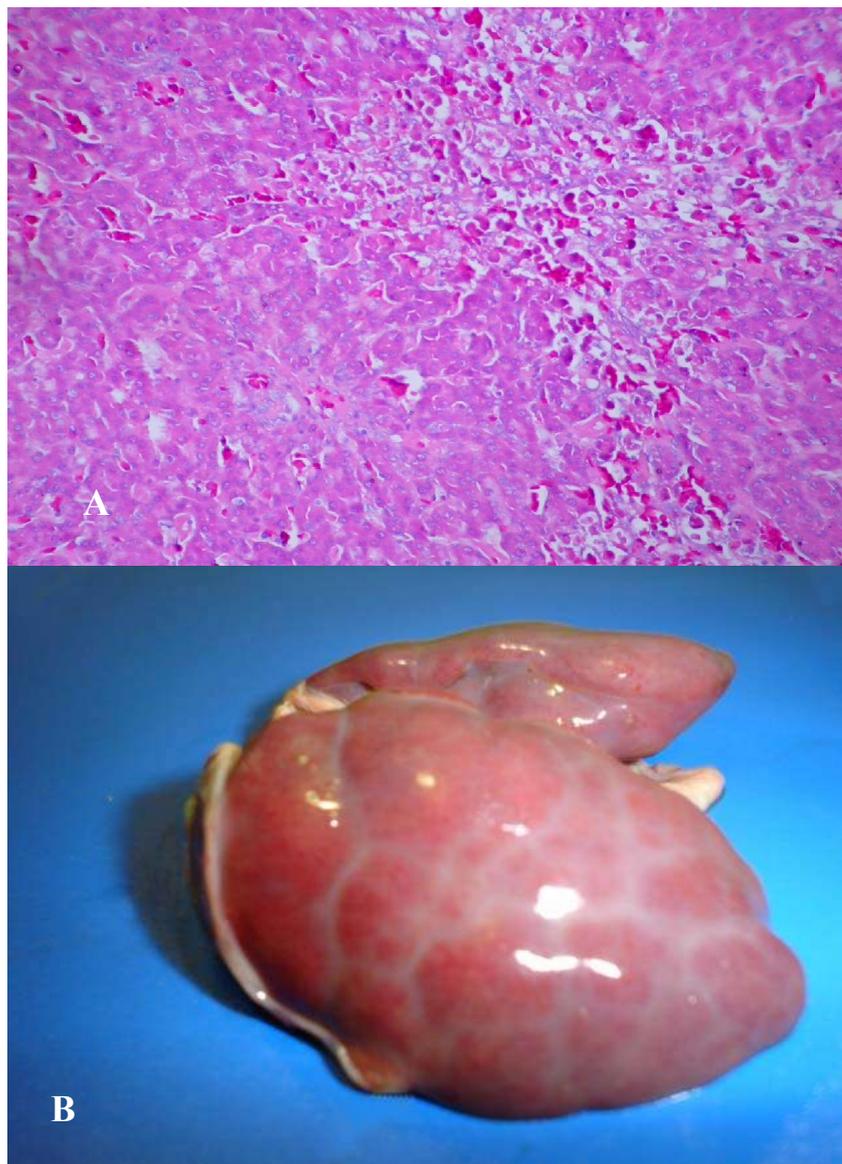


FIGURA 8 – Fígado de *Gallus gallus*. Lesão associada a hipóxia (sugestiva de insuficiência cardíaca direita). Amostra 18. **A)** Degeneração e necrose centrolobular e em ponte (lesão aguda). Hematoxilina-eosina. Obj. 20x. **B)** Há espessamento da cápsula hepática e aspecto irregular e nodular na superfície (lesão crônica).

5 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados apresentados e considerando as condições utilizadas no experimento, verificou-se que:

- As alterações macroscópicas observadas nos 90 fígados condenados variaram significativamente, inclusive para um mesmo diagnóstico morfológico obtido pela histopatologia, não sendo possível estabelecer uma constante relação das lesões macroscópicas com os diagnósticos morfológicos.
- Do total de 100 amostras de fígados de frango analisadas pela histopatologia, independentemente da variação no diagnóstico morfológico obtido, 68 amostras apresentaram lesões microscópicas sugestivas de infecção bacteriana. Nestas, *Escherichia coli* foi isolada em 21 amostras e *Staphylococcus sp.* em 15 amostras.
- Não houve isolamento de *Salmonella sp.* em fígados com lesões macroscópicas sugestivas de infecção bacteriana, bem como não foram observadas lesões microscópicas indicativas de infecção causada por esta bactéria.
- Pôde-se observar que os critérios de condenação de fígados de frango utilizados pelo Serviço de Inspeção Federal foram corretos e eficientes, descartando aqueles com potencial risco de transmissão de enfermidades.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN, G. *et al.* Recovery of *Salmonella* from high-moisture foods by abbreviated selective enrichment. **Journal of Food Protection**, v.54, n.7, p.492-495, 1991.

ARRUDA PINTO, P.S. Aspectos sanitários da salmonelose como zoonose. **Higiene Alimentar.**, v.14, n.71, p.32-33, 2000.

AWAN, M.A.; MATSUMOTO, M. Heterogeneity of staphylococci and other bacteria isolated from six-week-old broiler chickens. **Poultry Science**, v.77, n.7, p.944-949, 1998.

BACK, A. **Manual de Doenças de Aves**. Cascavel : Alberto Back, 2002, 246p.

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

BARROS, V.R.M. *Salmonella* spp: sua transmissão através dos alimentos. **Higiene Alimentar**. São Paulo, v.16, n.94, p.15-19, 2002.

BARTELT, M.A. **Diagnostic Bacteriology – a study guide**. Philadelphia : F.A. Davis Company, 2000, 500p.

BAYYARI, G.R.; HUFF, W.E.; NORTON, R.A. *et al.* A longitudinal study of green-liver osteomyelitis complex in commercial turkeys. **Avian Diseases**, v.38, n.4, p.744-754, 1994.

BERCHIERI JUNIOR, A. Salmoneloses aviárias. In.: BERCHIERI JUNIOR, A.; MACARI, M. **Doenças das Aves**. Campinas: FACTA, 2000, p.185-195.

BORDIN, E.L. **Diagnóstico post-mortem em avicultura**. São Paulo : Nobel, 1978, 165p.

BRASIL-MAA. Lei nº 1283, 18 de dezembro de 1950. Dispõe sobre a inspeção industrial e sanitária dos produtos de origem animal. Publicada no **Diário Oficial da União**, Rio de Janeiro, 19 de Dezembro de 1950. Seção 1, p.18161.

BRASIL. Secretaria de Defesa Agropecuária - MAA. Portaria nº 210, 10 de Novembro de 1998. Aprova o Regulamento Técnico da Inspeção Tecnológica e Higiênico-Sanitária de Carne de Aves. Republicado no **Diário Oficial da União**, Brasília, 05 de Março de 1998. Seção 1, nº 43, p. 17-23.

BRASIL. Secretaria de Defesa Agropecuária - MAA. Portaria nº 8, 23 Janeiro de 1995. Método analítico de carcaça de aves e pesquisa de Salmonella. Publicada no **Diário oficial da União**, Brasília, 27 de Janeiro de 1995. Seção 1. p.1182.

BRASIL. Secretaria de Defesa Agropecuária – MAA. Portaria nº 126, 03 de Novembro de 1995. Normas de Credenciamento e Monitoramento de Laboratórios de Diagnóstico das Salmoneloses Aviárias (S. Enteritidis, S. Gallinarum, S. Pullorum e S. Typhimurium. Publicada no **Diário Oficial da União**, Brasília, Seção 1, p.17694-17698.

BRASIL. Secretaria de Defesa Agropecuária – MAA. Instrução Normativa nº 22, 12 de Agosto de 1999. Normas Técnicas Para Controle e Certificação de Núcleos e Estabelecimentos Avícolas Como Livre de Salmonella Gallinarum e de Salmonella Pullorum e Livre ou Controlado para Salmonella Enteritidis e para Salmonella Typhimurium. Publicada no **Diário Oficial da União**, Brasília, Seção 1, p.17.

CAMPOS, L.C. Salmonella. In.: TRABULSI, L.R. *et al.* **Microbiologia**. 3 ed. São Paulo : Atheneu, 2002, p.229-234.

CAMPOS, L.C.; TRABULSI, L.R. Escherichia. In.: TRABULSI, L.R. *et al.* **Microbiologia**. 3 ed. São Paulo : Atheneu, 2002, p.215-228.

CARLTON, W.W; McGAVIN, M.D. **Patologia veterinária especial de Thompson**. Porto Alegre : Artmed, 1998, 672p.

CARTER, G.R. **Fundamentos de Bacteriologia e Micologia Veterinária**. São Paulo : Rocca, 1988, p.148-154.

CARVALHO, J.C.A.P. *et al.* Avaliação bacteriológica de miúdos (frangos). In: Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, Recife-PE, **Anais...**1994, p.23.

DUSCH, H.; ALTWEGG, M. Comparison of Rambach agar, SM-ID medium, and Hektoen Enteric agar for primary isolation of Non-Typhi Salmonellae from stool samples. **Journal of Clinical Microbiology**, p.410-412, 1993.

EVANGELISTA, J. Contaminações em Alimentos. **Alimentos um Estudo Abrangente**. Rio de Janeiro : Atheneu, 1994, c.7, p.175-230.

FARMER III, J.J. Enterobacteriaceae: Introduction and Identification. In.: MURRAY, P.R. *et al.* **Manual of Clinical Microbiology**. 6 ed. Washington : ASM Press, 1995, p. 438-449.

FERREIRA, A. J. P., FERREIRA, C. S. A. Estafilococose e estreptococose aviária. In.: BERCHIERI JÚNIOR, A.; MACARI, M. **Doenças das aves**. Campinas : FACTA, 2000. Cap. 4.3, p.209-215.

FISHER, M.E. *et al.* Postmortem detection of acute septicemia in broilers. **Avian diseases**, n.42, p.452-461, 1998.

FRANCO, R.M.; ALMEIDA, P.M.P. Avaliação bacteriológica de queijo tipo Minas Frescal com pesquisa de patógenos importantes à saúde pública: *Staphylococcus aureus*, *Salmonella sp* e Coliformes fecais. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.17, n.111, p.79-85, 2003.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1996, 182p.

FRASER, C.M. **Manual Merck de Veterinária**: um manual de diagnóstico, tratamento, prevenção e controle de doenças para o veterinário. 7 ed. São Paulo : Roca, 1997, 2168p.

FREITAS, M.Q. *et al.* Ocorrência de microorganismos da família *Enterobacteriaceae* em fígados de aves obtidos em abatedouros comerciais. In.: Ciência e Tecnologia de Alimentos, Curitiba-PR, **Anais...** 1986, p.9.

GARRICK, R.C.; SMITH A.D. Evaluation of Rambach agar for the differentiation of *Salmonella* species from other Enterobacteriaceae. **Letters in Applied Microbiology**, n.18, p.187-189.

GAST, R.K. Paratyphoid infections. In.: SAIF, Y.M. **Diseases of Poultry**. 11 ed. Ames, Iowa : Iowa State Press, 2003, p.583-613.

GOMIS, S.M. *et al.* Experimental reproduction of *Escherichia coli* cellulitis and septicemia in broiler chickens. **Avian diseases**, v.41, n.1, p.234-240, 1997.

HAYES, P.R. **Microbiologia e higiene de los alimentos**. Zaragoza : Acribia, 1993, 369p.

HIRSH, D.C.; ZEE, Y.C. **Microbiologia veterinária**. Guanabara Koogan : Rio de Janeiro, 2003, 446p.

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

HOLT, J.G. *et al.* **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 9 ed. Baltimore : Williams & Wilkins, p. 787, 1994.

INTERNACIONAL COMMISSION MICROBIOLOGICAL SPECIFICATION FOR FOODS – ICMSF. **Microorganismos de los alimentos: características de los patógenos microbianos técnica de análisis microbiológica**. Zaragoza : Acribia, 1998, 606p.

JAWETZ, E. *et al.* **Microbiologia Médica**. 18 ed. Guanabara Koogan : Rio de Janeiro, 1991, 519p.

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

JENSEN, M.M., DOWNS, W.C., MORREY, J.D. *et al.* Staphylococcosis of turkeys. 1. Portal of entry and tissue colonizations. **Avian Diseases**, v.31, n.1, p.64-69, 1987.

JONES, T.C., HUNT, R.D., KING, N. W. **Patologia Veterinária**. São Paulo : Manole, 2000, 1415p.

KINDE, H. Pathologic and bacteriologic findings in 27-week-old commercial laying hens experimentally infected with *Salmonella* Enteritidis, phage type 4. **Avian diseases**, v.44, n.2, p.239-248.

KONEMAN, *et al.* **Color Atlas and textbook of diagnostic microbiology**. Phyladelphia : J.B. Lippincott company, 1992, 1154p.

LEITE, C.R.C. Desinfecção química aplicada na avicultura: concentrações inibitórias mínimas de desinfetantes derivados da amônia quaternária e hipoclorito de sódio sobre *Salmonella sp.* e *Escherichia coli*. **Dissertação (Mestrado)**. Porto Alegre : Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. 103 p., 2001.

LEITE, I.C.B. Avaliação bacteriológica de fígados de frangos (*Gallus domesticus*) resfriados, comercializados no município do Rio de Janeiro-RJ. **Dissertação (Mestrado)**. Niterói : Universidade Federal Fluminense, Faculdade de Veterinária, Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária. 87p. 1995.

LOVLAND, A.; KALDHUSDAL, M. Liver lesions seen at slaughter as an indicator of necrotic enteritis in broiler flocks. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, n.24, p.345-351, 1999.

MARTINS, L.T. Staphylococcus. In.: TRABULSI, L.R. *et al.* **Microbiologia**. 3 ed. São Paulo : Atheneu, p.149-156, 2002.

NAKAMURA, K. *et al.* Pathology of spontaneous colibacillosis in a broiler flock. **Veterinary Pathology**, v.22, n.6, p.592-597, 1985.

NAKAMURA *et al.* Comparative pathology of heart and liver lesions of broiler chickens that died of ascites, heart failure, and others. **Avian diseases**, v.43, n.3, p.526-532, 1999.

OLIVEIRA, A.S.C. *et al.* Perfil de resistência a antimicrobianos de *Salmonella Enteritidis* e *Salmonella thyphimurium* isoladas de miúdos de aves em Goiás. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Suplemento 6, p.195, 2004.

OLIVEIRA, S.J. **Guia Bacteriológico Prático : Microbiologia Veterinária**. Canoas : Ed. da Ulbra, 2000, 237p.

PEIGHAMBARI, S.M. *et al.* Characteristics of *Escherichia coli* isolates from avian cellulitis. **Avian diseases**, n.39, p.116-124, 1994.

PEIGHAMBARI, S.M.; JULIAN, R.J.; GYLES, C.L. Experimental *Escherichia coli* respiratory infection in broilers. **Avian diseases**, v.44, n.4, p.759-769, 2000.

PEREIRA, M.L. *et al.* Estafilococos em Alimentos: possibilidades de disseminação através do portador humano e animal. **Higiene Alimentar**, v.13, n.66/67, p.45-48, 1999.

PICOLLO, R.C. *et al.* Surto de Salmonelose ocorrido em cantina escolar, no município de São Paulo, em 1991. **Higiene Alimentar**, v.6, n.23, p.28-30, 1992.

PINTO, A.T. Ocorrência de enfermidades bacterianas transmitidas por alimentos no estado do Rio Grande do Sul. **Dissertação (Mestrado)**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. 124p., 1999.

PONTES, A.P. Programa de controle de Salmonella em abatedouros de aves. In.: Conferência APINCO de Ciência e Tecnologia Avícola. Santos-SP, **Anais...** 2004, p.102.

POPOFF, M.Y.; LE MINOR, L. Antigenic Formulas of *Salmonella* Serovars. **7th Revisión**. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella. Institut Pasteur : Paris, France, 1997.

POPOFF, M.Y. Antigenic Formulas of *Salmonella* Serovars. **8th Revisión**. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella. Institut Pasteur : Paris, France, 2001.

QUINN, P.J. *et al.* **Clinical Veterinary Microbiology**. London : Mosby, 1994, 648p.

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

RIBEIRO, M.C.; SOARES, M.M. **Microbiologia Prática-Roteiro e manual de bactérias e fungos**. São Paulo : Atheneu, 1993, 112p.

ROITMAN L. *et al.* **Tratado de microbiologia**. São Paulo : Manole, 1988, 186p.

SCHULZ, W. Infecções por Estafilococos. In: BEER, J. **Doenças Infeciosas dos Animais Domésticos**. São Paulo : Roca, 1988, p.1-11.

SEYED, A.P. *et al.* Dynamics of *Escherichia coli* infection in experimentally inoculated chickens. **Avian diseases**, v.41, p.221-233, 1997.

SHIVAPRASAD, H.L. Pullorum disease and fowl typhoid. In.: SAIF, Y.M. **Diseases of Poultry**. 11 ed. Ames, Iowa : Iowa State Press, 2003, p.568-582.

SHIVAPRASAD, H.L.; CRESPO, R. Developmental, metabolic and other noninfection disorders. In.: SAIF, Y.M. **Diseases of Poultry**. 11 ed. Ames, Iowa: Iowa State Press, 2003, p.1055-1102.

SILVA, A. B. **Colibacilose**. Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária, Faculdade de Veterinária/IPVDF. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1992. 8p.

SILVA, G.; FIORENTIN, L. Correlação entre a patogenicidade de *Escherichia coli* em pintos e a coloração das colônias crescidas em ágar

contendo vermelho congo. **A Hora Veterinária**, ano.15, n.87, set/out, 1995, p.21-24.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A. **Métodos de análise microbiológica de alimentos**. Campinas : Instituto de Tecnologia de Alimentos, n.14, 1995, 229p.

SIQUEIRA, R.S. **Manual de microbiologia de alimentos**. Brasília : Embrapa, 1995, 159p.

SKEELES, J. K. Staphylococcosis. In.: CALNEK, B. W. *et al.* **Diseases of poultry**. Ames : Iowa State University Press, 1997, p.247-253.

STROHL, W.A.; ROUSE, H.; FISHER, B.D. **Microbiologia Ilustrada**. Porto Alegre : Artmed, 2003. 532p.

WAGES, D.P.; OPENGART, K. Necrotic enteritis. In.: SAIF, Y.M. **Diseases of Poultry**. 11 ed. Ames, Iowa : Iowa State Press, 2003, p.781-783.