

Pesquisa de *Escherichia coli* e lesões teciduais em frangos de corte macroscopicamente saudáveis

Fellipe Kennedy Alves Cantarelli ¹(IC), Eliete Souza Santana²(PQ), Daniella Rodrigues da Costa³(PQ), Lorena Moreira Pires Rosa ⁴(IC)

^{1,4}Estudante Iniciação Científica, Universidade Estadual de Goiás,
felipecantarelli2009@hotmail.com; ^{3,4}Pesquisadores, Universidade Estadual de Goiás

Resumo: Foi realizado um estudo para investigar a presença de *E. coli* em vísceras de frangos de corte aparentemente saudáveis. Foram coletadas 150 amostras, sendo 50 fígados, 50 baços e 50 corações, das quais foram realizadas análises bacteriológicas e histopatológicas, para verificar as alterações microscópicas determinadas pela bactéria. Os dados obtidos foram analisados por frequências absoluta e relativa. Observou-se crescimento bacteriano em 39% (59/150) das amostras, e dessas, em 23% (35/150), houve crescimento exclusivo de *E. coli*, das quais 48,58% foram no fígado, 28,57% no baço e 22,85% no coração. Nos exames histopatológicos, a lesão mais observada foi a presença de infiltrados inflamatórios linfocíticos, sendo o fígado, o órgão com maior ocorrência dessas lesões (50/50), seguido pela degeneração hepática (12/50). No baço, a lesão de maior ocorrência foi a rarefação (4/50), e no coração também prevaleceu o infiltrado inflamatório linfocítico (8/50). Nas condições deste estudo, conclui-se que houve isolamento de *E. coli* em alta percentagem nos animais saudáveis, o que pode ter sido desencadeado por fatores do estresse pré-abate relacionados ao transporte, ao jejum ou a períodos de espera prolongados. Conclui-se ainda, que não houve relação entre a presença da bactéria com as alterações teciduais dos órgãos analisados.

Palavras-chave: Aves. Abatedouros. Bactérias. Histopatologia. Órgãos.

Introdução

O setor avícola apresentou elevado crescimento nos últimos anos, demonstrando a importância do setor para o agronegócio brasileiro, sendo que em 2016 passou a configurar como o segundo maior produtor, com 12,9 milhões de toneladas produzidas naquele ano, das quais 80% foi consumida no mercado interno, que apresentou consumo de 41,10 kg/habitante/ano (ABPA, 2017).

Os dados de elevado consumo reforçam a necessidade de atenção na produção animal, pois a carne de aves, pode ser contaminada em qualquer parte do sistema produtivo e os patógenos contaminantes podem sobreviver até o consumo do produto final, causando prejuízos econômicos e danos à saúde do consumidor (FLORES e MELO, 2015).

REALIZAÇÃO



Dentre tais patógenos, a *Escherichia coli* tem destaque, sendo responsável por perdas elevadas no setor avícola, sendo responsável por perdas econômicas elevadas (CASAGRANDE et al., 2017) seja pela condenação parcial, seja pela condenação total e também pela necessidade de tratamento ou perda de animais acometidos na granja (DE OLIVEIRA ALMEIDA et al., 2018).

Doenças causadas por *E. coli* após adentrar no organismo por órgãos respiratórios, pode contaminar órgãos como o fígado e baço, sendo o coração, o último órgão a ser afetado (CARVALHO et al., 2017). A contaminação, pode ocorrer também, por translocação bacteriana da microbiota intestinal para outros órgãos, causada por fatores estressantes no manejo pré-abate (BURKHOLDER et al., 2008).

Além do mais, até a prática rotineira das granjas e abatedouros avícolas, podem alterar a microbiota intestinal. Assim, a *E. coli* comensal da microbiota intestinal pode se deslocar para outras partes do organismo das aves, tanto durante o manejo, quanto durante o abate, e o processamento dos cortes da carne frango, contaminando outras partes da carcaça.

Material e Métodos

Comitê de ética

O trabalho foi aprovado pelo Comitê de ética da Universidade Estadual de Goiás (CEUA-UEG), com o protocolo nº 005/2016.

Coleta das amostras

Foram coletadas 50 amostras de fígado, 50 amostras de baços e 50 amostras de corações de frangos de corte aparentemente saudáveis em abatedouros frigoríficos sob o sistema de inspeção da defesa agropecuária do Estado de Goiás.

Cultivo e isolamento bacteriano

Para pesquisa de *Escherichia coli*, fragmentos de cada órgão foram maceradas e processadas de acordo com o descrito por Georgia Poultry Laboratory (1997) e Brasil (2003). Amostras de fígados, baços e corações foram colocados em tubos de ensaio contendo 9,0 mL de caldo de selenito cistina e tubos de ensaio com 9,0 mL de caldo Rappaport Vassiliadis, os quais foram incubados em estufa a 37° C

REALIZAÇÃO



por 18-24 horas. Com o auxílio da alça de níquel cromo foi retirada alíquotas dos caldos Rappaport Vassiliadis e caldo selenito cistina as quais foram estriadas por esgotamento nos ágar xylose lysine tergitol 4 (XLT4) e ágar verde brilhante (VB).

A partir do crescimento de colônias típicas e atípicas, segundo Brasil (2003) e KONEMAN (2010), de três a cinco colônias foram transferidas para tubos contendo tríplice açúcar ferro (TSI), os quais foram incubados a 37° C por 24 horas. Tubos de TSI com crescimento sugestivo de *E. coli* foram submetidos aos testes de bioquímica, para verificação da produção de indol e vermelho de metila, motilidade, produção de H₂S, urease e reação no citrato de Simmons, para confirmação da bactéria.

Exames histopatológicos

Fragmentos de fígados, baços e corações foram coletados e processados de acordo com a metodologia convencional de Luna (1968), sendo as lâminas lidas em microscópio óptico de campo claro, marca Carl Zeiss, modelo JENAVAL.

Análises estatísticas

Para descrever a presença da bactéria *E. coli* em cada um dos órgãos, assim como as alterações histopatológicas encontradas, foram utilizadas as frequências absoluta e relativa. Já para verificar se houve diferença significativa entre os achados microscópicos nos órgãos com presença da bactéria, foram utilizados os testes Qui-Quadrado e Exato de Fisher.

Resultados e Discussão

Os resultado bacteriológicos do cultivo e isolamento da *E. coli*, demonstra que apesar das vísceras analisadas estarem aparentemente normais, sem lesões macroscópicas, houve crescimento do patógeno em estudo nos três tipos de materiais analisados (Tabela 1).

Tabela 1 – Frequência absoluta e percentual de aparecimento da *E. coli* em fígados, baços e corações de frangos de corte aparentemente saudáveis.



Órgão	<i>E. coli</i> - N	%	Valor -p
Fígado	17/35	48,57%	0,048 ¹
Baço	10/35	28,57%	
Coração	8/35	22,85%	

¹ Teste Qui-Quadrado.

Assim, após análises estatísticas aos resultados acima, demonstrou-se que quanto maior a frequência da bactéria presente no fígado, maior é a possibilidade de tal patógeno estar presente nas outras vísceras analisadas, sendo 17/35 (48,57%), 10/35 (28,57%) e 8/35 (22,85%), para fígados, baços e corações, respectivamente. Em estudo semelhante, Alonso et al. (2012) ao pesquisarem a *E. coli* em vísceras de frangos de corte, observou que 43% foram positivas para o crescimento do microrganismo citado.

Em trabalho desenvolvido com o objetivo de verificar a correlação existente entre a inspeção visual do fígado e a presença de *E. coli* em fígados de frangos provenientes de matadouros avícolas, Silva et al. (2012), isolaram o microrganismo em 45,5% dos fígados coletados. Consideraram assim, os critérios de condenação das carcaças inadequados, haja vista a elevada presença de *E. coli* nas amostras de fígados oriundos de carcaças consideradas próprias para o consumo humano, o que sugere que a inspeção visual de fígados em matadouros avícolas, não é suficiente para descartar carcaças contaminadas com *E. coli*.

A presença de *E. coli* nos fígados, aparentemente, sadios é preocupante, uma vez que o órgão está envolvido nas infecções hematógenas, por receber tanto sangue arterial, quanto sangue venoso do trato gastrointestinal. Assim, a infecção do fígado pode ser primária, ou fazer parte de um processo sistêmico (MACLACHLAN & CULLEN, 1998), como observado em processos, em que a *E. coli* também foi isolada em outros órgãos, como os baços e corações analisados.

As condições ambientais e de manejo também podem contribuir grandemente para a ocorrência de *E. coli*, já que a bactéria é considerada oportunista. Altas concentrações de amônia no galpão, deficiências na ventilação, extremos de temperatura, umidade da cama, criações com alta densidade e deficiência no

processo de limpeza e desinfecção são considerados os principais fatores ambientais predisponentes (FERREIRA & KNÖBE, 2008).

Sabendo-se que a *E. coli*, além de infecções, pode determinar processos inflamatórios em diferentes vísceras (RON, 2006), foram realizadas análises quanto às alterações histopatológicas, destacando-se que foram observadas diversas alterações, tanto nas amostras com crescimento ou não da bactéria (Tabela 2).

Tabela 2 – Descrição das alterações microscópicas encontradas em fígados, baços e corações de frangos de corte aparentemente saudáveis.

Órgão	Alteração	Total	Sem <i>E. coli</i>	Com <i>E. coli</i>	Valor-p
Fígado	Infiltrado inf. linfocítico	50/50 (100%)	24/24 (100%)	26/26 (100%)	-
	Necrose	5/50 (10%)	2/24 (8,33%)	3/26 (11,54%)	1,000 ²
	Degeneração	12/50 (24%)	4/24 (16,67%)	8/26 (30,77%)	0,404 ¹
	Congestão	1/50 (2%)	0/24 (0%)	1/26 (3,85%)	1,000 ²
	Número de Alterações	1 34/50 (68%)	18/24 (75%)	16/26 (61,54%)	0,530 ²
		2 14/50 (28%)	6/24 (25%)	8/26 (30,77%)	
		3 2/50 (4%)	0/24 (0%)	2/26 (7,69%)	
Baço	Sem alterações	45/50 (90%)	27/31 (87,1%)	18/19 (94,74%)	0,637 ²
	Rarefação	4/50 (8%)	4/31 (12,9%)	0/19 (0%)	0,284 ²
	Hemossiderose	2/50 (4%)	2/31 (6,45%)	0/19 (0%)	0,519 ²
	Hiperplasia linfóide	1/50 (2%)	0/31 (0%)	1/19 (5,26%)	0,380 ²
	Número de Alterações	0 45/50 (90%)	21/31 (67,74%)	24/19 (126,32%)	0,407 ²
		1 3/50 (6%)	1/31 (3,23%)	2/19 (10,53%)	
		2 2/50 (4%)	2/31 (6,45%)	0/19 (0%)	
Coração	Sem alterações	42/50 (84%)	31/36 (86,11%)	11/14 (78,57%)	0,670 ²
	Infiltrado inf. linfocítico	8/50 (16%)	5/36 (13,89%)	3/14 (21,43%)	0,670 ²

¹ Teste Qui-Quadrado; ² Teste Exato de Fisher.

A partir desta análise, foi possível verificar, que no fígado 68% das amostras, apresentaram uma alteração, enquanto 28% apresentaram duas alterações, 4% apresentaram alterações três alterações e que todas amostras apresentaram



infiltrado inflamatório linfocítico. No baço, 6% das amostras apresentaram uma alteração microscópica e 4% apresentaram duas alterações. Já no coração 16% apresentaram apenas um tipo de alteração, sendo esta infiltrado inflamatório linfocítico.

Também foi possível concluir, que não houve diferença significativa ($p \geq 0,05$) entre as alterações encontradas nos órgãos positivos e negativos para o crescimento de *E. coli*. Desta forma, as alterações microscópicas encontradas nos órgãos estudados não apresentam correlação com a presença da *E. coli*, mas podem apresentar com outros tipos de microrganismos, os quais não foram pesquisados nesse trabalho.

Porém, a ausência de correlação entre a presença da bactéria e as lesões microscópicas também pode sugerir que houve translocação bacteriana da microbiota intestinal para outros órgãos. Tal evento pode ser causado por fatores estressantes, tais como: manejo rotineiro nas granjas avícolas, variação da temperatura ambiental no alojamento e transporte, jejum pré-abate, dentre outros.

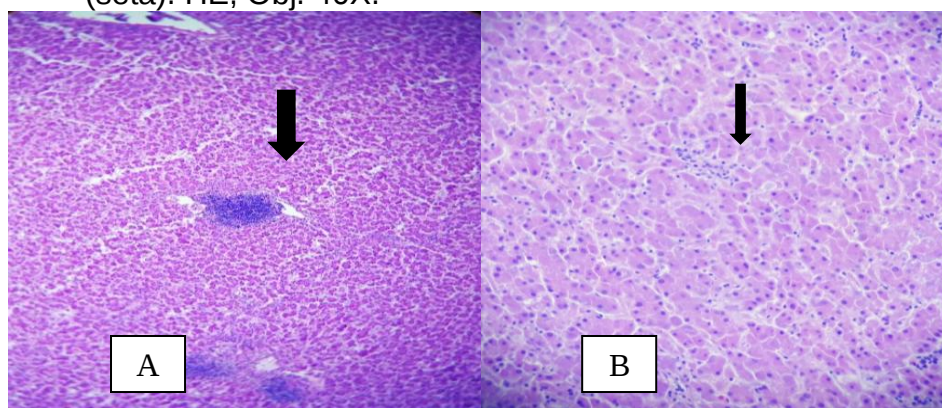
Outra forma de contaminação bacteriana é a infecção causada por microrganismos externos ao corpo da ave, conforme descrito por Nolan et al. (2013). Estes autores descreveram que a infecção pela *E. coli* se inicia no trato respiratório superior e que após ingresso da bactéria nas aves, o microrganismo contamina primeiramente o fígado, o que explica a maior percentagem de isolamento nesse órgão, posteriormente, vai para o baço, sendo o coração o último órgão a ser afetado, e a partir deste momento, indicação de infecção generalizada.

Quanto aos achados histopatológicos, o presente estudo revelou que infiltrado inflamatório linfocítico (Figura 2) foi a alteração de maior frequência, estando presente em 100% dos fígados analisados, contrariando os resultados de Silva et al. (2012), que descreveram a colângio-hepatite multifocal com a presença de heterófilos e mononucleares, como a alteração microscópica mais frequente no fígado.

Outra alteração microscópica também relatada neste experimento foi a necrose, presente em 10% dos fígados analisados (Figura 2). A mesma alteração também foi descrita por Casagrande et al. (2017). Por outro lado, estes autores

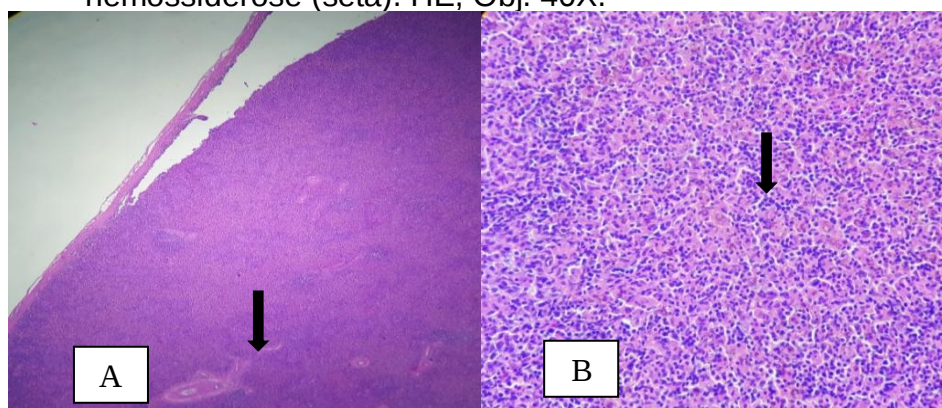
descreveram infiltrado de heterófilos nos fígados, contudo o resultado do presente experimento relatou apenas infiltrado inflamatório linfocítico.

Figura 2 – Fotomicrografia do fígado. A) infiltrado inflamatório linfocítico periportal multifocal (seta). HE, Obj. 10X; B) Necrose multifocal de hepatócitos (seta). HE, Obj. 40X.



No presente estudo, os baços não apresentaram lesões macroscópicas, entretanto, nos exames histopatológicos observou-se rarefação (4/50) (Figura 3) como a alteração mais frequente (Figura 4), resultados diferentes aos descritos por Casagrande (2017) que evidenciou esplenomegalite como principais alterações macroscópicas encontradas no baço.

Figura 3 – Fotomicrografia do baço. A) rarefação linfóide (seta). HE, Obj. 10X; B) hemossiderose (seta). HE, Obj. 40X.

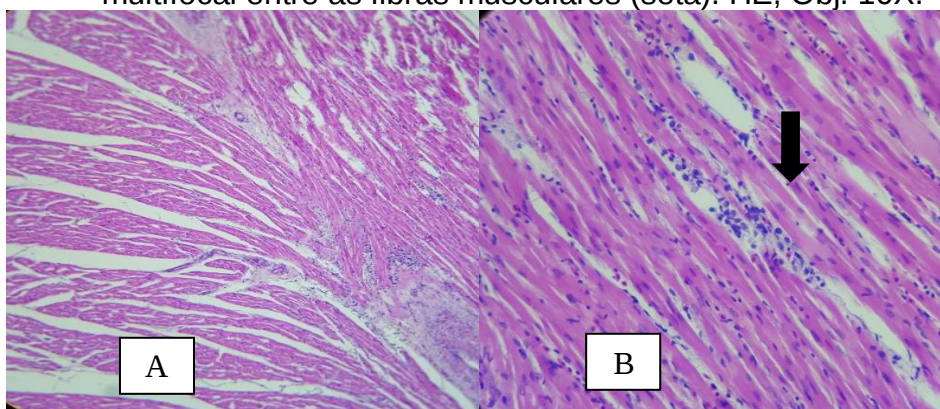


Outros resultados, também foram descritos por Mosleh et al. (2017) que pesquisaram 560 frangos de corte e descreveram que nos baços com presença de

E. coli, as alterações microscópicas observadas foram necrose de esplenócitos, infiltrado heterofílico e hemorragia.

Nos corações dos animais avaliados neste estudo, semelhante aos outros órgãos analisados, não apresentaram alterações macroscópicas, contrariando o descrito por Casagrande (2017) que relatou a deposição de fibrina no saco pericárdico como a única alteração cardíaca evidenciada em seu estudo. Já nas análises histopatológicas, a única alteração observada foi o infiltrado inflamatório linfocítico (8/50) (Figura 4).

Figura 4 – Fotomicrografia do coração. A e B) infiltrado inflamatório linfocítico multifocal entre as fibras musculares (seta). HE, Obj. 10X.



Dentre as perdas econômicas em plantas industriais, devido condenação parcial ou total a doença mais corriqueira em abatedouro avícolas, causada pela *E. coli* é a colibacilose. Esta doença é responsável por cerca de 30% das condenações neste ambiente (DE OLIVEIRA ALMEIDA et al., 2018).

Considerações Finais

De acordo com as condições de realização do presente experimento, conclui-se que *E. coli* está presente em aves abatidas sob sistema de inspeção sanitária, mesmo sem lesões macroscópicas aparentes. Desta forma, torna-se necessário reforçar a necessidade de boas práticas de fabricação em todo processo produtivo da avicultura. Assim, aves aparentemente saudáveis, podem ser carreadoras de tal patógeno e serem fontes de doenças transmitidas por alimentos.



Isto posto, é necessário reforçar estratégias de mitigação do risco de contaminação das aves em todas as fases do processo produtivo, tais como boas práticas agropecuárias, além de boas práticas de fabricação no tocante as fases de produção. Já no âmbito do consumo humano, torna-se necessário investir em programas de educação sobre o manuseio e consumo de carne de aves e seus derivados, de forma a evitar a contaminação e disseminação do patógeno aqui estudado.

Agradecimentos

À Universidade Estadual de Goiás, pelo espaço e materiais concedidos para a realização desse trabalho e também pela bolsa de iniciação científica.

Referências

ABPA. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL. **Relatório anual da ABPA 2017**. p. 1-43, 2017.

ALONSO, M. Z.; LUCCHESI, P. M. A.; RODRÍGUEZ, E. M.; PARMA, A. E.; PADOLA, N. L. Enteropathogenic (EPEC) and Shigatoxigenic *Escherichia coli* (STEC) in broiler chickens and derived products at different retail stores. **Food Control**, Guildford/Inglaterra, v.23, p. 351-355, 2012.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria Nacional da Defesa Agropecuária. Departamento Nacional de Defesa Animal. Coordenação Geral de Laboratório Animal. **Métodos de Análises Microbiológicas para Alimentos**, Brasília: MAPA, 2003, 226p.

BURKHOLDER, K.M.; THOMPSON, K. L.; EINSTEIN, M. E.; APPLGATE, T. J.; PATTERSON, J. A. Influence of stressors on normal intestinal microbiota, intestinal morphology, and susceptibility to *Salmonella* Enteritidis colonization in broilers. *Poultry Science*, Oxford/Reino Unido, v. 87, n. 9, p. 1734-1741, 2008.

CARVALHO, M. A.; SILVA, C. R. L.; NETO, A. N. Exportações brasileiras de produtos agrícolas e mudanças na demanda mundial de alimentos. **Economia e Sociedade**, Campinas/SP, v. 13, n. 2, p. 133-145, 2016.

CARVALHO, D., TEJKOWSKI, T. M., JAENISCH, F. R., RODRIGUES, R. O., BRITO, K. C.; BRITO, B. G. Susceptibilidade de duas linhagens comerciais de frango de corte no desenvolvimento de dermatite necrótica e possível relação dos genes *iss* e *iutA* de *Escherichia coli* com a reprodução experimental da doença. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Seropédica/RJ, v.37, n.12, p.1395-1400, 2017.

REALIZAÇÃO

CASAGRANDE, R. A., MACHADO, G., GUERRA, P. R., CASTRO, L. A. D., SPANAMBERG, A., SILVA, S. C. D.; DRIEMEIER, D. Caracterização anatomopatológica e bacteriológica em frangos de corte condenados totalmente por colibacilose sob Serviço de Inspeção Federal. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. Seropédica/RJ, v. 37, p. 949-957, 2017.

DE OLIVEIRA ALMEIDA, T. J., DE ASSIS, A. S., MENDONÇA, M.; DE QUEIROZ ROLIM, M. B. Causas de condenação de carcaças de *Gallus gallus domesticus* em abatedouros frigoríficos sob Inspeção Federal no Nordeste do Brasil. **Medicina Veterinária (UFRPE)**, Recife/PE, v.11, p. 285-291, 2018.

FERREIRA, A. J. P.; KNÖBE, T. Enfermidades bacterianas, p.435-563. In: Berchieri Jr A. & Macari M. (Eds), Doenças das Aves. FACTA, Campinas, 2008.

FLORES, A. M. P. C.; MELO, C. B. Principais bactérias causadoras de doenças de origem alimentar. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, Rio de Janeiro/RJ, v.37, n.1, p.65-72, 2015.

GEORGIA POULTRY LABORATORY. **Monitoring and detection of Salmonella in poultry and poultry environments**. Oakwood: Georgia Poultry Laboratory, 1997, 293p. [Workshop].

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. A.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN. W. C. **Diagnóstico Microbiológico – Texto e Atlas Colorido**. Ed. 5. Rio de Janeiro: Medsi, 2010.

KUCHENNY, F. B.; MORAES, F.R. Coccidiose em frangos de corte: Revisão de literatura. **PUBVET**, Londrina/PR, v. 3, n. 15, Art#564, 2009.

LUNA, L. G. **Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces**. Institute of Pathology. 3 ed. New York: McGraw-Hill, 1968. 258p.

MACLACHLAN, N.J.; CULLEN, J.M. Fígado, sistema biliar e pâncreas exócrino. In: THOMSON, R.G. (Ed.). **Patologia Veterinária Especial**. 2.ed. Porto Alegre: Artmed, p.265-298, 1998.

MOSLEH, N., DADRAS, H., ASASI, K., TAEBIPOUR, M. J., TOHIDIFAR, S. S., FARJANIKISH, G. Evaluation of the timing of the *Escherichia coli* co-infection on pathogenicity of H9N2 avian influenza virus in broiler chickens. **Iranian Journal of Veterinary Research**, Morbi/India, v.18, p. 86-89, 2017.

NOLAN, L. K., BARNES, H. J., VAILLANCOURT, J. P., ABDUL-AZIZ, T.; LOGUE, C. M. Colibacillosis. **Diseases of poultry**, p. 751-805, 2013.

SILVA, I. M. M.; BALIZA, M.; SANTOS, M. Presença de *Escherichia coli* em fígados de frangos provenientes de matadouros avícolas. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador/BA, v. 13, n. 3, p. 694-700, jul./set., 2012.