

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA**

**MÉRCIA RODRIGUES BARROS**

**EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DAS INFECÇÕES POR *Mycoplasma* spp.,  
*Escherichia coli* e *Staphylococcus* spp., EM FRANGOS DE CORTE E POEDEIRAS  
COMERCIAIS NO ESTADO DE PERNAMBUCO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciência Veterinária.

Orientador: **Prof. Dr. Rinaldo Aparecido Mota**

Co-orientadora: **Profa. Dra. Andrea Alice da Fonseca Oliveira**

**RECIFE**

**2011**

Ficha Catalográfica

B277e

Barros, Mércia Rodrigues

Epidemiologia molecular das infecções por *Mycoplasma* spp., *Escherichia coli* e *Staphylococcus* spp., em frangos de corte e poedeiras comerciais no estado de Pernambuco / Mércia Rodrigues Barros . -- 2011.  
147 f. : il.

Orientador: Rinaldo Aparecido Mota.

Tese (Doutorado em Ciência Veterinária) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Veterinária, Recife, 2011.  
Referências.

1. Frango de corte 2. Poedeira comercial 3. Epidemiologia  
4. Doenças 5. Diagnóstico 6. Genes de virulência 7. Antibióticos  
I. Mota, Rinaldo Aparecido, Orientador  
II. Título

CDD 636.513

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA**

**EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DAS INFECÇÕES POR *Mycoplasma* spp.,  
*Escherichia coli* e *Staphylococcus* spp., EM FRANGOS DE CORTE E POEDEIRAS  
COMERCIAIS NO ESTADO DE PERNAMBUCO**

Tese de Doutorado elaborada por

**MÉRCIA RODRIGUES BARROS**

**Aprovada em ...../...../.....**

**BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr. Rinaldo Aparecido Mota  
Orientador- Departamento de Medicina Veterinária

Profa. Dra. Tomoe Noda Saukas  
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof. Dr. Elmiro Rosendo do Nascimento  
Universidade Federal Fluminense

Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira  
Universidade Estadual de Campinas

Prof. Dr. Mateus Matiuzzi da Costa  
Universidade Federal do Vale do São Francisco

## DEDICO

Aos meus Heróis, **José Lacerda Barros e Florisa Rodrigues Barros**, que com muita sabedoria, amor e dedicação ofereceram aos seus nove filhos o maior bem que um ser humano pode adquirir os valores moral, intelectual e espiritual. Sempre respeitando em cada um as suas diferenças e compreendendo as nossas decisões diante das escolhas que fizemos na vida. Muito obrigada pelo vosso amor e por serem meus pais.

Aos meus irmãos **Heliem, Chermont, Iolanda, Elza, Sírléis, Adalberon, Teilhard e Conceição** por me incentivarem sempre na busca dos meus ideais e pela união e amor que nos une. Aos meus sobrinhos e toda minha família, obrigada por fazerem parte da minha vida.

## OFEREÇO

Ao Prof. Dr. **Rinaldo Aparecido Mota** meu anjo terreno, orientador e amigo, que iluminou a minha vida como sol indescritível, como vento brando refrescou os meus dias, como semente humilde, você é enorme, por que semeou o solo da minha vida profissional e pessoal com ensinamentos valiosos e eternos, me mostrando que as incertezas poderiam tornar-se realidade. Se me tornei grande foi por que me apoiei em teus braços de gigante.

## AGRADECIMENTOS

A ti sou grata verdadeiro DEUS, que ilumina minha vida e faz com que eu perceba com os sentidos da alma o movimento íntimo de todas as coisas.

Em especial, a Profa. Dra. Tomoe Noda Saukas pela amizade e ajuda no momento em que mais precisei, estendeu-me mãos amigas e acima de tudo ofereceu o que há de melhor no ser humano a vontade de servir.

À minha irmã Elza e meu sobrinho Carlinhos em especial pelo amor, compreensão e por me oferecerem um lar harmonioso, sendo meus amigos fiéis durante toda essa trajetória.

À minha grande amiga Ana Paula Santos (Aninha) que com sua incansável disponibilidade e ajuda, foi sempre em busca de material para realização desta pesquisa.

Ao Médico Veterinário Glédiston Posso por nos convidar a realizar uma pesquisa básica para contribuir com a avicultura do Estado de Pernambuco e pelo apoio financeiro.

Ao meu amigo Sérgio Alcântara que em todos os momentos sentia que eu precisava de ajuda, e estava sempre pronto a me auxiliar.

À Vanessa Anny (ex-aluna) que se tornou minha amiga e que me ajudou em todos os momentos, és muito importante na minha vida.

À minha Co-orientadora Profa. Dra. Andrea Alice da Fonseca Oliveira pela amizade e por sermos irmãs de coração e ao Prof. Dr. José Wilton Pinheiro Júnior pela amizade e por me ajudar com muita atenção a realizar a análise estatística.

Ao Prof. Dr. Leonildo Bento Galiza e Prof. Dr. Leucio Alves, pela amizade e em todos os momentos sempre me ajudarem com atenção e carinho.

Ao Prof. Dr. Elmiro Rosendo do Nascimento por me receber com muito carinho, em seu Laboratório na UFF e por ter contribuído de forma valiosa com esta pesquisa. E a todos do Laboratório em especial a Profa. Dra. Vírginia Léo de Almeida, Sandra, Leandro, Rita de Cássia, Dayse e a Dra. Maria Lúcia Barreto do Núcleo de Animais de Laboratório da Universidade Federal Fluminense pela ajuda e contribuição.

Ao Prof. Dr. Mateus Matiuzzi da Costa, D. Erani e Gabriel pelo convívio e carinho em seu lar durante minha estada em Petrolina e por contribuir na realização desta pesquisa. E a todos do Laboratório da UNIVASF em especial a Jarbas, Chirles e Samara por me ajudarem.

Ao Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira pelo apoio financeiro, proporcionando minha ida a Campinas e por ter me recebido com muito carinho em seu Laboratório na UNICAMP, contribuindo com esta pesquisa. E a todos do Laboratório em especial a Sandra Queiroz, Gerson Nakazato e Fernanda por me ajudarem.

A Profa. Dra. Janete Magali de Araújo e a mestranda Elizianne Pereira Costa do Departamento de antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco por nos auxiliar na técnica de concentração inibitória mínima.

A todos do Laboratório de Doenças Infecto-contagiosas (Bacterioses) do DMV/UFRPE, Érica Moraes e Nair (minhas novas amigas), Érica Samico, Vanessa, Pomy, André, Pedro, Orestes, Andrey, Raíssa, Elizabeth, Eduardo Farias, Eduardo Guelfer, Rodolfo Godoy, D. Guiomar e D. Márcia que fizeram da convivência diária um grande aprendizado, mostrando-me que quando trabalhamos em equipe fortalecemos elos indestrutíveis.

Aos meus amigos Alexandre, Sandrinha, Vane e meu cunhado Valdevile (Júnior) que sempre me ajudaram em todos os momentos com atitudes ou palavras de conforto.

Às minhas amigas Sineide Vilela, Anízia Lapenda, Águeda Pimentel, Joanna Dourado, Andréa Paiva e Karen Mascaro, por me ajudarem cada uma da sua forma, mas sempre com muito carinho e atenção.

Aos meus amigos Wagner Porto, Wilson Porto, Flaviana Wanderley, Isabel Acioli e Karla Patrícia pela amizade e por compartilharmos momentos únicos na época em que trabalhamos juntos no CESMAC.

Aos meus amigos Mauro Bezerra, José de Jesus e Gileno Xavier pela amizade e pelas palavras de estímulo, conforto e momentos descontraídos que compartilhamos.

Ao meu primo Adalberon e família, Tia Rosenir e família por me receberem de braços abertos e serem sempre afetuosos nos momentos em que estive em São Paulo.

Aos meus ex-alunos Gerson Guimarães, João Aguiar, Eduardo Gomes, David Barbosa e Alessandra Paulino por me auxiliarem em todos os momentos do experimento, sempre prontos e dispostos a ajudarem.

A minha amiga Tânia Alencar e família, que sempre me incentivou com palavras de fé, mostrando-me que Deus guia todos os nossos passos.

À Sandra Marquez, Sheyla Grellet e Ana Paula do Laboratório BIOVET, por me receberem com muito carinho e atenção, contribuindo com conhecimentos científicos valiosos durante o tempo em que estive em São Paulo.

A Dr. Paulo César Martins e Dr. Willian Turco, por nos fornecerem material para realização desta pesquisa e pelas nossas conversas científicas em todos os momentos que nos encontrávamos aqui em Recife.

Aos Médicos Veterinários de campo que fazem parte da avicultura do Estado de Pernambuco por fornecerem material para realização desta pesquisa.

A equipe do Laboratório de Inspeção de leite da UFRPE, em especial a Andréa, Héliida, Stefânia e Marluce por me auxiliarem.

Aos Professores do DMV-UFRPE, Prof. Dr. Frederico Maia, Prof. Dr. Fernando Leandro, Profa. Dra. Márcia de Figueiredo, Prof. Dr. Lúcio Esmeraldo, Prof. Dr. Pierre Castro e em especial ao Prof. Dr. Mário Menezes pelas palavras de estímulo e por me ajudar sempre nos momentos em que precisei.

A todos os meus alunos da UFRPE, quando tive a oportunidade de ser Profa. substituta (Ornitopatologia) e ter o privilégio de compartilhar momento único em sala de aula, ensinando e aprendendo também com todos vocês.

A todos que fazem parte da coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária da UFRPE, em especial ao secretário Tom Menezes pela eficiência na realização do seu trabalho e atenção com todos os pós-graduandos.

Aos funcionários Ramiro, Marisa, Patrícia e a Dra. Antônia Sherlânea Pró-Reitora de Pesquisa da Pró-Reitoria da Pós-Graduação da UFRPE pela atenção dispensada a mim nos momentos em que precisei.

A todos da Biblioteca da UFRPE Suely Manzi, Ana Katarina de Araújo, Ana Catarina Macedo, Edna, Hamilton Albuquerque e Edson Cordeiro do Nascimento que me ajudaram sempre com muita atenção.

Aos animais, meu respeito e admiração, em especial as aves de produção que serviram como modelo experimental para realização desta pesquisa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro, contribuindo de forma valiosa para que esta pesquisa fosse realizada.



“Pouco conhecimento faz com que as criaturas se sintam orgulhosas. Muito conhecimento, que se sintam humildes. É assim que as espigas sem grãos erguem desdenhosamente a cabeça para o céu, enquanto que as cheias as baixam para a terra, sua mãe!”

*Leonardo da Vinci*

**RESUMO:** Objetivou-se com este trabalho estudar a epidemiologia molecular das infecções por *Mycoplasma* spp., *Escherichia coli* e *Staphylococcus* spp., em frangos de corte e poedeiras comerciais no Estado de Pernambuco. Foram utilizadas 120 aves provenientes de 24 granjas, das quais 55 frangos de corte sadios, 35 com sinais respiratórios e 30 poedeiras comerciais com sinais respiratórios e digestivos. Para a pesquisa de *Mycoplasma* spp., utilizou-se o exame bacteriológico e a reação em cadeia da polimerase (PCR) e Nested-PCR. Para o isolamento de *Escherichia coli* foi utilizado o meio ágar Eosina Azul de Metileno (EMB), o teste de patogenicidade *in vitro* foi realizado em ágar oxalato de magnésio acrescido de vermelho congo, enquanto a PCR foi realizada para avaliar a presença de genes de virulência e determinação filogenética dos grupos em A, B1, B2 e D. Para o estudo de citotoxicidade, as amostras foram inoculadas em células Vero e para a detecção de plasmídios foi utilizada a extração de DNA e visualização do perfil plasmidial. Para o isolamento de *Staphylococcus* spp., utilizou-se o exame bacteriológico, com provas bioquímicas para a identificação das espécies. Verificou-se a formação de biofilme em ágar Vermelho Congo (ACR), e detecção do gene *mecA* pela PCR. Para *Escherichia coli* e *Staphylococcus* spp., realizou-se perfil de resistência através dos testes de disco difusão e Concentração Inibitória Mínima (CIM). Na PCR para *Mycoplasma* spp., observou-se que sete (29,17%) amostras foram positivas para MS e uma (4,17%) para MG em amostras de aves com sinais respiratórios, sendo a amostra positiva confirmada como cepa vacinal MG-F; no exame bacteriológico todas as amostras foram negativas. Dos 35 isolados de *Escherichia coli* submetidos a PCR, o número de isolados positivos para os genes de virulência foi: *iss* (16), *iutA* (10), *hlyF* (17), *ironN* (11), *ompT* (16), *crl* (10), *fimA* (14), *tsh* (5), *papA* (2), *csgA* (0) e *iucA* (2). Foram classificados filogeneticamente nos grupos A (71,42%) e B1 (28,58%). A presença de hemólise em ágar sangue foi superior à detecção do gene *hlyF* pela PCR. O teste de patogenicidade em ágar vermelho congo revelou cinco (14,29%) isolados positivos e para avaliação da citotoxicidade *in vitro* em células Vero todos os isolados foram negativos. No perfil de resistência aos antimicrobianos observou-se que 33 (94,28%) isolados foram resistentes a três ou mais antibióticos e a lincomicina apresentou o maior percentual de resistência (100%). Na CIM observou-se multirresistência a vários antimicrobianos. Quanto aos plasmídios observou-se frequência de 80,0% (28/35) nos isolados de *E. coli*, onde 16 isolados apresentaram plasmídio de 88 MDa. Das 24 amostras processadas foram isolados 16 *Staphylococcus*, sendo cinco coagulase-positiva (SCP) e 11 coagulase negativa (SCN),

e no teste de produção de biofilme, seis (37,5%) isolados foram positivos. Na PCR para detecção do gene *mecA* todos os isolados foram negativos. Observou-se que 15 isolados apresentaram perfil de multirresistência a antimicrobianos. Com base nos resultados obtidos, essas bactérias participam da doença respiratória na população estudada e devem ser consideradas nas medidas de controle e tratamento nos plantéis avícolas em conjunto com a realização de testes *in vitro*.

**Palavras-chave:** Frangos de corte, poedeiras comerciais, doença respiratória, diagnóstico, antibióticos

**ABSTRACT:** This investigation had the objective of studying the molecular epidemiology of infections by *Mycoplasma* spp., *Escherichia coli* and *Staphylococcus* spp., in broilers and commercial layers of the state of Pernambuco. A hundred and twenty birds were used from 24 flock of which 55 healthy broilers, 35 broilers and 30 commercial layers with respiratory and digestive signs. For the study of *Mycoplasma* spp., the bacteriological exam, the Polymerase Chain Reaction (PCR) and Nested-PCR were used. For the isolation of *Escherichia coli* the medium Eosine Methylene Blue Agar (EMB) was used. The pathogenicity test *in vitro* was carried out in Congo Red magnesium oxalate agar while the PCR was used, to evaluate the presence of virulence genes and the phylogenetic determination of groups A, B1, B2 and D. For the study of cytotoxicity, the samples were inoculated in Vero cells. For the detection of plasmids, the extraction of DNA and the visualization of the plasmid profile was used. For *Staphylococcus* spp., isolation the bacteriological exam was used, with biochemical proof of species identification. The formation of the biofilm Congo Red Agar (ACR), and the detection of the *mecA* gene by PCR were verified. For *Escherichia coli* and *Staphylococcus* spp., a resistance profile was carried out through tests of disc diffusion and Minimum Inhibitory Concentration (MIC). In the PCR for *Mycoplasma* spp., it was observed that seven (29.17%) samples were positive for MS and one (4.17%) for MG, in samples of birds with respiratory signs, the positive sample was further confirmed as vacinal strain MG-F; in the bacteriological exam all samples were negative. From the 35 isolated *Escherichia coli* submitted to PCR, the number of positive *E. coli* isolates for virulence genes of were: *iss* (16), *iutA* (10), *hlyF* (17), *ironN* (11), *ompT* (16), *crl* (10), *fimA* (14), *tsh* (5), *papA* (2), *csgA* (0) and *iucA* (2). They were phylogenetically classified into groups A (71.42%) and B1 (28.58%). The presence of hemolysis in agar blood was superior to the detection of the *hlyF* gene by the PCR. The pathogenicity test in Congo Red agar showed five (14.29%) positive isolated *E. coli*, and for the cytotoxicity evaluation *in vitro*, in Vero cells, all the isolated *E. coli* were negative. On the resistance profile to antimicrobials, it was observed that 33 (94.28%) of the *E. coli* isolates were resistant to three or more antibiotics and that lincomicine presented the highest percentage of resistance (100%). On the CIM, multiresistance to various antimicrobials was observed. With respect to the plasmids, a frequency of 80.0% (28/35) was observed in *E. coli* isolates, where 16 *E. coli* isolates presented plasmid of 88 MDa. From the 24 processed samples 16 *Staphylococcus* isolates were, five being coagulasis-positive (SCP) and 11 coagulasis-negative (SCN). The biofilm production

test, six (37.5%) isolates were positive. Regarding PCR for the detection of the *mecA* gene, all the isolates were negative. It was observed that 15 isolates presented a multiresistance profile to antimicrobials. Based on the results, these bacteria participate in the respiratory disease of the studied chickens populations and they must be considered in the control and treatment measures used in aviculture, together with the performance of *in vitro* tests.

**Key Words:** broilers; commercial layers; respiratory disease; diagnosis; antibiotics.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### Artigos Científicos

#### Artigo 1

Figura 1 - Resultados dos amplicons obtidos na PCR e Nested-PCR para detecção de *Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma synoviae*. 74

#### Artigo 3

Figura 1 - Perfil plasmidial detectado em isolados de *Escherichia coli* de frangos de corte e poedeiras comerciais. 120

## LISTA DE TABELAS

### Revisão de Literatura

Tabela 1. Surtos de Micoplasmose no Brasil causados por *Mycoplasma gallisepticum*, notificados à OIE no período de 2006 a 2009 22

Tabela 2. Surtos de Micoplasmose no Brasil causados por *Mycoplasma synoviae*, notificados à OIE no período de 2006 a 2009 23

### Artigos Científicos

#### Artigo 1

Tabela 1. Primers utilizados nas reações de PCR e Nested-PCR para detecção de *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae* e cepa vacinal MG-F 67

#### Artigo 2

Tabela 1. Perfil de genes de virulência e determinação dos grupos filogenéticos de isolados de *Escherichia coli* dos seios infra-orbitários e conteúdo cecal de origem aviária 87

#### Artigo 3

Tabela 1. Perfil de resistência dos isolados de *E. coli* de frangos de corte e poedeiras comerciais no Estado de Pernambuco 111

Tabela 2. Perfil de resistência dos isolados de *E. coli* de seios infra-orbitários e conteúdo cecal de frangos de corte e poedeiras comerciais no Estado de Pernambuco 111

Tabela 3. Determinação da concentração inibitória mínima dos isolados de *E. coli* de frangos de corte e poedeiras comerciais no Estado de Pernambuco 112

#### Artigo 4

Tabela 1. *Staphylococcus* spp. isolados dos seios infra-orbitários de frangos de corte e poedeiras comerciais no Estado de Pernambuco 133

Tabela 2. Perfil de resistência dos isolados de *Staphylococcus* spp. isolados dos seios infra-orbitários de frangos de corte e poedeiras comerciais no Estado de Pernambuco 134

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\mu\text{L}$	Microlitro
$\mu\text{g}$	Micrograma
ml	Mililitro
$\mu\text{M}$	Micromolar
pmol	Picomol
MDa	Mega Daltons
Taq	Thermus Aquaticus
dNTP	Deoxinucleotideo trifosfato
$\text{MgCl}_2$	Cloreto de Magnésio
DNA	Deoxiribonucleic Acid
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
EMB	Eosina Methilene Blue
BHI	Brain Heart Infusion
TSI	Triplíce sugar Iron
VM	Vermelho de Metila
VP	Voges Proskauer
SIM	Indol Motilidade gás Sulfídrico
CIM	Concentração Inibitória Mínima
LB	Luria Bertani
PAB	Ágar Púrpura Base
GSS	Glicose Semi Sólida
MSS	Manitol Semi Sólido
ACR	Ágar Vermelho Congo
APEC	<i>Escherichia coli</i> patogênica para aves
ATCC	American Type Culture Collection
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
PNSA	Programa Nacional de Sanidade Avícola



## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b>	17
<b>OBJETIVOS</b>	19
Geral	19
Específicos	19
<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	20
<b>Impacto dos problemas respiratórios em aves de produção industrial</b>	20
<b>Micoplasmose</b>	21
<i>Escherichia coli</i>	28
<i>Staphylococcus</i>	37
<b>REFERÊNCIAS</b>	43
<b>ARTIGO 1- Ocorrência de <i>Mycoplasma synoviae</i> em frangos de corte e poedeiras comerciais no Estado de Pernambuco, Brasil</b>	61
<b>ARTIGO 2- Genes de virulência em <i>Escherichia coli</i> isolada de frangos de corte e poedeiras comerciais no Estado de Pernambuco, Brasil</b>	79
<b>ARTIGO 3- Resistência antimicrobiana e perfil plasmidial de <i>Escherichia coli</i> isolada de frangos de corte e poedeiras comerciais no Estado de Pernambuco, Brasil</b>	104
<b>ARTIGO 4- Perfil de resistência a antimicrobianos de <i>Staphylococcus spp.</i>, isolados de frangos de corte e poedeiras comerciais no Estado de Pernambuco</b>	126
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	147

## INTRODUÇÃO

A avicultura no Brasil é uma das atividades da agropecuária que mais tem se desenvolvido. Este progresso, tanto em número de frangos abatidos como de ovos produzidos possibilitou à indústria avícola, notável potencial para prover aos consumidores fonte protéica saudável e a um baixo custo (BOLIS et al., 2001).

Nos últimos anos a produção de frangos de corte mundial aumentou intensivamente, e o Brasil ocupa a posição de primeiro exportador de carne de frango e terceiro maior produtor. Em 2005, a carne de frango brasileira foi exportada para 142 países, com crescimento significativo de mais de 2,8 milhões de toneladas. A produção nacional de carne de frango chegou a cerca de 10,2 milhões de toneladas em 2009. A maior parcela dessa produção tem sido destinada à exportação, mesmo por que o Brasil ainda tem um consumo *per capita* moderado de 38 kg/hab/ano (UBA, 2009).

O estado de Pernambuco é o maior produtor de ovos da região Norte e Nordeste, tendo produzido em 2006 cerca de 4,224 milhões de caixas, o que representa 35% do total produzido na região e 5,7% em relação ao Brasil; desta forma o Estado ocupa a quinta posição no *ranking* nacional, segundo a União Brasileira de Avicultura. Na produção de carne de frango, Pernambuco é o segundo produtor da região Norte e Nordeste e em 2006 a avicultura pernambucana produziu 244 mil toneladas de carne de frango, representando 29% do que é produzido no Nordeste e 2,6% da produção brasileira. A avicultura de Pernambuco é uma cadeia bastante consolidada, que atende às exigências do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, o que a habilita para a comercialização nos mercados nacional e internacional (SEBRAE, 2008).

Apesar da tecnificação na produção avícola mundial, as aves de produção são suscetíveis a surtos de doenças infecciosas relacionadas a grandes perdas econômicas. Entre os principais problemas responsáveis por prejuízos diretos ou indiretos à produtividade avícola, encontram-se as infecções por vírus, fungos, protozoários e bactérias que causam doenças nas aves (ANDREATTI FILHO, 2007a). A produção intensiva na indústria avícola proporciona condições favoráveis que permitem a ocorrência e a disseminação das doenças infecciosas do trato respiratório (MINHARRO et al., 2001).

A grande concentração avícola e o alojamento de lotes com aves de múltiplas idades dificultam a criação de aves livres de patógenos. A transmissão horizontal tem

grande potencial na difusão dos agentes causadores de problemas respiratórios dentro de uma mesma granja, ou entre granjas, de uma mesma região (BUIM et al., 2006).

Neste contexto, é imprescindível a utilização de um programa de biossegurança, objetivando a manutenção de plantéis livres ou controlados de microorganismos, impedindo o impacto negativo sobre a produção avícola ou à saúde pública (SALLE; SILVA, 2000). O programa de biossegurança na prática deverá estabelecer barreiras físicas, químicas e biológicas de modo a evitar a entrada e impedir a disseminação de patógenos e vetores, que devem ser controlados ou mesmo erradicados (ANDREOTTI; GUIMARÃES, 2003). O emprego do conjunto de medidas profiláticas é capaz de manter a integridade saudável do indivíduo, e que se adotadas integralmente seriam teoricamente capazes de garantir o bom estado sanitário do plantel, evitando as enfermidades nas aves de produção (NETO et al., 2001).

Devido à importância que a avicultura brasileira exerce no cenário sócio-econômico foi instituído a partir de 1994, o Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA) pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), visando controlar ou erradicar por meio da vigilância epidemiológica e sanitária as doenças em plantéis avícolas. Desta forma, consiste em um plano de contingência, com um conjunto de ações e decisões emergenciais, que devem ser tomadas na hipótese de uma doença ou suspeita de sua ocorrência em um lote. Esse plano enfoca as enfermidades que determinam prejuízos econômicos e que tem importância na saúde pública e animal como a Doença de Newcastle, Influenza aviária, Salmoneloses e Micoplasmoses (BRASIL, 1994).

Considerando-se a ausência de registros sobre os agentes infecciosos bacterianos envolvidos em doenças respiratórias no Estado de Pernambuco, propôs-se a realização desse estudo para avaliar a ocorrência de patógenos como *Mycoplasma* spp., *Escherichia coli* patogênica e *Staphylococcus* spp., e dessa forma contribuir para o melhor conhecimento dos aspectos sanitários das criações de frangos de corte e poedeiras comerciais nesta região.

## OBJETIVOS

### Geral

Pesquisar *Mycoplasma* spp., *Escherichia coli* e *Staphylococcus* spp., envolvidos na doença respiratória em frangos de corte e poedeiras comerciais no estado de Pernambuco.

### Específicos

- Isolar e identificar por meio da reação em cadeia de polimerase (PCR) *Mycoplasma* spp., do trato respiratório de frangos de corte com e sem sinais clínicos respiratórios e de poedeiras comerciais com sinais clínicos;
- Pesquisar genes relacionados com fatores de virulência em isolados de *Escherichia coli* de frangos de corte e de poedeiras comerciais;
- Determinar o perfil plasmidial de resistência em amostras de *Escherichia coli* isoladas de frangos de corte e de poedeiras comerciais;
- Pesquisar o gene *mecA* relacionado à resistência a meticilina e oxacilina em isolados de *Staphylococcus* spp., de frangos de corte e de poedeiras comerciais;
- Avaliar o perfil de multirresistência antimicrobiana *in vitro* dos isolados de *Escherichia coli* e *Staphylococcus* spp., de frangos de corte e de poedeiras comerciais frente aos antibióticos utilizados na avicultura comercial.

## REVISÃO DE LITERATURA

### **Impacto dos problemas respiratórios em aves de produção industrial**

A contínua intensificação da produção no setor avícola propicia determinadas condições que favorecem a ocorrência e a disseminação de algumas doenças infecciosas, principalmente aquelas relacionadas ao trato respiratório (MINHARRO et al., 2001). A exposição à amônia ambiental, micotoxinas e nutrição de qualidade inferior podem diminuir a imunidade inata. A doença infecciosa da bursa (DIB), anemia infecciosa das galinhas (CIA) e doença de Marek (MD) são as principais doenças infecciosas que aumentam a suscetibilidade às infecções virais, bacterianas e parasitárias e interferem com a imunidade adquirida vacinal (HOERR, 2010).

A estrutura do sistema respiratório em aves é muito diferente dos mamíferos, primariamente porque as aves têm sacos aéreos. Essas estruturas são muito suscetíveis a danos e respondem tornando-se mais espessas e infiltradas por células inflamatórias e exsudato (BERCHIERI; MACARI, 2000). As doenças respiratórias de etiologia desconhecida vêm afetando as aves de produção há vários anos, causando prejuízos econômicos aos produtores e às empresas avícolas. A prevalência e a severidade das doenças respiratórias em frangos de corte comercial tem aumentado devido à intensificação da indústria avícola (ANONYMOUS, 2006).

As doenças respiratórias que acometem as aves domésticas criadas comercialmente geram perdas econômicas pelo aumento da mortalidade, gastos com medicamentos, queda de postura, redução na qualidade e eclodibilidade dos ovos. Diferentes vírus e bactérias podem ser responsáveis por patologias no trato respiratório das aves, atuando isolados ou associados a outros microorganismos (GLISSON, 1998; MINHARRO et al., 2001; CANAL et al., 2003), e uma grande variedade de doenças podem estar associadas com estafilococos patogênicos (AARESTRUP et al., 2000). De acordo com Buim (2006) a micoplasmose apresenta-se como um dos principais problemas sanitários na cadeia produtiva avícola, juntamente com a doença de Newcastle, coccidiose, colibacilose, doença de Gumboro e a salmonelose.

Cada vez mais as enfermidades respiratórias das aves se apresentam de forma complexa e com caráter de síndrome. Vários são os agentes envolvidos e, dependendo dos meios e métodos de diagnóstico disponíveis alguns laboratórios de patologia chegam a diferentes diagnósticos. Os agentes infecciosos que podem causar quadros de

complexo respiratório aviário quando associados são: vírus vivos vacinais (bronquite infecciosa/BI; doença de Newcastle/VDN), BI por cepas tradicionais ou variantes, Metapneumovírus aviário (síndrome da cabeça inchada), Laringotraqueíte infecciosa por cepas de diferentes patogenicidades, *M. gallisepticum*, *M. synoviae*, *E. coli* patogênica aviária, *Avibacterium paragallinarum* (coriza infecciosa) de diferentes sorotipos, *Pasteurella multocida* (cólera aviária), *Gallibacterium anatis* biovar *haemolytica* e *Ornithobacterium rhinotracheale* (MARTINS, 2010).

Frangos, perus e outras aves de produção em ambiente de produção podem ser expostos a fatores de estresse e doenças infecciosas que comprometem a imunidade inata e adquirida, comprometendo a saúde e bem-estar, podendo favorecer a diminuição do potencial genético e nutricional, determinando desta forma, uma produção menos eficiente (HOERR, 2010). Além disso, a infecção em aves pode atuar como barreira sanitária para a comercialização de produtos e subprodutos aviários, pois alguns patógenos são listados como doenças de notificação obrigatória pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE, 2006).

### **Micoplasmose**

Micoplasma é a denominação trivial para os microorganismos da divisão Tenericutes e da classe Mollicutes (Mollis/macio; cútis/pele). São caracterizados pela ausência de parede celular, decorrente da falta de informação genética para sua síntese, fato este que os distingue das eubactérias. Dentro da classe Mollicutes existem cinco ordens e seis famílias, sendo a família *Mycoplasmataceae* com os gêneros *Mycoplasma* e *Acholeplasmataceae*, as únicas de interesse para as aves. Os micoplasmas são os menores procariontes conhecidos e assemelham-se em tamanho aos grandes vírus (300 nm); têm formato cocóide, cocobacilar ou pleomórficos, medem 200-300 nm, são Gram negativos, mas se coram pelo Giemsa ou outros corantes similares (NASCIMENTO, 2000).

Devido à ausência de parede celular, por muito tempo vinham sendo considerados parasitas extracelulares exclusivos, e a presença de forma filamentosa, originalmente permitiu que essas bactérias fossem chamadas de micoplasmas (mico/fungo e plasma/ flexível), em virtude da semelhança com os fungos (TIMENETSKY, 2009). Apesar do seu número limitado de genes, os micoplasmas aviários desenvolveram mecanismos adaptativos altamente evoluídos, possibilitando escapar do

sistema imunológico e até mesmo sobreviver induzindo uma infecção prolongada. Estes mecanismos evoluíram de forma independente em cada uma das espécies de micoplasma e tem implicações para o desenvolvimento de testes diagnósticos e vacinas para micoplasmose aviária (NOORMOHAMMADI, 2007).

*Mycoplasma gallisepticum* (MG), *Mycoplasma synoviae* (MS) e *M. meleagridis* (MM) são micoplasmas patogênicos, sendo que este último acomete somente perus, causando prejuízos para os produtores. São as principais espécies de micoplasmas que causam infecções nas aves de interesse econômico (LAUERMAN et al., 1993), sendo registrada uma grande variação na sua virulência (WEINACK; SNOEYENBOS, 1976; LEVISHON et al., 1986; SOERIPTO et al., 1989), resultando em diferentes manifestações clínicas (FEBERWEE et al., 2005).

A maioria dos micoplasmas é relativamente não invasivo, mas algumas espécies incluindo MG são conhecidas pela capacidade de penetração nas células (WINNER et al., 2000). A variação da expressão fenotípica das principais proteínas imunogênicas da superfície podem também ser um fator importante na patogênese (GLEW et al., 2000; PAPAZISI et al., 2002). São consideradas enfermidades infecto-contagiosas de distribuição mundial e a doença afeta indistintamente frangos de corte, aves de postura comercial e reprodutoras, causando altas perdas econômicas (NASCIMENTO, 2000).

Os micoplasmas são amplamente distribuídos no mundo e as doenças causadas pelo MG e MS fazem parte da lista de doenças notificáveis à Organização Mundial de Saúde Animal (OIE, 2010). Os dados referentes a surtos em vários Estados do Brasil foram informados pela OIE, para ambos os agentes, em levantamentos realizados nos anos de 2006 a 2009 de acordo com os dados apresentados na tabela 1. Estes agentes constam na lista de organismos que devem ser monitorados pelo PNSA para o seu controle e erradicação (BUIM et al., 2002).

**Tabela 1.** Surtos de Micoplasmose no Brasil causados por *Mycoplasma gallisepticum*, notificados à OIE no período de 2006 a 2009

<b>Estados</b>	<b>2006</b>	<b>2007</b>	<b>2008</b>	<b>2009</b>
Goiás	-	-	-	02
Pernambuco	-	-	01	-
Pará	-	-	01	-
Rio Grande do Sul	-	-	01	-
Santa Catarina	05	03	-	-
São Paulo	134	99	157	47

Fonte: OIE, 2010.

**Tabela 2.** Surtos de Micoplasmose no Brasil causados por *Mycoplasma synoviae*, notificados à OIE no período de 2006 a 2009

<b>Estados</b>	<b>2006</b>	<b>2007</b>	<b>2008</b>	<b>2009</b>
Sergipe	-	01	-	-
Bahia	01	-	-	-
Mato Grosso do Sul	-	-	-	05
Minas Gerais	-	-	-	04
Pernambuco	17	-	12	17
Rio Grande do Sul	18	22	21	47
Santa Catarina	02	35	67	-
São Paulo	-	01	-	74

Fonte: OIE, 2010.

A transmissão de MG e MS pode ocorrer de forma horizontal, por contato direto entre aves doentes ou infectadas, com aves suscetíveis ou por meio do contato indireto através de pessoas, aves silvestres, água ou materiais de reprodução que podem desempenhar um papel importante na iniciação dos focos de MS (MAROIS et al., 2000). A transmissão horizontal tem grande potencial na difusão dos agentes causadores de problemas respiratórios entre os aviários de uma granja, assim como para diferentes granjas de uma mesma região (BUIM et al., 2006). Outra forma de transmissão é a vertical pelo oviduto produzindo desta forma, ovos e progênies infectadas (NASCIMENTO; PEREIRA, 2009).

Atualmente, sabe-se que MG e MS são capazes de sobreviver no ambiente por períodos mais longos do que anteriormente constatados, aumentando assim o risco de contaminação na criação de aves pela exposição indireta (SHIMIZU et al., 1990; CHRISTENSEN et al., 1994). É provável que a formação de biofilmes possa ser importante para a sobrevivência ambiental do micoplasma (McAULIFFE et al., 2006).

As micoplasmoses aviárias têm sido reconhecidas pelas formas clássicas de enfermidades como doença respiratória crônica (DRC) em galinhas e sinusite em perus causadas por MG (YODER, 1991; NASCIMENTO, 2000; LEY, 2008), sinovite infecciosa e aerossaculite em galinhas e perus causada por MS, sendo essas infecções encontradas no trato respiratório superior (KLEVEN et al., 1991). As doenças causadas por *Mycoplasma* nas aves, geralmente comprometem as vias aéreas superiores e determinam inflamações catarrais nas cavidades nasais, seios nasais, traquéia e brônquios. Acometem também sacos aéreos que se apresentam espessados, opacos e podem conter depósitos de fibrina (NASCIMENTO, 1985; NASCIMENTO, 1992).



A micoplasmose é uma doença de caráter crônico e endêmico, sendo que os efeitos causados se potencializam pelo sinergismo com outros agentes patogênicos que podem estar envolvidos em quadros de infecções respiratórias. A infecção por MG tem um amplo espectro de formas clínicas; a infecciosidade, tropismo pelo tecido e patogenicidade diferem significativamente entre os isolados de MG, mas os fatores que influenciam ainda são desconhecidos (ROSENGARTEN; YOGEV, 1996). Quando estão em combinação com vírus vacinais e *Escherichia coli* podem causar infecções severas de difícil controle. As perdas econômicas são devido à baixa conversão alimentar, diminuição na produção de ovos, aumento na morte embrionária, descarte dos pintainhos nascidos e condenações de carcaças (YODER, 1984; HONG et al., 2005).

Algumas amostras como a cepa padrão MS WVU1 853, são reconhecidas como patogênicas (YOGEV et al., 1988). Uma característica do MS que tem afetado o manejo da doença em granjas avícolas é a variação na patogenicidade entre isolados que causam doenças respiratórias e/ou sinovite. A diferenciação da patogenicidade de isolados não patogênicos pode contribuir para a compreensão da expressão de episódios da doença (LOCKABY et al., 1998). No Brasil ocorrem amostras patogênicas de MS virulentas e avirulentas. Em geral as infecções puras por MS são de baixa intensidade clínica, mesmo assim podem causar redução na produção de ovos na fase crônica da infecção (FIORENTIN et al., 1991). É geralmente assintomática em matrizes de corte no Brasil, mas há possibilidade de desempenhar um papel importante na doença respiratória complexa na progênie. Desta forma, tem motivado as empresas avícolas a considerar a sua erradicação. MS tem sido um assunto de debate durante muitos anos, com importância mundial, principalmente no Brasil (LANDMAN; FEBERWEE, 2004; FEBERWEE et al., 2007; SILVA et al., 2008).

A grande concentração avícola e o alojamento de lotes de aves com múltiplas idades dificultam a criação de aves livres de micoplasmas (BUIM et al., 2006). A maioria das criações de poedeiras comerciais são positivas para MG e MS, e em algumas partes do mundo, ambas infecções são comuns na produção de frangos de corte comerciais (KLEVEN, 2008).

O tratamento com antimicrobianos pode reduzir as manifestações clínicas e, conseqüentemente, o risco de transmissão transovariana a um nível inferior a 0,1% (ORTIZ et al., 1995). Embora este procedimento seja recomendado para poedeiras

comerciais, não elimina MG, MS ou mesmo MM dos plantéis de aves (STIPKOVITS; KEMPF, 1996). Os micoplasmas são naturalmente resistentes aos antibióticos que atuam na parede celular, como a penicilina, mas são sensíveis às tetraciclina (clortetraciclina, oxitetraciclina e doxiciclina), macrolídeos (eritromicina, tilosina, espiramicina, lincomicina e kitasamicina), quinolonas (imequil, norfloxacin, enrofloxacin e danofloxacin) ou tiamulina. Drogas que se acumulam em altas concentrações nas membranas mucosas do trato respiratório e genitourinário, como tiamulina e enrofloxacin (NASCIMENTO et al., 1999) são as preferidas para o tratamento (STIPKOVITS; KEMPF, 1996).

O diagnóstico etiológico de MG, MS e MM e outros micoplasmas é comprometido por antimicrobianos, que bloqueiam ou diminuem a resposta imunitária forçando os micoplasmas a evadirem-se ou ocultarem-se em tecidos, tornando-os indisponíveis para a detecção por cultura ou reação em cadeia de polimerase (PCR) (NASCIMENTO et al., 2005). Esta situação pode ser revertida com a suspensão do tratamento medicamentoso, possibilitando desta forma a detecção de micoplasma (KEMPF, 1991, NASCIMENTO et al., 1999). Esse fenômeno pode ser explicado pela localização intracelular do micoplasma, devido à pressão antimicrobiana e na indisponibilidade posterior do agente para induzir a resposta imune (RAZIN et al., 1998).

Por muitos anos, o diagnóstico foi baseado em testes sorológicos para detectar anticorpos e/ou no isolamento e identificação do microorganismo (KEMPF, 1998). No entanto, o aparecimento de reações sorológicas inespecíficas entre espécies (AVAKIAN et al., 1988; AVAKIAN; KLEVEN, 1990), reação cruzada entre MG e MS (TALKINGTON; KLEVEN 1983; YOGEV et al., 1989), baixa sensibilidade na detecção sorológica de MS (ORTIZ; KLEVEN, 1992) e o tempo prolongado para isolar o agente, muitas vezes limita a eficácia destes procedimentos (GARCIA et al., 1996).

As técnicas de cultivo utilizadas para detecção de micoplasmas são trabalhosas, caras e demoradas e, portanto, inadequadas para um procedimento de rotina (ZAIN; BRADBURY, 1996; BUIM et al., 2002). Problemas encontrados com a cultura incluem o crescimento rápido de outras bactérias ou supressão de crescimento por meio de tratamentos antibióticos administrados às aves (GARCIA et al., 1995). Embora a cultura possa detectar um único organismo, na prática, a eficácia de um organismo para crescer é muito menor e também pode variar entre linhagens diferentes (PAPAZISI et al.,

2003). Além disso, a cultura de um microrganismo pode conter uma porção de células não-viáveis, que são detectados por PCR. Assim, a estimativa de sensibilidade, baseada na quantidade de DNA é maior do que os relacionados com a viabilidade das células (LYSNYANSKY et al., 2005).

A PCR é considerada como uma valiosa ferramenta para o diagnóstico de infecção por micoplasmas (KEMPF et al., 1993; MEKKES; FEBERWEE, 2005). Assim, a estimativa de sensibilidade, baseada na quantidade de DNA é maior do que os relacionados à viabilidade das células (LYSNYANSKY et al., 2005). As técnicas para análise e detecção do DNA através da PCR surgem como uma alternativa de diagnóstico, pela sua sensibilidade, especificidade e capacidade de realização de exames em larga escala (NASCIMENTO et al., 1991), sendo considerados procedimentos eficazes e métodos rápidos para a detecção de infecções naturais e experimentais por MG (KEMPF et al., 1993; NASCIMENTO et al., 1991) e MS (NASCIMENTO et al., 1993). Também pode ser utilizada para diferenciação de cepa de campo e vacinal de MG (NASCIMENTO et al., 1993).

A rápida detecção de infecção por qualquer um desses organismos é de grande importância para a indústria avícola implementar programas de monitoramento eficazes (KEMPF, 1998). Devido aos prejuízos econômicos causados pelas infecções por micoplasmas em aves, algumas estratégias de controle tiveram que ser adotadas. Dessa forma, tornou-se aconselhável a aquisição de aves de um dia, ou mesmo ovos férteis, livres de MG, MS e/ou MM para os sistemas de engorda, postura e reprodução. Em se tratando dos estoques genéticos ou linhagens puras, a condição de ave livre de micoplasma (MG, MS e MM) foi e continua sendo obtida através do tratamento dos ovos férteis, seja por injeção *in ovo* ou por meio de imersão dos ovos férteis em soluções de antibióticos ou por aquecimento (STIPKOVITS; KEMPF, 1996; NASCIMENTO, 2000).

Os programas de controle devem ser baseados na detecção da infecção e eliminação do MS de lotes positivos. No entanto, esta abordagem só é viável se houver uma baixa prevalência no estoque de avós (KLEVEN, 2003). Um fator importante que afeta o manejo em granjas avícolas é a grande variação na patogenicidade e tropismo tecidual entre os isolados de MS, alguns dos quais não causam infecção, enquanto outros causam doença respiratória ou sinovite (KLEVEN, 1997).

O regime de vigilância convencional para a detecção de anticorpos contra MG se baseia em testes sorológicos, embora haja problemas com sua sensibilidade e especificidade (LEVISOHN; KLEVEN, 2000). Para o monitoramento e diagnóstico de MG e MS, os testes sorológicos clássicos são a Soro Aglutinação Rápida (SAR), Inibição da Hemaglutinação (HI) e “Enzyme Linked Immunosorbent Assay” (ELISA) (SALISCH et al., 1998; OIE, 2008). Estes testes não diferenciam os anticorpos de origem vacinal daqueles provenientes de infecção natural (RAZIN et al., 1998). A prova de SAR é usada como procedimento sorológico de triagem para aferir plantéis de aves livres de micoplasmoses (CARDOSO et al., 2003; MENDONÇA et al., 2004), por ser um teste de alta sensibilidade, pouco dispendioso e simples, apresentando contudo baixa especificidade devido ao aparecimento de falsos positivos (BUCHALA, 2003).

Para proteger os plantéis contra surtos de MG e outros patógenos, as práticas de biosseguridade intensivas têm sido implementadas em toda a indústria avícola (EVANS e LEIGH, 2008). Avanços significativos no controle de infecções por MG foram alcançados, desde a introdução de vacinas para essa espécie de micoplasma. No entanto, o ressurgimento da doença tem sido observado (LIU et al., 2001).

Vacinas inativadas e vivas atenuadas estão disponíveis para os avicultores. Embora as vacinas inativadas (bacterinas) utilizadas apenas para MG, não tenham sido bem aceitas no passado, atualmente são preferidas, principalmente porque não há risco de infecção por MG. Entretanto, as cepas de MG mais utilizadas como vacinas vivas são ts-11, 6/85 e MG-F que provocam imunidade prolongada e têm comprovada eficácia contra a queda na produção de ovos (CARPENTER et al. 1981). Confere maior chance de transmissão para aves não vacinadas, o que é útil na substituição de cepas selvagens, auxiliando na erradicação do agente nos plantéis (WHITHEAR, 1996; LEY et al., 1997). De acordo com Nascimento, (2006) outra vacina viva que pode ser utilizada em aves de postura é a MG-70 que apresenta baixa virulência. Contudo, no Brasil não se utiliza vacina viva contra MS (Nascimento et al. 2005).

O controle de MG continua sendo uma grande preocupação na indústria avícola e a rápida expansão em áreas geográficas restritas, com alta concentração de aves de diferentes idades e tipos de criações em locais próximos, torna mais difícil manter criações livres de MG (KLEVEN, 1997). A manutenção de aves livres dos agentes através de medidas de higiene está, porém na dependência do conhecimento da biologia do agente e na epidemiologia da doença (FIORENTIN et al., 1991).

Na maioria das áreas de produção industrial de aves, a ênfase no controle de infecções por Micoplasmas tem sido realizada pela manutenção de lotes de linhagens puras, avós e matrizes livres de patógenos, evitando-se a infecção de matrizes e lotes da produção final pela criação de lotes de idades únicas, alojados em granjas de boa biossegurança com o sistema “all-in all-out”. Esta prática tem sido um sucesso em alguns países e a maioria da produção de frangos, perus e ovos é livre da infecção (KLEVEN, 2004), mas o objetivo de controle total de infecções por micoplasma aviária ainda parece estar além do nosso alcance (KLEVEN, 2008). A erradicação é a medida de controle mais importante para MG e MS em aves de produção comercial (FEBERWEE et al., 2005).

### ***Escherichia coli***

*Escherichia coli* é uma bactéria Gram negativa, anaeróbia facultativa, possui metabolismo respiratório e fermentativo e pertence à família das *Enterobacteriaceae*, a maioria das amostras é móvel devido à presença de flagelos peritríqueos (FERREIRA; KNÖBL, 2000, FERREIRA et al., 2009).

São microorganismos que fermentam a lactose, produzindo colônias de coloração rósea em ágar McConkey e produzem reações específicas nas provas bioquímicas: produção de indol, vermelho de metila, Voges Proskauer e citrato (QUINN et al., 2000). Outros meios seletivos também podem ser utilizados como ágar Eosina Azul de Metileno (EMB) que apresentam colônias esverdeadas com aspecto metálico, ágar Hektoen e ágar Verde Brilante (AVB) com colônias amareladas (FERREIRA, KNÖBL, 2000).

O corpo bacteriano é composto de estruturas antigênicas que contribuem para a determinação dos sorogrupos, baseado na identificação dos antígenos somáticos (Ohne - “O”), capsulares (Kapsel - “K”), flagelares (Hauch - “H”) e fimbriais (Fimbriae - “F”). Atualmente são descritos 181 antígenos somáticos, 100 antígenos capsulares e 56 flagelares (ORSKOV; ORSKOV, 1992; FERREIRA et al., 2009). No Brasil, os sorogrupos mais prevalentes são: O2, O21, O36, O50, O 78, O88, O119 e O152 (FERREIRA; KNÖBL, 2000). Entre os isolados de *E. coli* de aves, os pesquisadores descreveram os sorogrupos patogênicos O1, O2, O5, O35 e O78, entre outros, responsáveis por infecção sistêmica (SOJKA; CARNAGHAN, 1961; BARNES;

GROSS, 1997). As cepas pertencentes aos sorogrupos O1, O2 e O78 são as principais responsáveis por doenças respiratórias e celulite aviária (YANG et al., 2004).

De acordo com Gross (1994) existem cerca de 170 sorogrupos de *E. coli* e as cepas “Avian pathogenic *Escherichia coli*”, denominadas de APEC (IKE et al., 1992; WOOLEY et al., 1998; DHO-MOULIN; FAIRBROTHER, 1999) pertencem principalmente aos sorogrupos O1, O2, O8, O15, O18, O35, O78, O88, O109 e O115. São responsáveis por quadros infecciosos sistêmicos (BARNES et al., 2003) e vários sorogrupos estão relacionados à colibacilose aviária no Brasil e no mundo (FERREIRA; KNÖBL, 2000).

Estirpes virulentas de *E. coli* são clinicamente diferenciadas com base na epidemiologia, sinais e sintomas de suas respectivas doenças, observações microscópicas de suas interações com células do hospedeiro, sorotipos e marcadores genéticos (NATARO; KAPER, 1998). De acordo com Souza (2006) a *E. coli* pode ser classificada em patotipos ou categorias distintas como: enterotoxigênica (ETEC), enteropatogênica (EPEC), enterohemorrágica (EHEC), enteroagregativa (EAEC), enteroinvasiva (EIEC) e difusamente aderente (DAEC).

- Enterotoxigênica (ETEC) pertence a um grupo em que são produtoras de toxinas especiais que estimulam o revestimento intestinal, estimulando a produção de fluidos em excesso, produzindo assim a diarreia. Produz toxinas termoestáveis (STa e STb) e termolábeis (LT). E segundo Spangler, (1992) a enterotoxina LT apresenta similaridade funcional com a toxina do *Vibrio Cholerae*.

- Enteropatogênica (EPEC) causa diarreia infantil em países em desenvolvimento, sendo reconhecida como pertencente a sorogrupos como: O55:H6 e O127:H6. É subdividida em típica (EPEC) e atípica (A-EPEC), onde A-EPEC é a causa mais importante de diarreia. Somente os humanos são reservatórios da EPEC onde a mesma promove lesões do tipo “attaching-effacing” em células eucarióticas. E a A-EPEC pode ser encontrada em humanos e animais.

- Enterohemorrágica (EHEC) causa enterocolite hemorrágica e a síndrome urêmica no homem. Produzem shiga-like toxina 1 (stx1) e shiga-like toxina 2 (stx2) e suas variantes. De acordo com Nataro e Kaper (1998) esta estirpe apresenta plasmídios que codificam a produção de toxinas da família “shiga”.

- Enteroagregativa (EAEC) provoca a diarreia endêmica, tanto em países em desenvolvimento como nos países industrializados. Apresentam a capacidade de se

aderir à mucosa intestinal, elaborar citotoxinas e de induzir a inflamação da mucosa. É identificada por sua forma de aderência agregativa em células HeLa e HEp-2. Os Genes requeridos para a produção desse tipo de aderência são produzidos por plasmídios de aderência agregativa (pAA), que codificam fimbrias de aderência denominadas de “Aggregative Adherence Fimbria” (AAF).

- Enteroinvasiva (EIEC) causa várias doenças em humanos, incluindo colite invasiva inflamatória e está estreitamente relacionada com a *Shigella* spp. A patogênese da doença requer genes de virulência específicos seja de origem cromossomal ou plasmidial.

- Difusamente aderente (DAEC) causa diarreia aquosa em humanos, esta estirpe é caracterizada por apresentar um padrão de aderência difusa em células da linhagem HEp-2 (NATARO; KAPER, 1998; SERVIN, 2005). A maioria das cepas expressa uma fimbria superficial denominada como F1845 que pode ser codificada pelo cromossomo ou plasmídio (SOUZA, 2006).

Os isolados de *E. coli* provenientes de animais e humanos apresentam uma grande diversidade de patotipos, com muitos genes comuns, o que sugere a possibilidade de trocas genéticas entre eles e, conseqüentemente, a probabilidade do surgimento de patógenos emergentes (KUHNERT et al., 2000).

Existe uma percentagem significativa de *E. coli* que são patógenos para as aves, devido a aquisição de fatores de virulência, tais como habilidade de aderência, produção de aerobactina, resistência sérica e presença de plasmídio ColV (GONZÁLEZ et al., 1990; DHO-MOULIN, 1993), incluindo também fimbrias e hemolisinas que podem contribuir na sua patogênese (JOHNSON, 1991). Cepas que expressam fimbria tipo 1 estão envolvidas no estágio inicial de colonização do trato respiratório superior e diversos mecanismos de virulência têm sido identificados principalmente na doença respiratória crônica (DRC) em galinhas (POURBANKHSH et al., 1997). Estas características servem para diferenciar amostras patogênicas das não patogênicas (JOHNSON, 1991).

Outros fatores de virulência importantes na patogenia da colibacilose são as citotoxinas que se classificam em endo e exotoxinas e são importantes nas doenças respiratórias e Síndrome da Cabeça Inclinada (MORRIS; SOJKA, 1985; PARREIRA; YANO, 1998). As cepas de *E. coli* que causam infecções em humanos e animais são classificadas em três categorias: Enterotoxigênicas (ETEC) que podem ser termolábeis

(LT) e/ou termoestáveis (STa e STb), verotoxigênica (VTEC) que produzem três tipos de verotoxinas (VT1, VT2 e VT3) que são similares a *Shiga* toxina sintetizada pela *Shigella dysenteriae* tipo 1 e a necrotoxigênica (NTEC) que pode produzir fatores citotoxigênicos necrosantes denominados como CNF1 e CNF2 (BLANCO et al., 1992; 1997; DE RYCKE et al., 1990). Em estudo realizado por Orden et al. (2007) o gene *cnf* esteve presente em um dos isolados de *E. coli* de fezes de ovinos e caprinos, sendo sequenciado e a análise do produto gênico revelou um novo tipo de CNF, que foi nomeado como CNF3.

*Escherichia coli* faz parte da microbiota entérica de humanos (DRASAR; HILL, 1974; BONTEN et al., 1990), mamíferos e aves (SOJKA, 1965). Geralmente permanece no lúmen intestinal e quando os hospedeiros se apresentam debilitados, imunossuprimidos ou quando as barreiras gastrointestinais são desequilibradas podem causar doença (NATARO; KAPER, 1998). Ferreira e Knöbl (2000) e Ferreira et al. (2009) destacam que pode ser encontrado no trato digestivo das aves em concentrações acima de  $10^6$  unidades formadoras de colônias (UFC) por grama de fezes, destes, 10 a 20% são potencialmente patogênicas para os animais, e existe uma excreção contínua de *E. coli* portadora de fatores de virulência nas fezes, o que torna a sua distribuição cosmopolita.

Cardoso et al. (2002) relataram que o trato respiratório superior das aves é a principal porta de entrada de *E. coli* que coloniza e multiplica na traquéia, com posterior disseminação para os sacos aéreos e tecidos adjacentes. A infecção do trato respiratório associada à septicemia em frangos de corte causa grandes perdas econômicas (BARNES; GROSS, 1997). É frequentemente secundária às infecções virais como doença de Newcastle, bronquite infecciosa e doenças bacterianas causadas por micoplasmas ou estresse ambiental e geralmente envolve *Escherichia coli* patogênica de aves (APEC) (GOMIS et al., 2001). Desta forma, *E. coli* pode ser facilmente isolada da região da faringe e no trato respiratório superior de aves saudáveis (FERREIRA; KNÖBL, 2000).

Em galinhas, sorotipos patogênicos de *E. coli* têm sido associados a uma variedade de processos patológicos extra-intestinais, podendo coexistir amostras patogênicas e apatogênicas que são eliminadas continuamente nas fezes (ASSIS; SANTOS, 2001). Entretanto, algumas cepas específicas de *E. coli*, representam patógenos primários com um potencial maior de causar a doença. Estes patógenos têm



sido classificados em duas categorias principais: entéricos e extra-intestinais. A detecção de cepas APEC pode estar relacionada à presença de vários genes como: *iss* que confere a resistência sérica, *ths* com atividade hemaglutinante, *iutA* e *iucABCD* que codifica proteína aerobactina, *crl* e *csgA* denominadas de fimbria curli, que estão relacionados à adesão e hemaglutinina, *ompT* proteína da membrana externa e precursor protease, *iroABCDEN* receptor sideróforo e responsável por invasão e multiplicação, *fimA* adesina fimbria Tipo 1, *papA* adesinas e fimbria tipo P (cromossomo bacteriano) e *hlyF* relacionado com a presença de hemólise, dentre outros genes que apresentam várias funções e importância para caracterização de virulência (JOHNSON et al., 2006, 2009).

Delicato et al. (2003) demonstraram que o gene *iss* foi um dos mais frequentes em isolados de *E. coli* de aves com colibacilose. Entretanto, a frequência de gene *iss* foi menor em isolados de aves saudáveis. Esse gene tem sido localizado em vários plasmídios de alto peso molecular, que são capazes de carrear simultaneamente fatores de virulência e de resistência a antimicrobianos como descrito por Johnson et al. (2002).

As análises filogenéticas têm mostrado que *E. coli* podem ser classificadas em quatro grupos A, B1, B2 e D. A PCR é um método simples e rápido para classificação dos isolados de *E. coli* nos grupos filogenéticos pela detecção dos genes *chuA*, *yjaA* e TspE4.C2 (CLERMONT et al., 2000). Três marcadores de patogenicidade têm sido estudados: *chuA*, gene necessário para o transporte de heme em *E. coli* enterohemorrágica (0157:H7) (MILLS; PAYNE, 1995; BONACORSI et al., 2000); *yjaA*, um gene inicialmente identificado no genoma de *E. coli* K12, cuja função ainda é desconhecida (BLATTNER et al., 1997) e um fragmento de DNA designado como TspE4.C2 (BONACORSI et al., 2000).

As cepas virulentas extra-intestinais são geralmente classificadas no grupo B2, porém algumas são classificadas no grupo D. Entretanto, a maioria das cepas comensais pertence aos grupos A e B1 (HERZER et al., 1990; LECOINTRE et al., 1998; SABATÉ et al., 2006). De acordo com Johnson et al. (2008) e Ghanbarpour et al. (2010), estudos mostraram que *E. coli* isolada de bovinos e suínos pertencem aos grupos A e B1, enquanto que isolados de *E. coli* patogênica de aves são principalmente pertencentes aos grupos A, D e B1.

Vários fatores contribuem para a virulência de *E. coli* aviária e muitos dos genes que codificam esses fatores têm sido encontrados em grandes plasmídios conjugativos.

Por causa da ocorrência de genes de resistência antimicrobiana em plasmídios é possível que o uso de agentes antimicrobianos possa selecionar *E. coli* mais resistente (JOHNSON et al., 2004). A patogenicidade bacteriana é um fenômeno multifatorial e alterações na resistência ou a aquisição de fatores de virulência associados a *E. coli* comensal podem servir de alerta para o aparecimento de bactérias potencialmente patogênicas (IKUNO et al., 2008).

A presença de plasmídios de alto peso molecular pode estar relacionada à patogenicidade de cepas de *E. coli* aviária, podendo assim existir uma possível relação entre genes plasmidiais e virulência de acordo com Sekizaki et al. (1989); Nolan et al. (1992); Silveira et al. (1994); Wooley et al. (1996). A correlação entre um plasmídio de alto peso molecular e patogenicidade também foi relatada por Sekizaki et al. (1989) que correlacionaram a presença de um plasmídio de 95 MDa com a capacidade da linhagem ser patogênica em ensaios “*in vivo*”.

Contudo, outro fato importante está relacionado à presença do plasmídio R, que está relacionado com a resistência a antibiótico e o plasmídio conjugativo (FTR) que é responsável pela transferência de resistência (KURYLOWICZ, 1981). Plasmídios de resistência aos antimicrobianos vem sendo associados com infecções por microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos, e os genes de resistência do plasmídio tem sido relacionados com a maioria dos antibióticos, incluindo as quinolonas e fluorquinolonas (NEU, 1992; HAWKEY, 2003). E não é incomum para um único plasmídio, simultaneamente, mediar resistência a cinco ou seis antibióticos (SHERLEY et al., 2004).

De acordo com Gama et al. (2004), a caracterização de *E. coli* quanto ao padrão de resistência a antibióticos e a identificação do padrão de virulência são informações fundamentais para a caracterização de isolados clínicos de aves, possibilitando assim discriminar o potencial patogênico dessas bactérias, sugerindo que está havendo uma amplificação do perfil de resistência a antibióticos associados à presença de alguns fatores de virulência. Cardoso et al. (2002) isolaram *E. coli* de sacos aéreos de frangos de corte e avaliaram a sensibilidade aos antimicrobianos amoxicilina e norfloxacin, observando resistência de 60,7% e 75,8%, respectivamente. Resultados semelhantes foram encontrados por outros autores (CLOUD et al., 1985; ALLAN et al., 1993; AMARA et al., 1995; LAMBIE et al., 2000).

O desenvolvimento de resistência a antimicrobianos por bactérias é um sério problema à saúde, e em geral, o uso de antimicrobianos utilizados em humanos e animais tem contribuído para o desenvolvimento dessa resistência (ANGULO et al., 2004). Os genes de resistência estão sendo selecionados em consequência direta ao uso indiscriminado de antibióticos em animais e pode aumentar a incidência de patógenos multirresistentes de origem animal (YOUNG, 1994). As diferenças na susceptibilidade dos microorganismos aos antibióticos se tornaram um fator determinante na escolha e sucesso do tratamento e isso tem gerado grande preocupação com o aparecimento de resistência bacteriana podendo resultar em falhas imprevisíveis no tratamento (HUANG et al., 2009).

A seleção de microorganismos resistentes aos antibióticos é o resultado da pressão seletiva imposta pelo homem, seja pela prescrição desnecessária dessas drogas ou pelo uso incorreto em tratamentos sem diagnóstico estabelecido (TAVARES, 2000). De acordo com Kmet e Kmetova (2010) os isolados de *E. coli* de frangos de corte saudáveis, apresentaram uma elevada resistência ao ácido nalidíxico, floxacina e norfloxacina. A resistência às fluorquinolonas de isolados de *E. coli* em alimentos e na veterinária tem sido relatado por Guerra et al. (2003). E o tratamento de infecções causadas por *E. coli* em animais tem apresentado dificuldade devido ao aumento da resistência a drogas antimicrobianas, incluindo as fluorquinolonas. A resistência destas bactérias a antibióticos é ampla e inclui antibióticos promotores de crescimento e de uso terapêutico em animais (SABATÉ et al., 2008).

A carência de recursos de diagnóstico laboratorial, ou a não utilização destes quando disponíveis, agravam ainda mais essa situação, pois muitas vezes os profissionais da área cometem equívocos de conduta e prescrevem antibióticos sem sua devida necessidade. Esse fato associado à subdosagens ou suspensão do tratamento quando da melhora clínica do animal, sem observar o tempo correto e indicado da antibioticoterapia, contribuem para o aparecimento da resistência bacteriana (MOTA et al., 2005). A monitoria do desenvolvimento de resistência a antibióticos em bactérias isoladas de animais é necessária para garantir o uso correto dos antimicrobianos (FEDORKA-CRAY et al., 2002).

Colibacilose é o termo que designa as infecções causadas por *Escherichia coli* nos animais e no homem. Geralmente, é sistêmica e secundária a ação de outros agentes, com manifestações extra-intestinais da doença. É considerada uma das

principais doenças da avicultura industrial moderna em todos os países do mundo, em razão da grande importância econômica causada por quadros como aerossaculite, celulite, colisepticemia, coligranuloma, doença respiratória crônica (DRCC) complicada, onfalite, osteomielite, panoftalmia, peritonite, percardite, pneumonia, pleuropneumonia, salpingite, síndrome da cabeça inchada (SCI) e sinovite (GROSS, 1994, BARNES; GROSS, 1997, FERREIRA; KNÖBL, 2000).

A *E. coli* patogênica extra-intestinal constitui um grupo separado, principalmente por causar infecções do trato urinário em qualquer idade ou septicemia e meningite em crianças e animais jovens (KUHNERT, 2000). Em aves, caracteriza-se como uma infecção secundária a outros agentes e sua manifestação é extra-intestinal (FERREIRA; KNÖBL, 2000). Alguns estudos têm mostrado uma relação positiva entre APEC e amostras extra-intestinais denominadas de “Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*” (ExPEC), principalmente *E. coli* uropatogênica (UPEC) e a que causa meningite neonatal (NMEC), sugerindo que algumas linhagens de APEC podem ser consideradas potenciais agentes zoonóticos (EWERS, MOULIN-SCHOULEUR et al., 2007; JOHNSON et al., 2008).

Silveira et al. (2002) avaliaram as características biológicas e de patogenicidade de *E. coli* (APEC) isoladas de aves com onfalite, septicemia, síndrome da cabeça inchada e de galinhas saudáveis, por meio dos métodos de inoculação em pintos de um dia, absorção do Vermelho Congo, produção de hemolisina, sideróforos, citotoxina e capacidade de adesão em células HeLa, HEp-2 e KPCC, bem como a aglutinação de diferentes tipos de células vermelhas do sangue e a DL<sub>50</sub> de cada linhagem foram também avaliadas. Observaram que não houve correlação entre as características biológicas e de patogenicidade, exceto na característica da colicina produzida pelas cepas de *E. coli* da síndrome da cabeça inchada. Não havendo também correlação entre os padrões de adesão ou hemaglutinação e patogenicidade. Apenas seis das 50 cepas revelaram capacidade invasiva e a estirpe que melhor infectou linhagens celulares foi a que apresentou menor DL<sub>50</sub>.

Para caracterizar a patogenicidade de *E. coli*, os testes biológicos podem ser utilizados, como a inoculação de pintos de até uma semana de idade (ANDREATTI, 2007b), sendo assim as amostras patogênicas determinam a morte ou lesões como aerossaculite, percardite e perihepatite (ARP, 1982). Segundo Berkhoff e Vinal (1986) a utilização de meios de cultura como ágar McConkey ou ágar Trypticase Soy (TSA)

acrescido de vermelho congo podem ser utilizados devido a aderência do corante à bactéria, indicando desta forma sua patogenicidade. Entretanto, de acordo com Silva e Fiorentin, (1995) esse método não se revelou eficiente como técnica de diagnóstico.

O diagnóstico da colibacilose deve ser baseado nos achados clínicos, isolamento e identificação da *E. coli* (GROSS, 1991). Este microorganismo cresce bem em ágar sangue desfibrinado de carneiro e ágar McConkey sendo utilizados na rotina laboratorial. A associação do comportamento das amostras em ágar McConkey, ágar tríplice açúcar e ferro (TSI) e caldo lisina descarboxilase serve como ferramenta na identificação presuntiva, podendo ser complementada com outras provas bioquímicas para caracterizar este microorganismo de forma segura e completa (QUINN et al., 2000).

Na rotina de diagnóstico, o uso da PCR vem recebendo uma grande atenção, pois é uma ferramenta que possibilita a rápida identificação de organismos infecciosos, sendo utilizada para a detecção de vários patógenos e fatores de virulência presentes em isolados de *E. coli* aviária (YANG et al., 2004). Nos últimos anos, vários estudos foram realizados para melhor entender a patogênese das linhagens de APEC e para desenvolver tecnologias que possam prevenir as perdas econômicas causadas por estas linhagens (NAKAZATO et al., 2009).

O tratamento da colibacilose pode ser realizado com antibióticos e quimioterápicos (FERREIRA; KNÖBL, 2000). O uso de antimicrobianos como danofloxacina, gentamicina, enrofloxacina, apramicina, espectinomicina e ácido oxolínico apresentam espectro de sensibilidade superior a 70% em amostras de *E. coli* isoladas de aves apresentando alguma forma de colibacilose (ANDREATTI FILHO, 2007b). De acordo com Revolledo (2009) a utilização de antimicrobianos deve ser realizada após o teste de sensibilidade *in vitro* (antibiograma) para garantir a eficácia do produto a ser empregado.

A prevenção e o controle da *E. coli* se baseiam principalmente em medidas aplicadas no manejo das aves (REVOLLEDO, 2009). A redução da densidade de aves, controle da ventilação, gases irritantes, poeira em suspensão e umidade constituem em medidas essenciais. A profilaxia pode ser realizada pela imunização ativa ou passiva com utilização de vacinas preparadas com amostras patogênicas de maior incidência. A monitoria de patógenos transmitidos verticalmente ou horizontalmente deve ser incluída

em programa de biosseguridade, visando desta forma a manutenção dos plantéis avícolas livres de doenças (ANDREATTI FILHO, 2007a).

### ***Staphylococcus***

*Staphylococcus*, do grego *Staphyle* cachos de uva e *coccus* grãos (BAIRD PARKER, 1990), é uma bactéria que morfológicamente se apresenta como cocos Gram positivos, sendo considerados imóveis. Apresentam metabolismo oxidativo e fermentativo, atuam sobre carboidratos com produção de ácidos e são considerados aeróbios e anaeróbios facultativos. O seu crescimento ocorre entre 7°C e 48°C com temperatura ótima entre 35°C e 40°C (KLOODS; LAMBE JR., 1991).

O gênero *Staphylococcus* reúne 29 espécies agrupadas em dois grandes grupos: coagulase positivo (SCP) e coagulase negativo (SCN) decorrente da sua capacidade de coagular plasma sanguíneo pela produção de estafilocagulase. O grupo SCP inclui *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus schleiferi* subsp. *schleiferi* e *Staphylococcus delphini* (KONEMAN et al., 2001).

*S. aureus* é o de maior significado em patologia aviária (LANGONI, 2007). A maioria dessas infecções é causada por estafilococos SCP, podendo envolver também outros estafilococos SCN (AARESTRUP et al., 2000).

As espécies potencialmente patogênicas para as aves pertencem ao grupo de *Staphylococcus* anaeróbios facultativos. Como outras bactérias Gram positivas, apresentam uma membrana citoplasmática seguida de uma parede celular contendo uma densa camada de peptidoglicano, polissacarídeos e ácido teicóico. Vários estudos têm mostrado uma grande variedade de combinações que compõe a parede celular dessas bactérias, permitindo uma variabilidade antigênica, e algumas vezes, atuando na modulação de virulência das mesmas (FERREIRA; FERREIRA, 2000).

*S. aureus* é considerado o mais virulento dos estafilococos SCP (AWAN; MATSUMOTO, 1998; KLOOS; BANNERMAN, 1999) e seus fatores de virulência incluem as hemolisinas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ , a leucocidina e um grupo de super antígenos tóxicos pirogênicos (BANNERMAN, 2003). Em contraste, estafilococos SCN são considerados organismos benignos que fazem parte da microbiota. No entanto, nos últimos anos, o número de SCN implicados na doença humana e animal aumentou consideravelmente (KLOOS; BANNERMAN, 1999; MENICHETTI, 2005).

De acordo com Moya (1986), os estafilococos são encontrados no solo, água ou alimento. São amplamente distribuídos na natureza, sendo principalmente isolados na pele e membranas mucosas de aves e mamíferos (KLOOS; BANNERMAN, 1999). Apesar de possuir uma variedade de fatores de patogenicidade e virulência, tais como cápsula, proteína A, coagulase ou exotoxinas essas bactérias são consideradas patógenos oportunistas ou secundários, porque algumas condições predisponentes são necessárias para permitir a entrada e a multiplicação no hospedeiro (JONSSON; WADSTROM, 1993).

Todas as espécies aviárias são suscetíveis à estafilococose e estreptococose. Ocorre na maioria das vezes quando há queda na resistência devido a infecções bacterianas como pasteureloses, micoplasmoses e coriza infecciosa das galinhas, infecções virais por adenovírus, doença de Gumboro, doença de Marek e leucoses, além de micotoxinas, imunossupressão e lesões na pele ou nas mucosas. Dependendo da capacidade de expressão de fatores de virulência pode ocorrer uma infecção localizada, apresentando intensa multiplicação bacteriana e migração de células inflamatórias. Pode também ocorrer septicemia, devido à alta capacidade do microorganismo migrar da pele ou mucosa para os tecidos internos (FERREIRA; FERREIRA, 2000; REVOLEDO, 2009). A identificação das propriedades virulentas da bactéria responsável pela infecção estafilocócica é importante para decidir sobre o tratamento (ARCIOLA et al., 2001).

Alguns agentes patogênicos para as aves, como vírus, bactérias ou fungos podem ser encontrados no sistema respiratório superior e podem causar inchaço e edema na cabeça em virtude de infecções nos seios nasais. As lesões mais profundas observadas são traqueíte, bronquite, pneumonia e aerossaculite (CASTRO, 2000). Alterações no ambiente ou organismo do animal podem favorecer a multiplicação de microorganismo presente na microbiota, levando ao desencadeamento de uma doença (TORTORA et al., 2002). Como as aves podem ser reservatórios dos estafilococos, estes podem representar um potencial significativo nos surtos de intoxicações por *S. aureus* toxigênicos (FERREIRA; FERREIRA, 2000).

As espécies *S. intermedius* e *S. hyicus* são particularmente importantes na Medicina Veterinária e junto com os *Staphylococcus aureus* são patogênicos para os animais (BANNERMAN, 2003). Takeuchi et al. (1985), em pesquisa realizada com 290 galinhas saudáveis, observou *S. hyicus* subsp. *hyicus* em 19% das amostras analisadas na cavidade nasal e/ou pele. As doenças estafilocócicas em galinhas foram classificadas

em três tipos: dermatite, artrite e septicemia, com base no local em que a lesão é observada (SKEELES, 1997; TAKEUCHI et al., 2002).

A produção de cápsula por cepas de estafilococos vêm sendo bastante referenciada como indicador de sua importância clínica (ISHAK et al., 1985, YOUNGER et al., 1987). Alguns estudos têm sugerido que a produção de cápsula facilita a aderência bacteriana através de seus componentes biopolímeros, contribuindo para a formação de biofilme (PETERS; PULVERER, 1984). Sendo assim, os microorganismos que produzem biofilme são mais resistentes à ação de agentes físicos e químicos como os utilizados nos procedimentos de higienização (RICKARD et al., 2003; MARQUES, 2005).

Algumas espécies de estafilococos produzem um muco ou biofilme (polissacarídeo extracelular) que permite à bactéria aderir às superfícies, sendo importante para a sua colonização. A produção de biofilme é considerada como um fator de virulência (VEENSTRA et al., 1996; VUONG; OTTO, 2002), tornando-as menos acessíveis ao sistema de defesa do organismo e aos antimicrobianos (ARCIOLA et al., 2002; HUME et al., 2004). Esse mecanismo inibe a quimiotaxia, fagocitose, proliferação de linfócitos e limita a atuação dos macrófagos (VASUDEVAN et al., 2003).

A compreensão dos mecanismos que implicam na formação de biofilme tem aumentando (PRATT; KOLTER, 1999). Acredita-se que é fundamental para a formação de biofilme a capacidade de aderência, responsável pela fixação celular em uma superfície e a adesão intercelular, responsável pelo acúmulo de bactérias em multicamadas que contribuem para o crescimento e proteção celular (HEILMANN et al., 1996). A formação de biofilme é considerada como um dos principais fatores para infecção bacteriana persistente ou crônica (COSTERTON et al., 1999).

Recentemente, foi demonstrado que *S. aureus* também produz biofilme e que ambos (*S. aureus* e *S. epidermidis*) contêm o operon *ica* responsável pela produção de biofilme (ARCIOLA et al., 2001). A proliferação das células para aderir e formar biofilme é mediada pela produção do polissacarídeo intercelular adesina (PIA) ou poly-N-succinil- $\beta$ -1,6-glucosamina; a síntese é codificada pelo gene produtor do locus *ica* do operon *ica*ABCD e os genes e produtos do locus *ica* são fundamentais para a formação de biofilmes e virulência dos microorganismos (O'TOOLE et al., 2000; STANLEY; LAZZAZZERA, 2004).



O método clássico para observar a produção de biofilme é o teste realizado em Ágar Vermelho Congo (ACR). A observação direta das colônias em meio sólido permite o reconhecimento de amostras produtoras de biofilme, caracterizadas por colônias pretas, que são diferenciadas das não produtoras que se apresentam como colônias vermelhas (FREEMAN et al., 1989). Também pode ser empregado para avaliar a formação de biofilme a pesquisa dos genes *icaA* e *icaD* como marcadores genéticos. Alguns estudos tem associado sua produção à presença dos genes *icaA* e *icaD* em isolados de infecções em humanos (COELHO et al., 2007a).

O tratamento das infecções por estafilococos são realizados com o uso de agentes antimicrobianos (AARESTRUP et al., 2000). Os *Staphylococcus* são suscetíveis à penicilina, ampicilina, eritromicina, estreptomicina, tetraciclina, oxitetraciclina, novobiocina, enrofloxacina e danofloxacina. Devido ao aumento da resistência aos antibióticos, recomenda-se a realização de testes de sensibilidade *in vitro* frente aos antimicrobianos (FERREIRA; FERREIRA, 2000; REVOLLEDO, 2009).

Na atualidade, a resistência bacteriana adquirida é descrita em praticamente todas as espécies de bactérias, conhecendo-se detalhes dos mecanismos de aquisição de resistência e moleculares. A resistência aos antimicrobianos é um fenômeno genético, relacionado à existência de genes contidos nos microorganismos que codificam diferentes mecanismos bioquímicos que impedem a ação das drogas. E a transferência de genes de resistência de bactérias não-patogênicas ou de baixa patogenicidade para microorganismos patogênicos provavelmente é um fenômeno comum (TAVARES, 2000).

No entanto, poucos estudos têm determinado a ocorrência da resistência antimicrobiana e a presença de genes de resistência entre isolados de estafilococos em aves de produção comercial (AARESTRUP et al., 2000). A disseminação de cepas resistentes de *Staphylococcus* spp. aviária à eritromicina pode causar um impacto considerável sobre a eficácia do tratamento, controle da doença e a rentabilidade da indústria avícola (NAWAZ et al., 1999).

A resistência muitas vezes é transferida entre espécies e gêneros (LECLERCQ et al., 1989; DUKTA-MALEN et al., 1990; NOBLE et al., 1992). Estudos com cepas de estafilococos isoladas de humanos indicam que *S. epidermidis* é um reservatório de genes resistentes a antibióticos que podem ser transferidos para *S. aureus* “*in vitro*” e

“*in vivo*” (JAFÉ et al., 1980; FORBES; SCHABERG, 1983; McDONNELL et al., 1983; LYON; SKURRAY, 1987).

Segundo Tavares (2000), os estafilococos resistentes aos beta-lactâmicos, penicilinas-resistentes (meticilina e oxacilina) frequentemente mostram-se também resistentes aos macrolídeos, aminoglicosídeos, tetraciclina e outros agentes antimicrobianos. O fato de a eritromicina ser rotineiramente empregada no tratamento de doenças em aves, em longo prazo, pode trazer consequências indesejáveis, como desenvolvimento de *Staphylococcus* spp. resistentes à eritromicina (MOTA et al., 2005). Segundo Schwarz et al. (1998) é muito frequente a ocorrência da resistência a tetraciclina em *S. aureus* e estafilococos coagulase-negativo.

De acordo com Sahm (1994) e Lee (2003) a resistência dos *Staphylococcus* spp. à oxacilina está relacionada à presença do gene *mecA*, que é considerado um determinante genético, que torna os microorganismos intrinsecamente resistentes também a outras drogas. Esta resistência ocorre devido a presença de uma proteína ligadora transpeptidase de penicilina (“Protein Binding Penicillin”) denominada de PBP 2' ou PBP-2a, com baixa afinidade para os  $\beta$ -lactâmicos, encontra-se presente na membrana plasmática sendo codificada pelo gene cromossômico *mecA* (HACKBARTH; CHAMBERS, 1989; WARSA et al., 1996). Além deste mecanismo de resistência, a inativação por  $\beta$ -lactamases e a produção de PBPs modificadas podem coexistir e até se tornarem interativas (DeLANCASTRE et al., 1991).

Os estafilococos resistentes à meticilina (MRS) são importantes patógenos nosocomiais principalmente os resistentes a vários antimicrobianos. A proteína que se liga à penicilina (PBP-2a) codificada pelo gene *mecA* é responsável também pela resistência à meticilina (NIEMEYER et al., 1996; CHAMBERS, 1997; GORTEL et al., 1999). As cepas de *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA) há várias décadas vem sendo estudadas em unidades de saúde para seres humanos e há alguns anos tem sido isolada a partir de unidades veterinárias em diversos países do mundo como o Canadá (WEESE et al., 2004, 2006), EUA (SEGUIN et al., 1999; MIDDLETON et al., 2005), Irlanda (O'MAHONY et al., 2005), Inglaterra (BAPTISTE et al., 2005; LOEFFLER et al., 2005), Áustria (CUNY et al., 2006) e no Brasil, em estudo realizado por Rigatti et al. (2010) em um hospital escola, a espécie mais prevalente foi *S. epidermidis* (67%) e o gene *mecA* foi detectado em 90% (54/60) das cepas, observando-se também um elevado índice de resistência a vários grupos de antimicrobianos. A presença do gene *mecA* em

*S. intermedius* provenientes de amostras animais e *S.aureus* proveniente de amostras humanas sugere a probabilidade de transferência horizontal de genes entre espécies distintas (COELHO et al., 2007b).

Informações sobre a prevalência de *Staphylococcus* resistentes a antimicrobianos no ambiente de produção avícola nos Estados Unidos é escassa, sendo necessária para a avaliação científica dos riscos da utilização de antimicrobianos na criação animal e potenciais consequências na saúde pública. A resistência antimicrobiana de 110 *Staphylococcus* (SCN) isolados de cama de frango apresentaram uma maior resistência à claritromicina e eritromicina (71%), clindamicina (48%) e tetraciclina (38%) (SIMJEE et al., 2007). A ocorrência de resistência antimicrobiana entre isolados recentes e antigos indica que a resistência aos antimicrobianos em estafilococos originários de aves aumentou ao longo do tempo em indústrias avícolas da Bélgica. Isto pode ser devido ao uso frequente de agentes antimicrobianos na criação de aves. De fato, os agentes antimicrobianos têm sido administrados por muitos anos, não só para controlar e prevenir a doença, mas também para promover o crescimento e melhorar a eficiência alimentar (BOWER; DAESCHEL, 1999; GEORNARAS; HOLY, 2001; BERTOLATTI et al., 2003).

O diagnóstico das infecções causadas por essa bactéria pode ser realizado por meio do isolamento de *Staphylococcus*, utilizando-se para o cultivo o caldo Infusão Cérebro Coração (BHI) ou semeadura direta em ágar sangue de carneiro 5 a 8%, submetida a incubação a 37°C por 24 a 48h. Pode-se observar colônias de 1 a 3mm de diâmetro, apresentando hemólise total ( $\beta$ ) ou parcial ( $\alpha$ ). A realização da coloração de Gram, teste de catalase e provas bioquímicas como: arginina, esculina, lactose, manitol, rafinose, ribose, salicina, sorbitol e trealose devem ser utilizadas para caracterizar e determinar as espécies de *Staphylococcus* ((FERREIRA; FERREIRA, 2000). Em amostras clínicas a PCR permite o diagnóstico rápido de cepas patogênicas produtoras de muco em relação ao método tradicional de cultura em ágar Vermelho Congo que requer muito mais tempo (COSTERTON et al., 1999; ARCIOLA et al., 2001).

O controle dessa enfermidade pode ser aliado a programas de vacinação eficientes, nutrição balanceada, manejo adequado e monitoria de doenças que contribuam para diminuir as infecções por esse microorganismo em aves comerciais (FERREIRA; FERREIRA; 2000; REVOLLEDO, 2009).

## REFERÊNCIAS

- AARESTRUP, F. M. et al. Antimicrobial susceptibility and presence of resistance genes in staphylococci from poultry. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 74, n. 4, p.353-364, 2000.
- ALLAN, B. J. et al. Characterization of *Escherichia coli* isolated from cases of avian colibacillosis. **Canadian Journal of Veterinary Research**, Ottawa, v. 57, n. 3, p.146-151, 1993.
- AMARA, A. et al. Antibioresistance of *Escherichia coli* strains isolated in Morocco from chickens with colibacillosis. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 43, n. 4, p.325-330, 1995.
- ANDREATTI FILHO, R. L. Colibacilose aviária. In: \_\_\_\_\_. **Saúde aviária e doença**. São Paulo: ROCA, 2007b. p. 112-117.
- ANDREATTI FILHO, R. L. Prevenção de doenças: biossegurança em avicultura. In: \_\_\_\_\_. **Saúde aviária e doenças**. São Paulo: ROCA, 2007a. p. 2-8.
- ANDREOTTI, M. O; GUIMARÃES, E. B. Biossegurança na produção de suínos. In: SIMPÓSIO SOBRE NUTRIÇÃO DE AVES E SUÍNOS, p. 95, 2003, Cascavel, PR. **Anais...** Cascavel: Auditório da FUNDETEC, 2003.
- ANGULO, F. J. et al. Evidence of an association between use of anti-microbial agents in food animals and antimicrobial resistance among bacteria isolated from humans and the human health consequences of such resistance. **Journal of Veterinary Medicine Sereies B**, Berlin, v. 51, n. 8-9, p. 374-379, 2004.
- ANONYMOUS. Jordanian Ministry of Agriculture. **Annual report**. Amman, Jordan: Ministry of Agriculture, 2006. p. 102.
- ARCIOLA, C. R. et al. Detection of slime production by means of an optimised congo red agar plate test based on a colourimetric scale in *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates genotyped for ica locus. **Biomaterials**, Grildford United Kingdom, v. 23, n. 21, p. 4233-4239, 2002.
- ARCIOLA, C. R. et al. A rapid PCR methods for detection of slime producing strains of *Staphylococcus epidermidis* and *S. aureus* in periprosthetic infections. **Diagnostic Molecular Pathology**, New York, v.10, n. 2, p. 130-137, 2001.
- ARP, L. H. Pathology of spleen and liver in turkeys inoculated with *Escherichia coli*. **Avian Pathology**, Obingdon, v. 11, n. 2, p. 263-279, 1982.
- ASSIS, A. C. B; SANTOS, B. M. Patogenicidade *in vivo* e *in vitro* de amostras de *Escherichia coli* de origem aviária. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, v. 3, n. 2, p. 181-184, 2001.
- AVAKIAN, A. P; KLEVEN, S. H. The humoral immune response of chickens to *Mycoplasma gallisepticum* and potential causes of false positive reactions in avian

- Mycoplasma* serology. **Zentralblatt fur Bakteriologie**, Stuttgart, Supplement 20, p. 500-512, 1990.
- AVAKIAN, A. P. et al. Evaluation of the specificity and sensitivity of two commercial enzyme-linked immunosorbent assay kits, the serum plate agglutination test, and the hemagglutination-inhibition test antibodies formed in response to *Mycoplasma gallisepticum*. **Avian Diseases**, Amherst, v.32, n. 2, p. 262-272, 1988.
- AWAN, M. A.; MATSUMOTO, M. Heterogeneity of staphylococci and other bacteria isolated from six-week-old broiler chickens. **Poultry Science**, College Station, v. 77, n. 7, p. 944-949, 1998.
- BAIRD-PARKER, A. C. The *Staphylococci*: an introduction. **Journal of Applied Bacteriology**, London, v.19, p. 15-85, 1990.
- BANNERMAN, T. L. *Staphylococcus, Micrococcus*, and other catalase-positive cocci that grow aerobically. In: **Manual of Clinical Microbiology**, MURRAY, P. R. Washington, American Society for Microbiology, p. 387, 2003.
- BAPTISTE, K. E. et al. Methicillin-resistant staphylococci in companion animals. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 11, n. 12, p. 1942-1944, 2005.
- BARNES, H. J. et al. Colibacillosis. In: SAIF, Y. M. **Diseases in poultry**. Ames: Iowa State University Press, 2003. p. 631-652.
- BARNES, H. J.; GROSS, W. B. Colibacillosis. In: GROSS, W.B. **Diseases of poultry**. Ames: Iowa State University Press, 1997. p. 131-141.
- BERKHOFF, H. A.; VINAL, A. C. Congo red medium to distinguish between invasive and non-invasive *Escherichia coli* for poultry. **Avian Diseases**, Amherst, MA, v. 30, n. 1, p. 117-221, 1986.
- BERTOLATTI, D. et al. Characterization of drug-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from poultry processing plants in Western Australia. **International Journal Environmental Health Research**, Abingdon, UK, v. 13, n. 1, p. 43-45, 2003.
- BLANCO, J. et al. Serogroups of *Escherichia coli* strains producing cytotoxic necrotizing factors CNF1 and CNF2. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 75, n. 2-3, p. 155-159, 1992.
- \_\_\_\_\_. Production of Toxins (Enterotoxins, Verotoxins, and Necrotoxins) and Colicins by *Escherichia coli* Strains Isolated from Septicemic and Healthy Chickens: Relationship with In Vivo Pathogenicity. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 35, n. 11, p. 2953-2957, 1997.
- BLATTNER, F. R. G. et al. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. **Science**, Washington, v. 277, n. 5331, p. 1453-1462, 1997.
- BOLIS, D. A. Biosseguridade na criação alternativa de frangos. In: CONFERÊNCIA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLA – APINCO, 2001, Campinas. **Anais...** Campinas: FACTA, 2001. p. 223-234.

BONACORSI, S. P. et al. Identification of regions of the *Escherichia coli* chromosome specific for neonatal meningitis associated strains. **Infection and Immunity**, Washington, v. 68, n. 4, p. 2096-2101, 2000.

BONTEN, M. E. et al. High prevalence of antibiotic resistant *Escherichia coli* in faecal samples of students in the south-east of The Netherlands. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 26, n. 4, p. 585-592, 1990.

BOWER, C. K.; DAESCHEL, M. A. Resistance responses of microorganisms in food environments. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 50, n. 2-3, p. 33-44, 1999.

BRASIL, Ministério da Agricultura. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Defesa Animal. **Programa Nacional de Sanidade Avícola**. Brasília, 1994.

BUCHALA, F. G. **Levantamento sorológico de Salmonella e Mycoplasma em aves domésticas de criatórios de explorações não tecnificadas “fundo de quintal” no Estado de São Paulo**. 2003. 67 f. Dissertação (Mestrado em Veterinária) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2003.

BUIM, M. R. et al. Detecção de micoplasmas em granjas comerciais por multiplex PCR. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, SP, v. 4, p.119, 2002.

\_\_\_\_\_. et al. Infecção respiratória múltipla: micoplasma x vírus em galinhas poedeiras. In: ENCONTRO NACIONAL SOBRE METODOLOGIAS DE LABORATÓRIO, 11, 2006, Concórdia. **Anais...** Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2006. p. 42.

CANAL, C. W. et al. Detecção de *Ornithobacterium rhinotracheale* por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR). **Ciência Rural**, Santa Maria, RS, v. 33, n. 2, p. 377-379, 2003.

CARDOSO, A. L. S. P. et al. Avaliação da susceptibilidade a antimicrobianos de cepas de *Escherichia coli* de origem aviária. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, SP, v. 69, n. 2, p. 1-5, 2002.

\_\_\_\_\_. et al. Prova de soroaglutinação rápida em galinhas reprodutoras como monitoria sorológica de micoplasmoses. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, SP, v. 70, n. 3, p. 96-99, 2003.

CARPENTER, T. E. et al. Vaccination with F-strain *Mycoplasma gallisepticum* to reduce production losses in layer chickens. **Avian Diseases**, Amherst, MA, v. 25, n. 2, p. 404-409, 1981.

CASTRO, A. G. M. Enfermidades do sistema respiratório. In: BERCHIERI JÚNIOR, A; MARCOS, M. **Doenças das Aves**. Campinas: FACTA, 2000. p. 71-74.

CHAMBERS, H. F. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 10, n. 4, p.781-791, 1997.

- CHRISTENSEN, N. H. et al. Investigations into the survival of *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae* and *Mycoplasma iowae* on materials found in the poultry house environment. **Avian Pathology**, Abingdon, v. 23, n. 1, p. 127-143, 1994.
- CLERMONT, O. et al. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 10, p. 4555-4558, 2000.
- CLOUD, S. S. et al. In vitro and in vivo characterization of avian *Escherichia coli*. Serotypes, metabolic activity, and antibiotic sensitivity. **Avian Diseases**, Amherst, MA, v. 29, n. 4, p. 1084-1093, 1985.
- COELHO, S. M. O. et al. Avaliação dos genes *icaA* e *icaD* como marcadores genéticos para produção de slime em *Staphylococcus aureus* isolados de mastites bovina. **Revista Universidade Rural Serie Ciências Vida**, Seropédica, RJ, v. 27, p. 173-175, 2007a.
- \_\_\_\_\_. et al. Mapeamento do perfil de resistência e detecção do gene *mecA* em *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus intermedius* oxacilina-resistentes isolados de espécies humanas e animais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 1, p. 195-200, 2007b.
- COSTERTON, J. W. et al. Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. **Science**, Washington, v. 284, n. 5418, p. 1318-1322, 1999.
- CUNY, C. et al. Emergence of MRSA infections in horses in a veterinary hospital: strain characterization and comparison with MRSA from humans. **Euro Surveillance**, Saint- Maurice, France, v. 11, n. 1-3, p. 44-47, 2006.
- DE LENCASTRE, H. et al. Multiple mechanisms of methicillin resistance and improved methods for detection in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, Amsterdam, v. 35, n. 4, p. 632-639, 1991.
- DE RYCKE, J. et al. Evidence for two types of cytotoxic necrotizing factor in human and animal clinical isolates of *Escherichia coli*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 28, n. 4, p. 694-699, 1990.
- DELICATO, E. R. et al. Virulence associated genes in *Escherichia coli* isolates from poultry with colibacillosis. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 94, n. 2, p. 97-103, 2003.
- DHO-MOULIN, M. Les *Escherichia coli* pathogenes des volailles. **Annales Medicine Veterinaire**, Bruxelles, v. 137, p. 353-357, 1993.
- DHO-MOULIN, M; FAIRBROTHER, J. M. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). **Veterinary Research**, Paris, v. 30, n. 2-3, p. 299-316, 1999.
- DRASAR, B. S.; HILL, M. J. Human intestinal flora. London: Academic Press, 1974, p. 36-43, In: DRASAR, B. S.; HILL, M. J.

- DUTKA-MALEN, S. et al. Phenotypic and genotypic heterogeneity of glycopeptide resistance determinants in gram-positive bacteria. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, Washington, v. 34, n. 10, p. 1875-1879, 1990.
- EVANS, J. D; LEIGH, S. A. Differentiation of *Mycoplasma gallisepticum* vaccine strains ts-11 and 6/85 from commonly used *Mycoplasma gallisepticum* challenge strains by PCR. **Avian Diseases**, Amherst, MA, v. 52, n. 3, p. 491-497, 2008.
- EWERS, C. et al. Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis causing *Escherichia coli*: how closely related are they? **International Journal of Medical Microbiology**, Stuttgart, v. 297, n. 3, p. 163-176, 2007.
- FEBERWEE, A. et al. Comparison of culture, PCR and different serologic tests for detection of *Mycoplasma synoviae* infections. **Avian Diseases**, Amherst, MA, v. 49, n. 2, p. 260-268, 2005.
- FEBERWEE, A. et al. *Mycoplasma synoviae* associated eggshell apex abnormalities. In: WORLD VETERINARY POULTRY CONGRESS, 15th., 2007, Beijing, China. **Proceeding...** 2007, p. 234.
- FEDORKA-CRAY, P. J. et al. Programs for monitoring antimicrobial resistance. **Animal Biotechnology**, New York, v. 13, n. 1, p. 43-55, 2002.
- FERREIRA, A. J. P; FERREIRA, C. S. A. Estafilococose e Estreptococose aviária. In: BERCHIERI JUNIOR, A.; MACARI, M. **Doenças das aves**. Campinas: FACTA, 2000. p. 209-215.
- FERREIRA, A. J. P; KNÖBL, T. Colibacilose aviária. In: BERCHIERI JUNIOR, A.; MACARI, M. **Doenças das aves**. Campinas: FACTA, 2000. p. 197-204.
- FERREIRA, A. J. P. et al. Colibacilose. In: REVOLLEDO, L.; FERREIRA, A. J. P. **Patologia aviária**. Barueri: Manole, 2009. p. 67-74.
- FIORENTIN, L. et al. Patogenicidade de amostras de *Mycoplasma synoviae* isoladas no Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 43, n. 5, p. 405-410, 1991.
- FORBES, B. A.; SCHABERG, D. R. Transfer of resistance plasmids from *Staphylococcus epidermidis* to *Staphylococcus aureus*: evidence of conjugative exchange of resistance. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.153, n. 2, p. 627-634, 1983.
- FREEMAN, D. J. et al. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. **Journal of Clinical Pathology**, London, v. 42, n. 8, p. 872-874, 1989.
- GAMA, N. M. S. Q. et al. Isolamento de *Escherichia coli* de amostras de água de dessedentação de galinhas poedeiras. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 71, p. 522-524, 2004.



GARCIA, M. et al. Detection of *Mycoplasma gallisepticum*, *M. synoviae*, and *M. iowae* by multi-species polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism. **Avian Diseases**, Amherst, MA, v. 39, n. 3, p. 606-616, 1995.

\_\_\_\_\_. Use of species specific oligonucleotide probes to detect *Mycoplasma gallisepticum*, *M. synoviae*, and *M. iowae* PCR amplification products. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v. 8, n. 1, p. 56-63, 1996.

GHANBARPOUR, R. et al. Virulence genotyping of *Escherichia coli* isolates from avian cellulitis in relation to phylogenetic. **Comparative Clinical Pathology**, London, v. 19, n. 2, p. 147-153, 2010.

GEORNARAS, L.; HOLY, A. Antimicrobial susceptibilities of isolates of *Staphylococcus aureus*, *Listeria* species and *Salmonella* serotypes associated with poultry processing. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 70, n. 1-2, p. 29-35, 2001.

GLEW, M. D. et al. pMGA phenotypic variation in *Mycoplasma gallisepticum* occurs in vivo and is mediated by trinucleotide repeat length variation. **Infection and Immunity**, Washington, v. 68, n. 10, p. 6027-6033, 2000.

GLISSON, J. R. Bacterial respiratory diseases of poultry. **Poultry Science**, College Station, v. 77, n. 8, p. 1139-1142, 1998.

GOMIS, S. M. et al. Phenotypic and genotypic characterization of virulence factors of *Escherichia coli* isolated from broiler chickens with simultaneous occurrence of cellulitis and other colibacillosis lesions. **Canadian Journal of Veterinary Research**, Ottawa, v. 65, n. 1, p. 1-6, 2001.

GONZÁLEZ, E. A. et al. Virulent *Escherichia coli* strains for chicks bind fibronectin and type II collagen. **Microbios**, Cambridge, v. 62, n. 251, p. 113-127, 1990.

GORTEL, K. et al. Methicillin resistance among staphylococci isolated from dogs. **American Journal Veterinary Research**, Chicago, v. 60, n. 12, p. 1526-1530, 1999.

GROSS, W. B. Colibacillosis. In: HOFSTAD, M. S et al. **Diseases of poultry**. Ames: Iowa State University Press, 1991. p. 138-144.

\_\_\_\_\_. Diseases due to *Escherichia coli* in poultry. In: GYLES, C. L. (E.d.). ***Escherichia coli* in domestic animals and humans**. Wallingford, CAB International, 1994, p. 237-259.

GUERRA B. et al. Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance in German *Escherichia coli* isolates from cattle, swine and poultry. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 52, n. 3, p. 489-492, 2003.

HACKBARTH, C. J.; CHAMBERS, H. F. Methicillin-resistant staphylococci: detection methods and treatment of infections. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, Washington, v. 33, n. 7, p. 995-999, 1989.

HAWKEY, P. M. Mechanisms of quinolone action and microbial response. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 51, supplemento 1, p. 29-35, 2003.

- HEILMANN, C. et al. Characterization of Tn917 insertion mutants of *Staphylococcus epidermidis* affected in biofilm formation. **Infection and Immunity**, v. 64, n. 1, p. 277-282, 1996.
- HERZER, P. J. et al. Phylogenetic distribution of branched RNA-linked multicopy single stranded DNA among natural isolates of *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 172, n. 11, p. 6175-6181, 1990.
- HOERR, F. J. Clinical aspects of immunosuppression in poultry. **Avian Diseases**, Amherst, MA, v. 54, n. 1, p. 2-15, 2010.
- HONG, Y. et al. Differentiation of *Mycoplasma gallisepticum* strains using amplified fragment length polymorphism and other DNA-based typing methods. **Avian Diseases**, Amherst, MA, v. 49, n. 1, p. 43-49, 2005.
- HUANG, T.M. et al. Antimicrobial susceptibility and resistance of chicken *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., and *Pasteurella multocida* isolates. **Avian Diseases**, Amherst, MA, v. 53, n. 1, p. 89-93, 2009.
- HUME, E. B. H. et al. The control of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation and in vivo infection rates by covalently bound furanones. **Biomaterials**, Guildford, v. 25, n. 20, p. 5023-5030, 2004.
- IKE, K. et al. Serum resistance and aerobactin iron uptake in avian *Escherichia coli* mediated by conjugative 100 megadaltons plasmid. **Japanese Journal of Veterinary Science**, v. 54, n. 6, p. 1091-1098, 1992.
- IKUNO, A. A. et al. Características de isolados de *Escherichia coli* provenientes de aves silvestres quanto a genes de virulência e resistência a antibióticos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 38., 2008, Gramados. **Anais...** Gramados: [s.n], 2008.
- ISHAK M. A. et al. Association of slime with pathogenicity of coagulase negative staphylococci causing nosocomial septicemia. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 22, n. 6, p. 1025-1029, 1985.
- JAFFE, H. W. et al. Identity and interspecific transfer of gentamicin resistance plasmids in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 141, n. 6, p. 738-747, 1980.
- JOHNSON, J. R. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 4, n. 1, p. 80-128, 1991.
- JOHNSON, T. J. et al. DNA sequence of a ColV plasmid and prevalence of selected plasmid-encoded virulence genes among avian *Escherichia coli* strains. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 188, n. 2, p. 745-758, 2006.
- \_\_\_\_\_. Examination of the source and extended virulence genotypes of *Escherichia coli* contaminating retail poultry meat. **Foodborne Pathogens and Disease**, New Rochelle, NY, v. 6, n. 6, p. 657-667, 2009.

\_\_\_\_\_. Identification of minimal predictors of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) virulence for use as a rapid diagnostic tool. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 46, n. 12, p. 3987-3996, 2008.

\_\_\_\_\_. Comparison of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains from human and avian sources reveals a mixed subset representing potential zoonotic pathogens. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 74, n. 22, p. 7043-7050, 2008.

\_\_\_\_\_. Location of increased serum survival gene and selected virulence traits on a conjugative R plasmid in an avian *Escherichia coli* isolate. **Avian Diseases**, Amherst, MA, v. 46, n. 2, p. 342-352, 2002.

\_\_\_\_\_. Multiple antimicrobial resistance region of a putative virulence plasmid from an *Escherichia coli* isolate incriminated in avian colibacillosis. **Avian Diseases**, Amherst, MA, v. 48, n. 2, p. 351-360, 2004.

JONSSON, P.; WADSTROM, T. *Staphylococcus*. In: GYLES, C.L.; THOEN, C.O. **Pathogenesis of bacterial infections in animals**. Ames: Iowa State University Press, 1993. p. 21-35.

KEMPF, I. DNA amplification methods for diagnosis and epidemiological investigations of avian mycoplasmosis. **Avian Pathology**, Abgidon, v. 27, n. 1, p. 7-14, 1998.

KEMPF I. Influence of the administration of antibiotics on the diagnosis of *Mycoplasma gallisepticum* infection in chickens. **Point Veterinaire**, Maison Alfort, FR, v. 23, n. 2, p. 767-73, 1991.

KEMPF, I. et al. The polymerase chain reaction for *Mycoplasma gallisepticum* detection. **Avian Pathology**, Abigdon, n. 4, v. 22, p. 739-750, 1993.

KLEVEN, S. H. Control of Avian *Mycoplasma* infections in commercial poultry. **Avian Diseases**, Amherst, MA, v. 52, n. 3, p. 367-374, 2008.

\_\_\_\_\_. *Mycoplasma synoviae* infection. In: CALNEK, B. W. et al. **Diseases of poultry**. 10. ed. Ames: Iowa State University Press, 1997. p. 220-228.

\_\_\_\_\_. \_\_\_\_\_. In: SAIF, Y. M. et al. **Diseases of poultry**. 11. ed. Ames: Iowa State University Press, 2003. p. 756-766.

KLEVEN, S. H. et al. *Mycoplasma gallisepticum*: uma doença emergente. In: **V Simpósio Brasil Sul de Avicultura**, 5., 2004, Chapecó. Disponível em: <[http://www.cnpsa.embrapa.br/sgc/scg-publicações/anais\\_v\\_bsa\\_sKleven](http://www.cnpsa.embrapa.br/sgc/scg-publicações/anais_v_bsa_sKleven)>.

KLEVEN, S. H. et al. *Mycoplasma synoviae* infection. In: CALNEK, B. W. et al. **Diseases of poultry**. Ames: Iowa State University Press, 1991. p. 223-231

KLOOS, W. E.; BANNERMAN, T. L. *Staphylococcus* and *Micrococcus*. In: MURRAY, P. R. et al. (Ed.). **Manual of clinical microbiology**. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1999. p. 264-282.

KLOODS, W. E.; LAMBE JR., D. *Staphylococcus*. In: BALOWS, E.J. et al. (Ed.). **Manual of clinical microbiology**. 5th ed. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1991. p. 222-237.

KMET, V.; KMETOVA, M. High Level of Quinolone Resistance in *Escherichia coli* from Healthy Chicken Broilers. **Folia Microbiológica**, Praha, v. 55, n. 1, p. 79–82, 2010.

KONEMAN, E. W. et al. **Diagnóstico microbiológico**. Rio de Janeiro: MEDSI, 2001. 1465 p.

KUHNERT, P. et al. Target genes for virulence assessment of *Escherichia coli* isolates from water, food and the environment. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 24, n. 1, p. 107-117, 2000.

KURYLOWICZ, W. Antibióticos: uma revisão crítica. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 1981. 341p.

LAMBIE, N. et al. Retrospective study on *Escherichia coli* infection in broilers subjected to postmortem examination and antibiotic resistance of isolates in Trinidad. **Avian Diseases**, Amherst, MA, v. 44, n. 1, p. 155-160, 2000.

LANDMAN; W. J. M; FEBERWEE, A. Aerosol-induced *Mycoplasma synoviae* arthritis: the synergistic effect of infectious bronchitis virus infection. **Avian Pathology**, Abingdon, v. 33, n. 6, p. 629-639, 2004.

LANGONI, H. Estafilococose aviária. In: ANDREATTI FILHO, R. L. **Saúde aviária e doença**. São Paulo: ROCA, 2007. p. 127-132.

LAUERMAN, L. H. et al. Development and application of a polymerase chain reaction assay for *Mycoplasma synoviae*. **Avian Diseases**, Amherst, MA, v. 37, n. 3, p. 829-834, 1993.

LECLERCQ, R. et al. Transferable vancomycin and teicoplanin resistance in *Enterococcus faecium*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, Washington, v. 33, n. 1, p. 10-15, 1989.

LECOINTRE, G. L. et al. *Escherichia coli* molecular phylogeny using the incongruence length difference test. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 15, n. 12, p. 1685-1695, 1998.

LEE, J. H. Methicillin (oxacilin) resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from major food animals and their potential transmission to humans. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 11, p. 6489-6494, 2003.

LEVISOHN, S; KLEVEN, S. H. Avian mycoplasmosis (*Mycoplasma gallisepticum*). **Revue Scientifique et Technique**, Paris, v. 19, n. 2, p. 425-442, 2000.

LEVISOHN, S. et al. Comparison of *in vivo* and *in vitro* methods for pathogenicity evaluation for *Mycoplasma gallisepticum* in respiratory infection. **Avian Pathology**, Abingdon, v. 15, n. 2, p. 233– 246, 1986.

LEY, D. H. *Mycoplasma gallisepticum* infection. In: SAIF, Y. M. et al. **Diseases of poultry**. Ames: Blackwell Publishing, 2008. p.807-834.

LEY D. H. et al. Transmissibility of live *Mycoplasma gallisepticum* vaccine strains ts-11 and 6/85 from vaccinated layer pullets to sentinel poultry. **Avian Diseases**, Amherst, MA, v. 41, n. 1, p. 187-194, 1997.

LIU, T. et al. Molecular variability of the adhesion-encoding gene *pvpA* among *Mycoplasma gallisepticum* strains and its application in diagnosis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.39, n. 5, p. 1882-1888, 2001.

LOCKABY, S. B. et al. Pathogenicity of *Mycoplasma synoviae* in broiler chickens. **Veterinary Pathology**, Basel, Switzerland, v. 35, n. 3, p. 178-190, 1998.

LOEFFLER, A. et al. Prevalence of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among staff and pets in a small animal referral hospital in the UK. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 56, n. 4, p. 692-697, 2005.

LYON, B. R., SKURRAY, R. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus*: genetic basis. **Microbiology Reviews**, Bethesda, Maryland, v. 51, n. 1, p. 88-134, 1987.

LYSNYANSKY, I. et al. Use of *mgc2*-polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism for rapid differentiation between field isolates and vaccine strains of *Mycoplasma gallisepticum* in Israel. **Avian Diseases**, Amherst, MA, v. 49, n. 2, p. 238-245, 2005.

MAROIS, C. et al. Detection of *Mycoplasma synoviae* in poultry environment samples by culture and polymerase chain reaction. **Veterinary Microbiology**, v. 73, n. 4, p. 311-318, 2000.

MARQUES, C.S. **Formação de Biofilmes por *Staphylococcus aureus* na superfície de aço inoxidável e vidro e sua resistência a sanitizantes químicos**. 2005. 64 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

MARTINS, P. C. Avicultura. In: SEMINÁRIO NORDESTINO DE PECUÁRIA (PECNORDESTE), 14.; SIMPÓSIO DA ACETAV, 10., 2010, FORTALEZA. Disponível em: <<http://www.congressodeovos>>. Acesso em 18 nov. 2010.

McAULIFFE, L. et al. Biofilm formation by mycoplasma species and its role in environmental persistence and survival. **Microbiology**, New York, v. 152, n. 4, p. 913-922, 2006.

McDONNELL, R. W. et al. Conjugal transfer of gentamicin resistance plasmids intra and interspecifically in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 23, n. 1, p. 151-160, 1983.

MEKKES, D. R; FEBERWEE, A. Real time polymerase chain reaction for the qualitative and quantitative detection of *Mycoplasma gallisepticum*. **Avian Pathology**, Abingdon, v. 34, n. 4, p. 348-354, 2005.

- MENDONÇA, G. A. et al. O emprego de SAR e HI como rotina laboratorial para evidenciação de *Mycoplasma gallisepticum*. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2004, Santos. **Anais...** Santos: FACTA, 2004. p,177.
- MENICHETTI F. Current and emerging serious Gram-positive infections. **Clinical Microbiology and Infection**, Paris, v. 11, n. 3, p. 22-28, 2005.
- MIDDLETON, J. R. et al. Surveillance of *Staphylococcus aureus* in veterinary teaching hospitals. **Journal Clinical Microbiology**, Washington, v. 43, n. 6, p. 2916-2919, 2005
- MILLS, M; PAYNE, S. Genetics and regulation of haem iron transport in *Shigella dysenteriae* and detection of an analogous system in *Escherichia coli* O157:H7. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 177, n. 11, p. 3004-3009, 1995.
- MINHARRO, S. et al. Envolvimento de *Escherichia coli*, de *Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma synoviae* em lesões de sacos aéreos em frangos abatidos no Estado de Goiás. **Ciência Animal Brasileira**, Gioania, GO, v. 2, n. 2, p. 111-117, 2001.
- MORRIS, J. A.; SOJKA, W. J. The virulence of *Escherichia coli*. In: SUSSMAN, M. **Escherichia coli as a pathogen in animals**. London: Academic Press, 1985. p. 47-77.
- MOTA, R. A. et al. Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a multirresistência bacteriana. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 42, n. 6, p. 465-470, 2005.
- MOULIN-SCHOULEUR, M. et al. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains of avian and human origin: link between phylogenetic relationships and common virulence patterns. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 45, n. 10, p. 3366-3376, 2007.
- MOYA, S. F. *Staphylococcus aureus* as a potential contaminant of animal feeds. **Ciências Veterinária**, v. 8, p. 77-80, 1986.
- NAKAZATO, G. et al. Virulence factors of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 29, n. 7, p. 479-486, 2009.
- NASCIMENTO, E. R. Micoplasmoses. In: BERCHIERI JÚNIOR, A; MACARI, M. **Doenças das aves**. Campinas: FACTA, 2000. p. 217-224.
- \_\_\_\_\_. Micoplasmoses aviárias: caracterização das principais enfermidades. In: CURSO DE ATUALIZAÇÃO EM SANIDADE AVÍCOLA, 1992. Campinas. **Anais...** Campinas, 1992, 10p.
- \_\_\_\_\_. Micoplasmose aviária. InformTécnicoBIOVET. Ano. 04, n.29. 2006.
- \_\_\_\_\_. **Micoplasmoses aviárias: principais infecções e seus estudos no Brasil**. Rio de Janeiro: Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública do Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do rio de Janeiro, 1985. 18 p. Mimeografado.

- NASCIMENTO, E. R.; PEREIRA, V. L. A. Micoplasmoses. In: BERCHIERI JÚNIOR, A. et al. **Doenças das aves**. Campinas: FACTA, 2009. p. 485-500.
- NASCIMENTO, E. R. et al. Avaliação de antimicrobianos no tratamento da doença respiratória crônica por *Mycoplasma gallisepticum* e *Escherichia coli* em frangos de corte. **Brazilian Journal of Poultry Science**, Campinas, SP, p.72, 1999.
- \_\_\_\_\_. et al. Avian mycoplasmosis update. **Brazilian Journal of Poultry Science**, Campinas, SP, v. 7, n. 1, p. 1-9, 2005.
- \_\_\_\_\_. et al. *Mycoplasma gallisepticum* F-vaccine strain-specific polymerase chain reaction. **Avian Diseases**, Amherst, MA, v. 37, n. 1, p. 203-211, 1993.
- \_\_\_\_\_. et al. Polymerase chain reaction for detection of *Mycoplasma gallisepticum*. **Avian Diseases**, Amherst, MA, v. 35, n. 1, p. 62-69, 1991.
- NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 11, n. 1, p. 142-201, 1998.
- NAWAZ, M. S. et al. Biochemical and molecular characterization of erythromycin resistant avian *Staphylococcus* spp. Isolated from chickens. **Poultry Science**, College Station, v. 78, n. 8, p. 1191-1197, 1999.
- NETO, C. C. et al. **Biossegurança: roedores**. 2001. Disponível em: <<http://www.aviculturaindustrial.com.br>> Acesso em: 05 out. 2008.
- NEU, H. C. The crisis in antibiotic resistance. **Science**, New York, v. 257, n. 5073, p. 1064-1073, 1992.
- NIEMEYER D. M. et al. Role of *mecA* transcriptional regulation in the phenotypic expression of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 18, n. 18, p. 5464-5471, 1996.
- NOBLE, W. C. et al. Co-transfer of vancomycin and other resistance genes from *Enterococcus faecalis* NCTC 12201 to *Staphylococcus aureus*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 72, n. 2, p. 195-198, 1992.
- NOLAN, L. K. et al. Transposon mutagenesis used study the role of complement resistance in the virulence of an avian *Escherichia coli*. **Avian Diseases**, Amherst, MA, v. 36, n. 2, p. 398-402, 1992.
- NOORMOHAMMADI, A. H. Role of phenotypic diversity in pathogenesis of avian mycoplasmosis. **Avian pathology**, Abingdon, v. 36, n. 6, p. 439-444, 2007.
- OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES (OIE). Animal Health World Organization. Diseases notifiable to the OIE. Disponível em: [http://www.oie.int/eng/maladies/en\\_classification](http://www.oie.int/eng/maladies/en_classification). Acesso em: 30 out. 2006.
- OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES (OIE). Terrestrial manual. Avian mycoplasmosis (*Mycoplasma gallisepticum*, *M. synoviae*). 2008. Chapter 2.3.5., p. 482-

496. Disponível em: [http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/pdf/2.03.05-%20AVIAN\\_MYCO.pdf](http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/pdf/2.03.05-%20AVIAN_MYCO.pdf)>.

OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES (OIE). World Organization for Animal Health. **World Animal Health Information Database (WAHID)**. Disponível em: <<http://www.oie.int/wahidprod/public.php>>. Acesso em: 20 out. 2010.

O'MAHONY, R. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from animals and veterinary personnel in Ireland. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 109, n. 3-4, p. 285-296, 2005.

ORDEN, J. A. et al. Necrotoxigenic *Escherichia coli* from sheep and goats produce a new type of cytotoxic necrotizing factor (CNF3) associated with the *eae* and *ehxA* genes. **International Microbiology**, Espanha, v. 10, n. 1, p. 47-55, 2007.

ORSKOV, F.; ORSKOV, I. *Escherichia coli* serotyping and disease in man and animals **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 38, n. 7, p. 699-704, 1992.

ORTIZ, A; KLEVEN, S. H. Serological detection of *Mycoplasma synoviae* infection in turkeys. **Avian diseases**, Amherst, MA, v. 36, n. 3, p. 749-752, 1992.

ORTIZ, A. et al. Evaluation of enrofloxacin against egg transmission of *Mycoplasma gallisepticum*. **Avian Diseases**, Amherst, MA, v. 39, n. 4, p. 830-836, 1995.

O'TOOLE, G. et al. Biofilm formation as microbial development. **Annual Review Microbiology**, Palo Alto, v. 54, p. 49-79, 2000.

PAPAZISI, L. et al. The complete genome sequence of the avian pathogen *Mycoplasma gallisepticum* strain R (low). **Microbiology**, New York, v. 149, n. 9, p. 2307-2316, 2003.

\_\_\_\_\_. et al. GapA and CrmA coexpression is essential for *Mycoplasma gallisepticum* cytoadherence and virulence. **Infection and Immunity**, Washington, v. 70, n. 12, p. 6839-6845, 2002.

PARREIRA, V. R.; YANO, T. Cytotoxin produced by *Escherichia coli* isolated from chickens with swollen head syndrome (SHS). **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 62, n. 2, p. 11-119, 1998.

PETERS, G.; PULVERER, G. Pathogenesis and management of *Staphylococcus epidermidis* 'plastic' foreign body infections. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 14, p. 67-71, 1984.

POURBANKSHS, A. et al. Localization of the *in vivo* expression of P and F1 fimbriae in chickens experimentally inoculated with pathogenic *Escherichia coli*. **Microbial Pathogenesis**, London, v. 22, n. 6, p. 331-341, 1997.

PRATT, L. A.; KOLTER, R. Genetic analyses of bacterial biofilm formation. **Current Opinion in Microbiology**, Oxford, v. 2, n. 6, p. 598-603, 1999.

QUINN, P.J. et al. **Clinical veterinary microbiology**. Edinburgh: Mosby, 2000. 648 p.



- RAZIN, S. et al. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasma. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 62, n. 4, p. 1094-1156, 1998.
- REVOLLEDO, L. Estafilococose e estreptococose. In: REVOLLEDO, L.; FERREIRA, A.J.P. **Patologia aviária**. Barueri: Manole, 2009. p. 145-147.
- RICKARD, H. A. et al. Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 11, n. 2, p. 94-100, 2003.
- RIGATTI, F. et al. Bacteremias por *Staphylococcus* coagulase negativos oxacilina resistentes em um hospital escola na cidade de Santa Maria, Estado do Rio Grande do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, MG, v. 43, n. 6, p. 686-690, 2010.
- ROSENGARTEN, R; YOGEV, D. Variant colony surface antigenic phenotypes within mycoplasma strain populations: implications for species identification and strain standardisation. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 34, n. 1, p. 149-158, 1996.
- SABATÉ, M. et al. Pathogenicity island markers in commensal and uropathogenic *Escherichia coli* isolates. **Clinical Microbiology and Infection**, Paris, v. 12, n. 9, p. 880-886, 2006.
- \_\_\_\_\_. et al. Virulence and antimicrobial resistance profiles among *Escherichia coli* strains isolated from human and animal wastewater. **Research in Microbiology**, Paris, v. 159, n. 4, p. 288-293, 2008.
- SAHM, D. F. Streptococci and staphylococci: laboratory considerations for in vitro susceptibility testing. **Clinical Microbiology Newsletter**, New York, v. 16, n. 1, p. 9-13, 1994.
- SALISCH, H. et al. A comparison of a commercial PCR-based test to culture methods for detection of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* in concurrently infected chickens. **Avian Pathology**, Abingdon, v. 27, n. 2, p. 142-147, 1998.
- SALLE, C. T. P; SILVA, A. B. Prevenção de doenças/ manejo profilático/ monitoração. In: BERCHIERI JUNIOR, A.; MACARI, M. **Doença das aves**. Campinas: FACTA, 2000, p.3-12.
- SCHWARZ, S. et al. Tetracycline resistance in *Staphylococcus* spp. from domestic animals. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 63, n. 2-4, p. 217-227, 1998.
- SEGUIN, J.C. et al. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* outbreak in a veterinary teaching hospital: potential human to animal transmission. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 37, n. 5, p. 1459-1463, 1999.
- SEKIZAKI, T. et al. Loss of virulence associated with plasmid curing of chicken pathogenic *Escherichia coli*. **Nippon Juigaku Zasshi**, Tokyo, v. 51, n. 3, p. 659-661, 1989.

SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS. (SEBRAE). **Cadeia produtiva da avicultura: cenários econômicos e estudos setoriais.** Recife, 2008. 42 p.

SERVIN, A.L. Pathogenesis of Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, Bethesda, Maryland, v. 18, 2005, p.264-292.

SHIMIZU, T. et al. Survival of several mycoplasma species under various conditions. **Zentralblatt fur Bakteriologie**, Stuttgart, v. 20, p. 950-952. 1990. Supplement.

SHERLEY, M. et al. Evolution of multi-resistance plasmids in Australian clinical isolates of *Escherichia coli*. **Microbiology**, New York, v. 150, p. 1539-1546, 2004.

SILVA, G.; FIORENTIN, L. Correlação entre a patogenicidade de *Escherichia coli* em pintos e a coloração das colônias crescidas em Agar contendo vermelho congo. **Hora Veterinária**, Porto Alegre, v. 87, p. 22-24. 1995.

SILVA, R. C. F. et al. *Mycoplasma synoviae* infection on Newcastle Disease vaccination of chickens. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 39, n. 2, p. 384-389, 2008.

SILVEIRA, W. D. et al. Biological characteristics and pathogenicity of avian *Escherichia coli* strains. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 85, n. 1, p. 47-53, 2002.

\_\_\_\_\_. et al. Transposon mutagenesis and membrane protein studies in an avian colisepticaemic *Escherichia coli* strain. **Brazil Journal of Genetics**, Bangalore, IN, v. 17, n. 1, p. 9-14, 1994.

SIMJEE, S. et al. Antimicrobial susceptibility and distribution of antimicrobial resistance genes among *Enterococcus* and coagulase negative *Staphylococcus* isolates recovered from poultry litter. **Avian Diseases**, Amherst, MA, v. 51, n. 4, p. 884-892, 2007.

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

SOERIPTO, K. et al. Virulence and transmissibility of *Mycoplasma gallisepticum*. **Australian Veterinary Journal**, Victoria, v. 66, n. 3, p. 65-72, 1989.

SOJKA, W. J. ***Escherichia coli* in domestic animals and poultry**. Farnham Royal, Bucks, England: Commonwealth Agricultural Bureaux, 1965. p. 157-168.

SOJKA, W. J.; CARNAGHAN, R. B. A. *Escherichia coli* infections in poultry. **Research in Veterinary Science**, London, v. 2, p. 340-352, 1961.

SOUZA, S. P. *Escherichia coli* as a specialized bacterial pathogen. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, Paraíba, v. 6, n. 2, p. 341-352, 2006.

SPANGLER, B.D. Structure and function of cholera toxin and the related *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. **Microbiology Reviews**, Bethesda, Maryland, v. 56, 1992, p.622-647.

- STANLEY, N. R.; LAZAZZERA, B. A. Environmental signals and regulatory pathways that influence biofilm formation. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 52, n. 4, p. 917-924, 2004.
- STIPKOVITS, L.; KEMPF, I. Mycoplasmoses in poultry. **Revue Scientifique et Technique: Office International des Epizooties**, Paris, v. 15, n. 4, p. 1495-1525, 1996.
- TAKEUCHI, S. et al. Isolation and some properties of *Staphylococcus hyicus* subsp. *hyicus* from pigs, chickens and cows. **Japanese Journal of Veterinary Science**, Tokyo, v. 47, n. 5, p. 841-843, 1985.
- \_\_\_\_\_. et al. Structural gene and strain specificity of a novel cysteine protease produced by *Staphylococcus aureus* isolated from a diseased chicken. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 89, n. 2-3, p. 201-210, 2002.
- TALKINGTON; F. D.; KLEVEN, S. H. A classification of laboratory strains of avian *Mycoplasma* serotypes by direct immunofluorescence, **Avian Diseases**, Amherst, MA, v. 27, n. 2, p. 422-429, 1983.
- TAVARES, W. Bactérias gram positivas problemas: resistência de estafilococos, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 33, n. 3, p. 281-301, 2000.
- TIMENETSKY, J. Micoplasmose-conceitos gerais. In: REVOLEDO, L.; FERREIRA, A.J.P. **Patologia aviária**. Barueri: Manole, 2009. p. 82-85.
- TORTORA, G. J. et al. **Microbiologia**, Porto Alegre: Artmed, 2002. 827 p.
- UNIÃO BRASILEIRA DE AVICULTURA (UBA) 2009. Disponível em: <<http://uba.org.br>>. Acesso em: 10 jul. 2010.
- VASUDEVAN, P. et al. *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 92, n. 1-2, p. 179-185, 2003.
- VEENSTRA, G. et al. Ultrastructural organization and regulation of a biomaterial adhesion of *Staphylococcus epidermidis*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 178, n. 2, p. 537-541, 1996.
- VUONG, C.; OTTO M. *Staphylococcus epidermidis* infections. **Microbes and Infection**, Paris, v. 4, n. 4, p. 481-489, 2002.
- WARSA, U. C.; OKUBO, T.; OKAMOTO, R. Antimicrobial susceptibilities and phage typing of *Staphylococcus aureus* clinical isolates in Indonesia. **Journal of Infection and Chemotherapy**, Tokyo, v. 2, n. 1, p. 29-33, 1996.
- WEESE, J. S. et al. Isolation of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from the environment in a veterinary teaching hospital. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Philadelphia, v. 18, n. 4, p. 468-470, 2004.

\_\_\_\_\_. Suspected transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* between domestic pets and humans in veterinary clinics and in the household. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 115, n. 1-3, p. 148-155, 2006.

WEINACK, O. M.; SNOEYENBOS, G. H. Serologic studies with *Mycoplasma synoviae* in experimentally inoculated chickens. **Avian Diseases**, Amherst, MA, v. 20, n. 2, p. 253-259, 1976.

WHITHEAR, K. G. Control of avian mycoplasmosis by vaccination. **Revue Scientifique et Technique: Office International des Epizooties**, Paris, v. 15, n. 4, p. 1527-1553, 1996.

WINNER, F. et al. In vitro cell invasion of *Mycoplasma gallisepticum*. **Infection and Immunity**, Washington, v. 68, n. 7, p. 4238-4244, 2000.

WOOLEY, R. E. et al. Analysis of plasmid cloned from a virulent avian *Escherichia coli* and transformed into *Escherichia coli* DH5-alpha. **Avian Diseases**, Amherst, MA, v. 40, n. 3, p. 533-539, 1996.

\_\_\_\_\_. et al. Colonization of the chicken trachea by an avirulent avian *Escherichia coli* transformed with plasmid pHk11. **Avian Diseases**, Amherst, MA, v. 42, n. 1, p. 194-198, 1998.

YANG, H. et al. Characterization of multiple antimicrobial resistant *Escherichia coli* isolates from diseased chickens and swine in China. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 42, n. 8, p. 3483-3489, 2004.

YODER JR, H. W. *Mycoplasma gallisepticum* infection. In: CALNEK, B.W. et al. **Diseases of poultry**. 9. ed. Ames: Iowa State University Press, 1991. p. 198-212.

YODER JR, H. W. et al. Evaluation of inactivated *Mycoplasma gallisepticum* oil-emulsion bacterins for protection against airsacculitis in broilers. **Avian Diseases**, Amherst, MA, v. 28, n. 1, p. 224-234, 1984.

YOGEV, D. S. et al. Genetic and antigenic relatedness between *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae*. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 19, n. 1, p. 75-84, 1989.

\_\_\_\_\_. et al. Ribosomal RNA gene probes to detect intraspecies heterogeneity in *Mycoplasma gallisepticum* and *M. synoviae*. **Avian Diseases**, Amherst, MA, v. 32, n. 2, p. 220-231, 1988.

YOUNG, H. K. Do nonclinical uses of antibiotics make a difference? **Infection Control and Hospital Epidemiology**, Thorofare, NJ, v. 15, n. 7, p. 484-487, 1994.

YOUNGER, J. J. et al. Coagulase negative staphylococci isolated from cerebrospinal fluid shunts: importance of slime production, species identification and shunt removal to clinical outcome. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 156, n. 4, p. 548-54, 1987.

ZAIN, Z. M; BRADBURY, J. M. Optimising the conditions for isolation of *Mycoplasma gallisepticum* collected on application swabs. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 49, n. 1-2, p. 45-57, 1996.

**ARTIGO 1**

**OCORRÊNCIA DE *Mycoplasma synoviae* EM FRANGOS DE CORTE E  
POEDEIRAS COMERCIAIS NO ESTADO DE PERNAMBUCO, BRASIL**

**(Artigo formatado para o periódico Avian Pathology)**

1           **OCORRÊNCIA DE *Mycoplasma synoviae* EM FRANGOS DE CORTE E**  
2           **POEDEIRAS COMERCIAIS NO ESTADO DE PERNAMBUCO, BRASIL**

3

4   **Resumo:** O estado de Pernambuco é o maior produtor de ovos da região Norte e  
5   Nordeste e ocupa a segunda posição na produção de frangos de corte. Os micoplasmas  
6   são importantes patógenos aviários que causam doenças respiratórias e sinovite que  
7   resultam em grandes perdas econômicas. Objetivou-se pesquisar a ocorrência de MG e  
8   MS em frangos de corte e poedeiras comerciais no Estado de Pernambuco, Brasil.  
9   Foram colhidos fragmentos de traquéia de 55 frangos de corte sadios, 35 com sinais  
10   respiratórios e de 30 poedeiras comerciais também com sinais respiratórios,  
11   provenientes de 24 granjas, cada amostra foi composta por um “pool” de cinco aves.  
12   Para detecção de *Mycoplasma gallisepticum* (MG) e *Mycoplasma synoviae* (MS) foram  
13   utilizados o exame bacteriológico, PCR e Nested-PCR. Todas as amostras apresentaram  
14   resultados negativos no exame bacteriológico. Na PCR, sete amostras foram positivas  
15   para MS e uma para MG em amostras de aves com sinais respiratórios, sendo a amostra  
16   positiva para MG confirmada como cepa vacinal MG-F. A ocorrência de MS em aves  
17   com sinais clínicos respiratórios pode indicar ausência de barreiras sanitárias adequadas  
18   em granjas de frangos de corte e de poedeira comercial, favorecendo a sua propagação.

19

20   **Palavras-chave:** Micoplasmoses, aves, PCR, diagnóstico

21

22

23

24

25

26

27 ***Mycoplasma synoviae* OCCURRENCE IN BROILERS AND COMMERCIAL**  
28 **LAYERS IN PERNAMBUCO STATE, BRAZIL**

29

30 **Abstract:** The Pernambuco State is the producer largest of eggs in the North and  
31 Northeast and second ranks in the broilers production. Mycoplasmas are important  
32 avian pathogens, which cause respiratory and joint diseases that result in large economic  
33 losses. The objective of this paper research to the occurrence of *Mycoplasma*  
34 *gallisepticum* (MG) and *Mycoplasma synoviae* (MS) in broilers and commercial layers  
35 in the state of Pernambuco, Brazil. Tracheal fragments from 55 healthy broilers, 35  
36 broilers with respiratory disease and 30 layers with respiratory signs from 24  
37 commercial poultry farms were analysed. Materials from five birds were pooled to  
38 form each sample, analysed by bacteriological isolation, PCR and Nested-PCR. All  
39 samples were negative in bacteriological isolation, seven samples were PCR positive to  
40 MS and one was PCR positive to MG, confirmed as MG-F vaccinal strain. MS  
41 occurrence in birds with respiratory signs may indicate inadequate sanitary management  
42 in commercial broiler and layer farms.

43

44 **Key-words:** mycoplasmosis, PCR, birds, diagnosis.

45

46

47

48

49

50

51

52



## 53 **Introdução**

54 A intensificação da produção no setor avícola propicia determinadas condições que  
55 favorecem a ocorrência e disseminação de algumas doenças infecciosas, principalmente  
56 aquelas relacionadas ao trato respiratório (Minharro *et al.*, 2001).

57 As micoplasmoses são consideradas as doenças respiratórias de maior impacto em  
58 todos os níveis da atividade avícola. *Mycoplasma gallisepticum* (MG) é responsável por  
59 doença crônica respiratória, sendo importante economicamente por provocar perdas na  
60 conversão alimentar, queda na produção de ovos, mortalidade embrionária e  
61 condenação de carcaça (Yoder, 1984) e *Mycoplasma synoviae* (MS) por provocar  
62 infecção subclínica do trato respiratório superior, caracterizada pela ausência de sinais  
63 clínicos ou somente doença respiratória (Stipkovits & Kempf, 1996), podendo também  
64 causar problemas de aerossaculite em frangos (Rosales, 1991) e apresentando-se  
65 frequentemente na forma assintomática em criações de frangos de corte no Brasil  
66 (Fiorentin *et al.*, 2003).

67 Após infecção por *Mycoplasma gallisepticum* ou *Mycoplasma synoviae*, as aves  
68 tornam-se mais suscetíveis às infecções secundárias por outros agentes virais ou  
69 bacterianos, como *Escherichia coli* (Alencar *et al.*, 1998; Ferreira & Knöbl, 2000).

70 Diante do exposto objetivou-se pesquisar a ocorrência de *Mycoplasma*  
71 *gallisepticum* e *Mycoplasma synoviae* em granjas de frangos de corte e poedeiras  
72 comerciais no Estado de Pernambuco, Brasil.

73

74

75

76

77

## 78 **Material e Métodos**

79 O protocolo experimental deste estudo seguiu os Princípios Éticos na  
80 Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e  
81 aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Rural de  
82 Pernambuco (CEUA-UFRPE), processo N° 23082.001526.

83

## 84 **Amostragem**

85 Foram utilizadas 11 granjas de frangos de corte saudáveis e sete com animais  
86 apresentando sinais clínicos respiratórios, além de seis granjas de poedeiras comerciais  
87 com aves com sinais clínicos de doença respiratória no Estado de Pernambuco,  
88 correspondendo a aproximadamente 20% do total de granjas. Foram colhidos 55  
89 fragmentos de traquéias de frangos de corte sadios e 35 com sinais clínicos e 30  
90 traquéias de poedeiras comerciais com sinais clínicos de doença respiratória. Cada  
91 amostra foi constituída por um “pool” de cinco aves/granja, totalizando 24 amostras  
92 para o processamento das técnicas microbiológica e molecular.

93

## 94 **Exame bacteriológico**

95 Após a colheita por *swab*, escarificação e realização do macerado de traquéia, as  
96 amostras foram armazenadas em glicerol (1:2) e congeladas a -20° C até seu  
97 processamento. Para o isolamento, as amostras foram diluídas seriadamente de 10<sup>-1</sup> até  
98 10<sup>-5</sup>, sendo então repicadas em meio Frey modificado líquido e sólido e incubadas a  
99 37°C por 48-72 horas. As placas foram mantidas em microaerofilia e observadas  
100 diariamente até o 21° dia, em microscópio estereoscópico (40x) para visualização de  
101 colônias características de *Mycoplasma* spp. que se apresentam em forma de “ovo-frito”  
102 (Nascimento, 2000).

103

## 104 **Extração de DNA**

105 A extração de DNA das amostras coletadas por *swabs*, escarificação e macerado de  
106 traquéia foram submetidas ao método fenol/clorofórmio adaptado de Sambrook et al.  
107 (1989).

## 108 **PCR**

109 Para reação de amplificação do DNA foram utilizados primers específicos para  
110 *Mycoplasma gallisepticum* (MG), *Mycoplasma synoviae* (MS) e cepa vacinal MG-F  
111 (Tabela 1). A reação de PCR constou de 59  $\mu\text{L}$  de água ultrapura (Milli-Q), 10  $\mu\text{L}$  de  
112 Tampão PCR 10X, 5  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  (25mM), 5  $\mu\text{L}$  de dNTP mix (0,25 mM de cada), 2  
113  $\mu\text{L}$  de cada “primer” (100 pmol), 2 $\mu\text{L}$  de *Taq* DNA Polimerase (2,5U/ $\mu\text{L}$ ) e 15  $\mu\text{L}$  do  
114 DNA extraído, obtendo-se um volume final de 100  $\mu\text{L}$ . Como controle positivo utilizou-  
115 se cepas *American Type Culture Collection* de MG (ATCC 19610) e MS (ATCC  
116 25204). E para controle negativo nas reações foi utilizado água de PCR, em substituição  
117 ao DNA. A reação foi pré-aquecida a 94°C por 1 min, seguida de 40 ciclos de  
118 desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 55°C por 1 min e extensão a 72°C por 2  
119 min. Acrescida da extensão final a 72°C por 5 min e resfriamento a 4°C por 5 min.

120

## 121 **Nested-PCR**

122 Foi realizada com os amplicons das reações de PCR, utilizando primers específicos  
123 para MG-PCR (Tabela 1). A reação de PCR constou de 71  $\mu\text{L}$  de água ultrapura (Milli-  
124 Q), 10  $\mu\text{L}$  de Tampão PCR 10x, 5  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  (25mM), 5  $\mu\text{L}$  de dNTP mix (0,25 mM  
125 de cada), 2  $\mu\text{L}$  de cada “primer” (100 pmol), 2 $\mu\text{L}$  de *Taq* Polimerase (2,5U/ $\mu\text{L}$ ) e 3  $\mu\text{L}$  da  
126 PCR, obtendo-se um volume final de 100  $\mu\text{L}$ . Para controle negativo nas reações foi  
127 utilizado água de PCR, em substituição ao DNA. A reação foi pré-aquecida a 94°C por  
128 5 min, seguida de 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 55°C por 1

129 min e extensão a 72°C por 2 min. Acrescida da extensão final a 72°C por 10 min e  
130 resfriamento a 4°C por 30 seg.

131 As amostras foram analisadas em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de  
132 etídio (5%) e os fragmentos obtidos foram visualizados sob luz ultravioleta. Utilizou-se  
133 o marcador de peso molecular 100pb Ladder<sup>®</sup> (Ludwig Biotec, Rio Grande do Sul).

134

135 **Tabela 1.** Primers utilizados nas reações da PCR e Nested-PCR para detecção de  
136 *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae* e cepa vacinal MG-F

Primers <sup>a</sup>	Sequência (5'- 3')	Produto	Referência
MG-F	GGATCCCATCTCGACCACGAGAAAA	732 pb	Nascimento <i>et al.</i>
MG-R	CTTTCAATCAGTGAGTAACTGATGA		(1991)
MGF-F	TAACCCTTCATCACCTCATCTAGAG	524 pb	Nascimento <i>et al.</i>
MGF- R	CTGTTTGCTAAAGAACAAGTTGATC		(1993)
MS-F	GAGAAGCAAATAGTGATATCA	207 pb	Lauerman <i>et al.</i>
MS-R	CAGTCGTCTCCGAAGTTAACAA		(1998)
MG <sup>F</sup> -PCR	CGTGGATATCTTTAGTTCCAGCTGC	481 pb	Nascimento <i>et al.</i>
MG <sup>R</sup> -PCR	GTAGCAAGTTATAATTTCCAGGCAT		(2005)

137 <sup>a</sup>F= Forward, R= Reverse

138

### 139 **Análise Estatística**

140 Para o estudo de concordância entre os testes utilizou-se o coeficiente de Kappa  
141 (K) e a interpretação convencional dos valores *K* adotados foram: 0,00 - 0,20 =  
142 concordância fraca; 0,21 - 0,40 = regular; 0,41 - 0,60 = moderada; 0,61 - 0,80 = boa;  
143 0,81- 1,00 = muito boa, valores negativos são interpretados como equivalentes a 0,0.  
144 Para o cálculo de associação entre os materiais biológicos foi utilizado o teste qui-  
145 quadrado de independência (Landis & Koch, 1977).

146

### 147 **Resultados**

148 Os sinais clínicos observados nas aves doentes foram corrimento nasal leve ou  
149 abundante, edema facial e estertores respiratórios. Os achados de necropsia foram  
150 aerossaculite, presença de hemorragia e muco na traquéia. Na análise microbiológica

151 das amostras de *swab*, escarificação e macerado de traquéia de frangos de corte e  
152 poedeiras comerciais obteve-se resultados negativos. Na PCR, observou-se que oito  
153 (33,33%) amostras apresentaram resultado positivo e 16 (66,67%) foram negativas,  
154 sendo sete (29,17%) amostras positivas para MS e apenas uma (4,17%) positiva para  
155 MG de todas as amostras submetidas a PCR e Nested-PCR.

156 Das sete amostras coletadas de frangos de corte com sinais clínicos de doença  
157 respiratória, três (42,85%) apresentaram resultado positivo para MS. Em seis amostras  
158 de poedeira comercial, quatro (66,67%) foram positivas para MS e uma (16,67%) para  
159 MG, sendo confirmada como cepa vacinal MG-F na PCR (Figura 1).

160 O teste kappa indicou sensibilidade de 0,00% e especificidade de 66,67% quando se  
161 comparou a PCR com o exame microbiológico.

162 Com relação ao tipo de material biológico coletado de traquéia de frangos de corte  
163 e poedeiras comerciais foram obtidos resultados positivos na PCR, em duas (8,33%)  
164 amostras de *swab*, uma (4,17%) de escarificação e seis (25,0%) de macerado, não se  
165 constatou diferença estatística significativa ( $p=0,069$ ) entre os materiais biológicos  
166 utilizados para o diagnóstico. Os resultados demonstraram alta frequência de amostras  
167 positivas para *Mycoplasma synoviae* em aves com sinais clínicos respiratórios,  
168 destacando-se o sistema de criação de poedeiras comerciais com 83,33% de  
169 positividade. A frequência de MS (53,85%) no total de granjas analisadas com aves  
170 apresentando sinais clínicos respiratórios foi maior do que MG, que apresentou apenas  
171 uma (4,17%) amostra positiva, sendo a mesma confirmada como cepa vacinal.

172

### 173 **Discussão**

174 Os Micoplasmas são considerados importantes patógenos responsáveis por doença  
175 respiratória crônica, sinovites ou bursites em galinhas e perus e responsáveis por  
176 grandes prejuízos econômicos na avicultura industrial. No Brasil, a frequência da

177 infecção por MS é superior a de MG (Reis *et al.*, 1973; Mettifogo *et al.*, 2002; Buim,  
178 2005; Buim *et al.*, 2009) e em frangos, a prevalência de MS aumentou a partir das  
179 décadas de 80 e 90 (Balén & Fiorentin, 1990).

180 Na região nordeste do Brasil pouco se sabe sobre a ocorrência da infecção por esta  
181 bactéria em plantéis de frangos de corte e galinhas poedeiras. Destaca-se o trabalho  
182 realizado recentemente por Buim *et al.* (2009) que verificaram prevalência de 72,7% de  
183 MS e MG nas granjas em geral. Os resultados indicaram ainda a disseminação de  
184 micoplasma nas granjas estudadas e um aumento na incidência de MS e redução de MG  
185 nas granjas comerciais no Brasil. Fiorentin *et al.* (2002) relataram que lotes livres de  
186 MS introduzidos em uma granja com histórico de infecção, as aves podem infectar-se,  
187 devido a perpetuação do microorganismo na granja.

188 Os resultados obtidos neste estudo confirmam os achados dessa tendência no estado  
189 de Pernambuco, pois também se observou uma maior frequência de detecção de MS nas  
190 granjas estudadas. Ainda de acordo com Buim *et al.* (2009), a presença de micoplasmas  
191 nas propriedades está associada à deficiência nas barreiras sanitárias, podendo ser um  
192 importante fator de risco para a disseminação da doença, esse aspecto é importante do  
193 ponto de vista epidemiológico por que os micoplasmas podem ser transmitidos pela via  
194 horizontal e vertical e esse fato pode facilitar a disseminação dessa bactéria em uma  
195 mesma granja ou para outras que recebem aves, aumentando a frequência de casos e as  
196 perdas econômicas decorrentes dessa infecção.

197 De acordo com Stipkovits & Kempf (1996) uma das características das  
198 micoplasmoses, principalmente em relação ao MS é a infecção assintomática que pode  
199 causar imunossupressão. Contudo, neste estudo todas as amostras positivas para MS  
200 eram procedentes de frangos de corte ou poedeiras comerciais com sinais clínicos de  
201 doença respiratória.

202 Os achados clínicos e macroscópicos observados nas aves com problemas  
203 respiratórios são compatíveis com a forma clínica da micoplasmose aviária. Contudo, os  
204 dados relativos às perdas na conversão alimentar, queda na produção de ovos,  
205 mortalidade embrionária e condenação de carcaça frequentemente relatados na infecção  
206 por micoplasmas (Yoder, 1984; Manfredini *et al.*, 1985; Kleven, 1994) não foram  
207 avaliados neste estudo. É relatado na literatura que após a infecção por MG e/ou MS, as  
208 aves tornam-se mais susceptíveis às infecções secundárias por outros agentes como  
209 vírus e/ou a *Escherichia coli* (Alencar *et al.*, 1998; Ferreira & Knöbl, 2000). Sobre esse  
210 aspecto, observou-se neste estudo o isolamento de *Escherichia coli* em 38,46% das  
211 amostras positivas para MS (Dados não publicados).

212 Para um estudo epidemiológico, vários métodos de diagnóstico são descritos para a  
213 confirmação da presença da infecção por *Mycoplasma* (Kleven, 1994). Para comparação  
214 dos métodos de PCR e cultivo em swabs de lavados de traquéia de frangas soropositivas  
215 para MS e infectadas experimentalmente com MG, Salisch *et al.* (1998) observaram que  
216 das 76 amostras de swab traqueal, 62 amostras foram positivas na PCR enquanto 41  
217 amostras foram positivas no cultivo. Embora geralmente se considere a cultura como  
218 melhor método para o diagnóstico definitivo da infecção por mycoplasma, esta técnica  
219 pode apresentar a desvantagem por ser trabalhosa, além de depender da viabilidade do  
220 microorganismo na amostra enquanto que a PCR não depende dessa viabilidade,  
221 apresentando-se mais rápida, sensível e específica (Kleven, 1994).

222 Outra vantagem da PCR é que as infecções mistas com outros mycoplasmas ou  
223 outras bactérias não interferem na reação, sendo uma alternativa para o diagnóstico das  
224 micoplasmoses aviárias (Nascimento *et al.*, 1991). Ainda é escolhida por ser um método  
225 específico e sensível para amplificação de baixa quantidade de DNA que podem ser  
226 facilmente detectada (Saiki *et al.*, 1985; Innis & Gelfand, 1990), auxiliando os

227 programas de monitoramento das granjas e também na diferenciação de cepa de campo  
228 e vacinal de MG (Nascimento *et al.*, 1993; Mettifogo *et al.*, 2002). Destacando-se em  
229 nosso trabalho, o resultado da PCR para MG na granja de poedeira comercial com  
230 histórico de vacinação, e a realização dessa diferenciação como cepa vacinal MG-F.

231 *Mycoplasma synoviae* esteve presente como a única espécie identificada,  
232 independente do tipo de criação. A produção avícola do Estado de Pernambuco poderá  
233 discutir medidas de controle e biossegurança para prevenir a propagação do agente nos  
234 plantéis. Indica-se, ainda, a utilização da PCR para o diagnóstico e/ ou monitoria das  
235 micoplasmoses nas criações avícolas comerciais, sendo também necessária para  
236 diferenciar cepa de campo de MG com a cepa vacinal MG-F, incluída no programa  
237 vacinal em granjas de poedeira comercial.

238

### 239 **Agradecimentos**

240 Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq  
241 (Processo Nº 561360/2008-1) e ao Médico Veterinário Glédiston Posso da empresa  
242 ALIVET produtos agropecuários Ltda pelo apoio financeiro para realização desse  
243 estudo. À Dra. Virginia Léo de Almeida da Universidade Federal Fluminense, Niterói,  
244 RJ, Brasil e a Dra. Maria Lúcia Barreto do Núcleo de Animais de Laboratório da  
245 Universidade Federal Fluminense pela contribuição.

246

### 247 **Referências**

- 248 Alencar, A.P., Nascimento, E.R., Danelli, M.G.M., Lignon, G.B., Santos, M.A.J. &  
249 Nascimento, M.G.F. (1998). Relação entre infecção por *Mycoplasma gallisepticum* e  
250 *M. synoviae* e lesões de sacos aéreos em frangos de corte. *Revista Brasileira Medicina*  
251 *Veterinaria*, 20, 257-262.
- 252 Balen, L. & Fiorentin, L.O. (1990). *Mycoplasma synoviae* e seu impacto econômico  
253 sobre a avicultura. In: Anais Conferência APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas  
254 (p.135-140). Campinas, São Paulo.

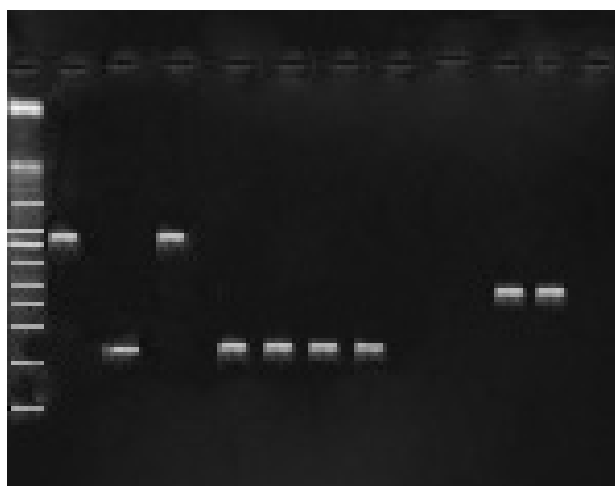


- 255 Buim, M.R. *Mycoplasma synoviae*: Diagnóstico, caracterização molecular e interação  
256 parasita-hospedeiro, **Tese**, 2005.  
257
- 258 Buim, M.R., Mettifogo, E., Timenetsky, J., Kleven, S. & Ferreira, A.J.P. (2009).  
259 Epidemiological survey on *Mycoplasma* and *Mycoplasma synoviae* by multiplex PCR  
260 in commercial poultry. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, 29, 552-556.  
261
- 262 Ferreira, A.J.P. & Knöbl, T. (2000). Colibacilose Aviária. In: Berchieri Jr., A., Macari,  
263 M. (2000). Doenças das aves. (Cap.4, p. 197-207). Campinas: FACTA.  
264
- 265 Fiorentin, L., Mores, M.A.Z., Trevisol, I.M., Antunes, S.C., Costa, J.L.A., Soncini, R.  
266 A. & Vieira, N.D. (2002). Comportamento da infecção por *Mycoplasma synoviae* em  
267 matrizes de corte introduzidas em granja com histórico de positividade. *Revista*  
268 *Brasileira de Ciência Avícola*, 4 (Suppl.), 122.  
269
- 270 Fiorentin, L., Soncini, R.A., Costa, J.L.A., Mores, M.A.Z., Trevisol, I.M., Toda, M. &  
271 Veira, N.D. (2003). Apparent eradication of *Mycoplasma synoviae* in broiler breeders  
272 subjected to intensive antibiotic treatment directed to control *Escherichia coli*. *Avian*  
273 *Pathology*, 32, 213-216.  
274
- 275 Innis, M.A. & Gelfand, D.H. (1990). Optimization of PCRs. In: M.A. Innis, D.H.  
276 Gelfand, J.J. Sninsky, and T.J. White, (Ed.). (1990). PCR protocols a guide to methods  
277 and applications (p. 3-11). San Diego, California: Academic Press.  
278
- 279 Kleven, S.H. (1994). Summary of disussions, Avian Mycoplasma Team, Inernational  
280 Research Programo n comparative Mycoplasmology, University of Ljubljana, Domzale,  
281 Slovenia. *Avian Pathology*, 23, 587-594.  
282
- 283 Landis, J.R. & Koch, G.G. (1977). The measurement of observer agreement for  
284 categorical data. *Biometrics*, 33, 159-74.  
285
- 286 Lauerman, L.H. (1998). *Mycoplasma* PCR Assays: Nucleic Acid Amplification Assays  
287 for diagnosis of animal diseases. Alabama: Department of Agriculture and Industries,  
288 150p.  
289
- 290 Manfredini, R. (1985). *Mycoplasma* spp.: as bacterinas como método de controle. In I  
291 ENCONTRO EMPRESARIAL DE ATUALIZAÇÃO EM PATOLOGIA AVÍCOLA,  
292 (p.1). Campinas, São Paulo.  
293
- 294 Mettifogo, E., Buim, M.R., Ferreira, A.J.P., Buzinhani, M., Sakata, S.T. & Timenetsky,  
295 J. (2002). Padronização de multiplex PCR para a detecção de *Mycoplasma synoviae*, *M.*  
296 *gallisepticum*, e *M. gallisepticum* cepa F vacinal. *Revista Brasileira Ciência Avícola*,  
297 Suplemento 4, 121.  
298
- 299 Minharro, S., Linhares, G.F.C., Andrade, M.A., Rocha, P.T. & Santana, A.P. (2001).  
300 Envolvimento de *Escherichia coli*, de *Mycoplasma gallisepticum* e de *Mycoplasma*  
301 *synoviae* em lesões de sacos aéreos em frangos de corte abatidos no Estado de Goiás.  
302 *Ciência Animal Brasileira*, 2, 111-117.  
303

- 304 Nascimento, E.R., Yamamoto, R., Herrick, K.R. & Tait, R.C. (1991). Polymerase Chain  
305 Reaction for Detection of *Mycoplasma gallisepticum*. *Avian Diseases*, 35, 62-69.  
306
- 307 Nascimento, E.R., Yamamoto, R., & Khan, M.I. (1993). *Mycoplasma gallisepticum* F-  
308 Vaccine Strain-Specific Polymerase Chain Reaction. *Avian Diseases*, 37, 203-211.  
309
- 310 Nascimento, E.R. (2000). Micoplasmoses. In M. Macari & Jr. A. Berchieri (Eds).  
311 *Doenças das Aves*. (pp. 217-240). Campinas: FACTA.  
312
- 313 Nascimento, E.R., Nascimento, M.G.F., Vasconcelos, P., Barreto, M. L., Almeida, J. F.,  
314 Campos, C.A. & Pereira, V.L.A. (2005). Aprimoramento da PCR para *Mycoplasma*  
315 *gallisepticum* pelo encurtamento do amplicon e ajustes no processamento da amostra.  
316 *Acta Scientiae Veterinariae*, 33, 297-301.  
317
- 318 Reis, S.R., Resende, M., Ornellas-Santos, P.P., Yamamoto, R. & Oliveira, R.L. (1973).  
319 Micoplasmoses animais. Frequência de *M. meleagridis* e *M. gallisepticum* em perus em  
320 Minas Gerais. *Arquivo Brasileiro Medicina Veterinaria Zootecnia*, 24, 197-199.  
321
- 322 Rosales, A.G. (1991). Enfermedades respiratorias en el pollo de engorde –  
323 manifestaciones clinicas, etiologia y control In CONFERÊNCIA APINCO 1991 DE  
324 CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, (p.163-176). Campinas, São Paulo.  
325
- 326 Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. & Arnheim,  
327 N. (1985). Enzymatic amplification of B-globin genomic sequences and restriction site  
328 analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230, 1350-1354.  
329
- 330 Salisch, H., Hinz, K.H., Graack, H.D. & Ryll, M. (1998). A comparison of a  
331 commercial PCR-based test to culture methods for detection of *Mycoplasma synoviae* in  
332 concurrently infected chickens. *Avian Pathology*, 27, 142-147.  
333
- 334 Sambrook, K.J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: Laboratory*  
335 *Manual*. New York: Cold Spring Harbor.  
336
- 337 Stipkovits, L. & Kempf, I. (1996). Micoplasmoses in poultry. *Revista. Science.*  
338 *Techology Of International Epizooiology*, 15, 1495-1525.  
339
- 340 Yoder, H. W., Jr. (1984). *Mycoplasma gallisepticum* infection. In Diseases of Poultry,  
341 8<sup>th</sup> ed M. S. Hofstad, H. J. Barnes, B. W. Calnek, W. M. Reid, and H. W. Yoder, Jr.  
342 (Ed.). (1984). *Mycoplasmosis*. (pp. 190-212). Iowa: *American Association of Avian*  
343 *Pathologists*.  
344  
345  
346  
347  
348  
349  
350

351

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11



352

353 Figura 1 - Resultados dos amplicons obtidos na PCR e Nested-PCR para detecção de  
354 *Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma synoviae*. M: Ladder 100pb; 1-2 controle  
355 positivo para MG (732pb) e MS (207pb), 3-8 isolados de aves. 9-10 controle positivo  
356 Nested-PCR MG (481pb) e isolado de ave. 11- Controle negativo sem DNA.

## NORMAS DA REVISTA

### Avian Pathology

Published in association with the WVPA

Increased 2008 Impact Factor! Was 1.257 NOW **1.700** ©2009 Thomson Reuters 2008 JCR®

Published on behalf of the Houghton Trust

**ISSN:** 1465-3338 (electronic) 0307-9457 (paper)

**Publication Frequency:** 6 issues per year

**Subjects:** Agriculture & Environmental Sciences; Virology;

**Publisher:** Taylor & Francis

- [Sign In](#) ⇔
- [Online Sample](#)

### Instructions for Authors

**Scope of the journal.** *Avian Pathology* will consider original material relevant to the entire field of infectious and non-infectious diseases of poultry and all other birds, including infections that may be of zoonotic/food-borne importance. Subject areas include pathology; diagnosis; detection and characterisation of pathogens; gene sequences; epidemiology; immune responses; vaccines; genetics in relation to disease; and physiological and biochemical changes that are in response to disease. Manuscripts reporting cases of naturally occurring disease must describe either new diseases or give significant new information about previously known diseases. The information should significantly enhance knowledge and understanding of the disease or pathogen.

Papers on food-borne microorganisms acquired during or after processing are not appropriate. Manuscripts describing the occurrence or morphology of unicellular eukaryotes and multicellular organisms, or which are essentially catalogues of microorganisms detected, are unlikely to be considered for publication unless they have a clear relationship to disease. First and subsequent reports of occurrence within a country of diseases well-recognized elsewhere will not be accepted unless they also include significant new information about the disease or pathogen. Manuscripts should report novel findings that are of interest to an international readership.

**Types of papers.** The journal publishes **original research papers** and occasional **reviews** (3000 to 7500 words for reviews, excluding references). **All** manuscripts except reviews will be subject to anonymous peer review, normally by two referees.

**Manuscripts should be submitted in English only.** There are no page charges.

**Submission of manuscripts.** Papers for consideration must be uploaded electronically to *Avian Pathology's* Manuscript Central site to facilitate the reviewing process. New

users should first create an account, which can be done at the Manuscript Central site. Once a user is logged onto the site submissions should be made via the Author Centre.

Submission of a manuscript to *Avian Pathology* implies that (a) it has not previously been published, (b) that it is not being submitted for publication elsewhere, (c) that all authors have seen and approved the manuscript, (d) that all authors have obtained permission from their employer or institution to publish, if they have a contractual or moral obligation to do so, and (e) that relevant permissions, including ethical approval, have been obtained for work involving the use of animals and genetic manipulation. Papers describing experiments that demonstrate a lack of concern for current ethical and welfare standards will not be accepted. The decision of the Editors in this respect is final.

**Preparation of manuscripts.** All manuscripts should be typed double-spaced throughout, with margins of at least 25 mm. Continual line numbering should be used throughout the manuscript. The instructions given below should be followed carefully. Authors are encouraged to look at a recent issue of the journal to see the layout style. A free online sample copy of the journal is available via the [Avian Pathology web site](#).

1. **Title page** containing (a) the title of the paper, (b) names of authors (either full given names or initials, according to the authors' preferences), (c) institutions and postal addresses, (d) a short title of not more than 45 characters to be used as a running head and (e) telephone and fax numbers, and e-mail address of the corresponding author. Superscript numbers should be used to link author with institution, and an asterisk (\*) to refer to the corresponding author.
2. **Abstract**, of not more than 250 words (150 for short communications), on a separate page immediately after the title page.
3. **Introduction**, with statements fully supported by references. Although the Introduction should be concise it should be useful not only to those who are very familiar with the topic of the paper but also to non-experts. There should be no statement of the results at the end of the Introduction.
4. **Materials and Methods**, with subheadings, in bold, on the same line as the proceeding text. This section should include accession numbers, under a separate subheading at the end of the section, for sequence data that must be submitted to international databases.
5. **Results**, with subheadings, in bold, on the same line as the proceeding text.
6. A **Discussion**, fully referenced, without unnecessary repetition of the results. The **Results and Discussion** sections may be combined.
7. An **Acknowledgement** section, if required.
8. A **References** section. There is no limit to the number of references in full or short communications. These should be listed alphabetically in the style shown below. Journal titles (in full) and volume numbers are italicised. References within the text should appear as "Wan *et al.* (2004)" or "(Witter, 1997; Brown *et al.*, 1999a,b; Yao & Vakharia, 2001; Wan *et al.* (2004)" i.e. in chronological

order.

Bojesen, A.M., Nielsen, O.L., Christensen, J.P. & Bisgaard, M. (2004). *In vivo* studies of *Gallibacterium anatis* infection in chickens. *Avian Pathology*, 33, 145-152.

Witter, R.L. & Schat, K.A. (2003). Marek's Disease. In Y.M. Saif, H.J. Barnes, J.R. Glisson, A.M. Fadly, L.R. McDougald, & D.E. Swayne. (2003). *Diseases of Poultry* 11th edn (pp.407-465). Ames: Iowa State Press.

Capua, I. & Mutinelli, F. (2001). *A Colour Atlas of and Text on Avian Influenza*. Casalecchio di Reno: Papi Editore.

Hafez, M.M., Schulze, D. & Kösters, J. (1997). Surveillance on verotoxin producing *E. coli* in broiler flocks and processing plants. In A. Székely (Ed.). *Proceedings of the XIth International Congress of the World Veterinary Poultry Association* (p. 101). Budapest, Hungary.

9. **Figure legends** may be submitted on the same page as a figure, if there is sufficient room but should also be provided separately from the illustrations within the main text file, and be grouped i.e. not a separate page for each legend. There is a maximum of three figures/tables in short communications.

**Tables** should be typed on separate pages, numbered consecutively and have a short descriptive heading. Tables may be included in the same file as the main text, or uploaded as separate files. Tables must be made using the table facility of a word processor, not by using the tab key. Footnotes should be indicated with lowercase superscript a, b, c, etc. (uppercase superscript A, B, C, etc. are only used for indicating statistically significantly different data).

**Figures** must be uploaded as separate files i.e. figures must not be embedded in the main text file, and each figure must be uploaded separately from other figures. Authors should, where it is reasonable to do so, design figures to fit within a single column (80 mm) when printed in the journal. Lettering must be large enough to allow for a reduction in size. Scale bars must be included on micrographs. Multi-tone figures e.g. illustrating histology, whether in colour or black-and-white, must be of high, publication quality, to enable referees to assess them. Half tone and full colour figures should be submitted in at least 300 and 600 DPI, respectively.

**Sequence data** should be presented concisely, using a small font size. Use of the single letter amino acid code is preferred. Sequence data must be submitted to a databank, and accession numbers included at the end of the Material and Methods section.

**Proofs.** Usual practice will be to send PDF proofs to the corresponding author by E-mail. Proofs should be returned within 3 days, preferably by E-mail in the first instance and then by fax. It is a condition of acceptance that the Editor reserves the right to proceed to press without submitting the proofs to the author. While reasonable steps will be taken to ensure that proof reading is accurate, neither the Editors nor the Publisher shall be responsible for any errors.

**Free article access**

Corresponding authors can receive 50 free reprints, free online access to their article through our website (<http://www.informaworld.com/>) and a complimentary copy of the issue containing their article. Complimentary reprints are available through Rightslink® and additional reprints can be ordered through Rightslink® when proofs are received. If you have any queries, please contact our reprints department at [reprints@tandf.co.uk](mailto:reprints@tandf.co.uk)

**Copyright.** It is a condition of publication that authors assign copyright or licence the publication rights in their articles, including abstracts, to the Houghton Trust Ltd. This enables us to ensure full copyright protection and to disseminate the article, and of course the Journal, to the widest possible readership in print and electronic formats as appropriate. Authors retain many rights under the Taylor & Francis rights policies, which can be found at [www.informaworld.com/authors\\_journals\\_copyright\\_position](http://www.informaworld.com/authors_journals_copyright_position). Authors are themselves responsible for obtaining permission to reproduce copyright material from other sources.

More details on submitting a paper.

Exceptions are made for authors of Crown or US Government employees whose policies require that copyright cannot be transferred to other parties. We ask that a signed statement to this effect is submitted when returning proofs for accepted papers.

- [Further details and FAQs on Taylor & Francis's policy on copyright and authors' rights](#)

**ARTIGO 2**

**GENES DE VIRULÊNCIA EM *Escherichia coli* ISOLADA DE  
FRANGOS DE CORTE E POEDEIRAS COMERCIAIS NO ESTADO DE  
PERNAMBUCO, BRASIL**

**(Artigo formatado para o periódico Veterinary Microbiology)**



1 **Genes de virulência em *Escherichia coli* isolada de frangos de corte e poedeiras**  
2 **comerciais no Estado de Pernambuco, Brasil**

3  
4 **Resumo:** A *Escherichia coli* é habitante da microbiota intestinal em aves, entretanto  
5 sorotipos patogênicos têm sido associados a processos patológicos extra-intestinais. No  
6 presente estudo foram analisados 35 isolados de *E. coli* obtidos de frangos de corte e de  
7 poedeiras comerciais (seios infra-orbitários, n=12 e conteúdo cecal, n=23), em 24  
8 granjas no Estado de Pernambuco. Os isolados foram semeados em ágar sangue e  
9 incubados a 37°C por 24h para determinar a presença de hemólise. Para avaliar a  
10 patogenicidade dos isolados foi utilizado PCR para genes de virulência e caracterização  
11 filogenética, bem como, teste de citotoxicidade em células Vero e teste de absorção do  
12 vermelho congo. Dos 35 isolados testados, 21 apresentaram hemólise em ágar sangue.  
13 Na PCR, o número de isolados com ampliações para os fatores de virulência testados  
14 foram: *iss* (16), *iutA* (10), *hlyF* (17), *ironN* (11), *ompT* (16), *crl* (10), *fimA* (14), *tsh* (5),  
15 *papA* (2), *csgA* (0) e *iucA* (2). Vinte e oito isolados amplificaram mais de um dos genes  
16 testados em diferentes padrões, sendo classificadas filogeneticamente nos grupos A  
17 (71,42%) e B1 (28,57%). A presença de hemólise em ágar sangue foi superior à  
18 detecção do gene *hlyF* pela PCR. O teste de patogenicidade em ágar vermelho congo  
19 revelou cinco (14,29%) isolados positivos, e todos os isolados testados para avaliação  
20 da citotoxicidade *in vitro* em células Vero apresentaram resultados negativos. A técnica  
21 de PCR para detecção dos fatores de virulência é rápida e prática, podendo ser usada na  
22 rotina laboratorial visando implantar medidas de controle e profilaxia das infecções por  
23 APEC em aves.

24  
25 **Palavras-chave:** *Escherichia coli*, aves, genes, PCR

26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34

35 **Virulence genes of *Escherichia coli* isolates from broilers and commercial layers of**  
36 **Pernambuco State, Brazil**

37

38 **Abstract:** *Escherichia coli* is an intestinal bacteria in chickens, however pathogenic  
39 serotypes have been associated to extra-intestinal pathologic processes. This study  
40 analyzed 35 *E. coli* isolates from broilers and commercial layers (infraorbital sinus n=12  
41 and cecal contents n=23), from 24 commercial poultry farms of the state of  
42 Pernambuco, Brazil. Virulence genes, phylogenetic groups, Vero cells cytotoxicity and  
43 red Congo absorption were evaluated. Hemolysis in blood agar was observed in 21  
44 strains. By PCR, amplifications for virulence genes were: *iss* (16), *iutA* (10), *hlyF* (17),  
45 *ironN* (11), *ompT* (16), *crl* (10), *fimA* (14), *tsh* (5), *papA* (2), *csgA* (0) and *iucA* (2).  
46 More than one gene tested were amplified in 28 strains, classified in phylogenetic  
47 groups A (71.42%) and B1 (28.58%). Hemolysis on blood agar was greater than the  
48 *hlyF* gene detected by PCR. Five (14.29%) were positive in the Congo Red absorption  
49 test and all strains were negative in Vero cell toxicity. Virulence factor detection by  
50 PCR is fast and practical, and it may be used in laboratorial routine to control and  
51 prevent APEC infections in the poultry industry.

52

53 **Keywords:** *Escherichia coli*, birds, genes, PCR.

54

55

56

57

58

59

60

61

62

63

64

65

66

67

## 68 **Introdução**

69

70 Na avicultura industrial moderna, vários fatores ambientais podem influenciar a  
71 composição da microbiota respiratória e intestinal e esta promove importante papel no  
72 desenvolvimento e saúde das aves (Bjerrum et al., 2006).

73 *Escherichia coli* é a bactéria associada com maior frequência à infecção  
74 extraintestinal nas aves (Johnson, 1991). São excretadas de forma contínua, o que torna  
75 a sua distribuição cosmopolita, permanecendo nas criações por longos períodos,  
76 contaminando o alimento e a água que servirão como via de transmissão (Knöbl, 2005).  
77 Estirpes patogênicas para as aves são denominadas de “Avian Pathogenic *Escherichia*  
78 *coli*” (APEC) e são classificadas de acordo com a presença de fatores de virulência  
79 específicos (Ferreira e Knöbl, 2000; Gomis et al., 2001).

80 Dentre os fatores de virulência de *E. coli* de origem aviária destacam-se aqueles  
81 relacionados à patogenicidade das amostras como adesinas fimbriais e não fimbriais,  
82 metabólitos bacterianos, como as bacteriocinas (colicinas), fatores de resistência sérica,  
83 hemolisinas, aerobactina e citotoxinas (Brito, 2000; La Ragione e Woodward, 2002).

84 O sequestro de ferro é reconhecido como um importante fator de patogenicidade  
85 para estes microorganismos (Tivendale et al; 2004; Johnson et al., 2008a; Caza et al.,  
86 2008). A identificação dos fatores de virulência auxilia a compreensão dos mecanismos  
87 de patogenicidade da *E. coli*. Por isso, seu estudo é primordial para o melhor  
88 entendimento da patogênese bacteriana (Babai et al., 1997; Dho-Moulin e Fairbrother,  
89 1999).

90 Os fatores de virulência de *E. coli* podem estar localizados no cromossomo ou  
91 plasmídios. A importância da presença desses elementos genéticos móveis está  
92 relacionada com a virulência da bactéria, e em especial com o desenvolvimento de  
93 septicemia (Babai et al., 1997).

94 Diante do exposto objetivou-se neste estudo pesquisar genes de virulência em *E.*  
95 *coli* isoladas de frangos de corte sadios, frangos de corte e poedeiras comerciais com  
96 sinais clínicos respiratórios e digestivos no Estado de Pernambuco, Brasil.

97

## 98 **Material e Métodos**

99 O protocolo experimental deste estudo seguiu os Princípios Éticos na  
100 Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e  
101 aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Rural de  
102 Pernambuco (CEUA-UFRPE), processo N° 23082.001526.

103

## 104 **Amostragem**

105 Foram utilizadas 11 granjas de frangos de corte sadios e sete granjas de aves com  
106 sinais clínicos respiratórios, além de seis granjas de poedeiras comerciais com aves  
107 apresentando sinais clínicos de doença respiratória e digestiva. O número de granjas  
108 analisadas correspondeu a aproximadamente 20% do total de granjas no Estado. Foi  
109 colhido material biológico dos seios infra-orbitários e conteúdo cecal de 55 frangos de  
110 corte sadios e 35 com sinais clínicos (30 com sinais respiratórios e cinco com sinais  
111 respiratório e digestivo) e 30 poedeiras comerciais com sinais clínicos (25 com sinais  
112 respiratórios e cinco com sinais respiratório e digestivo).

113 Para fins de processamento das técnicas microbiológicas e moleculares foram  
114 formados “pools” de amostras por granja. Cada amostra foi constituída por um “pool”  
115 de cinco aves, totalizando 24 amostras de cada material biológico.

116

## 117 **Exame bacteriológico**

118 Para o isolamento de *E. coli*, as amostras do conteúdo cecal (CC) foram semeadas  
119 em ágar Eosina Azul de Metileno (EMB) e os *swabs* dos seios infraorbitários (SI) foram

120 transferidos para tubos contendo 10 ml de caldo Infusão Cérebro Coração (BHI) e  
121 incubados a 37°C durante 24 horas. Posteriormente, as amostras foram semeadas em  
122 ágar EMB. Logo após, foi selecionada uma colônia típica de cada amostra (SI e CC)  
123 para a realização de provas bioquímicas no tríplice açúcar ferro (TSI), Citrato,  
124 Vermelho de Metila (VM), Voges Proskauer (VP), Indol, Motilidade, produção de gás  
125 sulfídrico no meio - SIM (Carter, 1988). Para realização de todos os testes foi utilizada a  
126 cepa ATCC (25922) de *E. coli*.

127

### 128 **Teste de patogenicidade e citotoxicidade *in vitro***

129 Após a fenotipagem, os isolados foram submetidos ao teste de patogenicidade *in*  
130 *vitro*, realizado por meio do cultivo em ágar oxalato de magnésio acrescido de vermelho  
131 congo e incubada a 37°C durante 24 horas (Riley e Toma, 1989).

132 Todos os isolados foram submetidos ao teste de produção de verotoxinas, realizada  
133 por meio da prova de citotoxicidade em células Vero de acordo com o protocolo  
134 descrito por Blanco et al. (1996).

135

### 136 **Atividade hemolítica**

137 Todos os isolados foram semeados em ágar base acrescido de 5% de sangue  
138 desfibrinado de ovino e incubados a 37°C durante 24h, para verificação da formação do  
139 halo de hemólise (Ludmig e Goebel, 1997).

140

### 141 **Extração de DNA genômico**

142 Após repique de uma colônia por “pool” de amostra, esta foi submetida à extração  
143 de DNA utilizando o kit da Promega® e de acordo com a metodologia utilizada por  
144 Costa et al. (2010).

145

## 146 PCR

147 Para reação de amplificação do DNA foram utilizados iniciadores específicos para  
148 detecção dos genes *hlyF* (Johnson et al., 2006), *iss*, *ironN*, *iutA*, *ompT* (Rodriguez-Siek  
149 et al., 2005), *crl*, *csgA*, *tsh* (Maurer et al., 1998), *fimA* (Marc e Dho-Moulin, 1996),  
150 *papA* (Le Bouguenec et al., 1992) e *iucA* (Okeke et al., 2004). Para determinar os  
151 grupos filogenéticos foram utilizados os genes *chuA*, *yjaA* e TspE4.C2 (Clermont et al.,  
152 2000). Como controle negativo das reações, foram utilizados todos os reagentes, exceto  
153 o DNA. As amostras do DNA genômico foram analisadas em gel de agarose a 1,5% e  
154 corado com brometo de etídio a 5%. Os fragmentos obtidos foram visualizados sob luz  
155 ultravioleta. Utilizou-se o marcador de peso molecular 100pb Ladder<sup>®</sup> (Fermentas, Life  
156 Sciences).

157

## 158 Análise estatística

159 Para esse estudo realizou-se análise estatística descritiva calculando-se a  
160 frequência absoluta e relativa (Sampaio, 1998).

161

## 162 Resultados

163 Os resultados obtidos confirmaram o isolamento de *E. coli* em 12 (50,0%) amostras  
164 dos seios infra-orbitários e 23 (95,83%) do conteúdo cecal de frangos de corte e  
165 poedeiras comerciais. Destes isolados, cinco (14,29%) apresentaram capacidade de  
166 absorção do vermelho congo. Dos 35 isolados testados para a pesquisa de citotoxinas,  
167 nenhum apresentou efeito citotóxico em células Vero. Os resultados da produção de  
168 hemólise demonstraram que 27 (77,14%) isolados apresentaram  $\alpha$ -hemólise, uma  
169 (2,85%)  $\beta$ -hemólise e sete (20,0%) não foram hemolíticos, enquanto que na PCR, 17

170 (48,57%) isolados foram positivos para a detecção do gene *hlyF* responsável pela  
171 produção de hemólise.

172 Na avaliação da presença de genes de virulência, observou-se que os genes *hlyF*  
173 e *ompT* 66,66% (8/12), *iss* 75,0% (9/12), *iroN* 41,66% (5/12) e *tsh* 25,0% (3/12)  
174 apresentaram maior frequência nos isolados dos seios infra-orbitários, enquanto que  
175 para isolados do conteúdo cecal, destaca-se o gene *iutA* 30,43% (7/23) e para os genes  
176 relacionados à aderência observou-se maior frequência para *crl* 65,2% (15/23) e *fimA*  
177 52,2% (12/23) , enquanto que para isolados dos seios infra-orbitários os percentuais de  
178 observação foram 41,66% (5/12) e 16,66% (2/12), respectivamente. Observou-se menor  
179 percentual para os genes *papA* 8,33% (1/12) e 4,34% (1/23), *iucA* 16,66% (2/12) e  
180 8,69% (2/23) em isolados dos seios infra-orbitários e conteúdo cecal, respectivamente.  
181 Resultados negativos foram observados para o gene *csgA* em todos os isolados (Tabela  
182 1). O número de isolados positivos para os genes de virulência foi maior nos isolados de  
183 frangos de corte, quando comparado com poedeiras comerciais com sinais clínicos de  
184 doença respiratória.

185 Os 35 isolados de *E. coli* avaliados para determinação dos grupos filogenéticos,  
186 demonstraram que 71,42% foram classificados como pertencentes ao grupo A e 28,58%  
187 ao grupo B1. Os isolados dos seios infra-orbitários 75,0% (9/12) foram pertencentes ao  
188 grupo A e 25,0% (3/12) grupo B1 e para os isolados do conteúdo cecal 69,57% (16/23)  
189 ao grupo A e 30,43% (7/23) grupo B1. A associação entre os genes de virulência e os  
190 grupos filogenéticos apresentaram *iss*, *iutA*, *hlyF*, *ompT*, *fimA*, *tsh*, *crl* e *csgA* como  
191 pertencentes principalmente ao grupo A com menor número em relação ao grupo B1.  
192 Contudo este último gene apresentou resultados negativos quanto a sua detecção. Os  
193 genes *iroN* e *papA* estiveram relacionados somente ao grupo B1 e o gene *iucA*  
194 apresentou uma relação semelhante para os dois grupos (Tabela 1).

195 **Tabela 1.** Perfil de genes de virulência e determinação dos grupos filogenéticos de  
 196 isolados de *Escherichia coli* dos seios infra-orbitários e conteúdo cecal de origem  
 197 aviária

Cepa	Associação de genes de virulência											Grupos filogenéticos			
	<i>iss</i>	<i>iutA</i>	<i>hlyF</i>	<i>iroN</i>	<i>ompT</i>	<i>fimA</i>	<i>tsh</i>	<i>papA</i>	<i>crl</i>	<i>csgA</i>	<i>iucA</i>	A	B1	B2	D
1	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	A		-	-
2	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-		B1	-	-
3	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	A		-	-
4	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	A		-	-
5	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+		B1	-	-
6	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	A		-	-
7	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	A		-	-
8	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	A		-	-
9	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	A		-	-
10	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	A		-	-
11	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	A		-	-
12	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		B1	-	-
13	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	A		-	-
14	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	A		-	-
15	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	A		-	-
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A		-	-
17	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	A		-	-
18	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	A		-	-
19	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	A		-	-
20	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-		B1	-	-
21	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-		B1	-	-
22	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	A		-	-
23	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	A		-	-
24	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	A		-	-
25	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	A		-	-
26	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	A		-	-
27	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	A		-	-
28	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	A		-	-
29	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-		B1	-	-
30	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-		B1	-	-
31	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	A		-	-
32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	B1	-	-
33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B1	-	-
34	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	A	-	-	-
35	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	B1	-	-

198  
 199  
 200  
 201  
 202

1-7 Isolados dos seios infra-orbitários - Frangos de corte e Poedeiras comerciais com sinais clínicos; 8-12 Frangos de corte sadios. 13-20; 21-24 e 25-35 Isolados do conteúdo cecal de Frangos de corte; Poedeiras comerciais com sinais clínicos e Frangos de corte sadios.



## 203 **Discussão**

204 Este estudo foi pioneiro na região nordeste quanto à pesquisa de genes de virulência  
205 para caracterizar isolados de *E. coli* patogênica (APEC) em frangos de corte e poedeiras  
206 comerciais. Vários autores relataram a importância em diferenciar amostras de *E. coli*  
207 patogênicas das não patogênicas (Ikuno et al., 2006; Johnson et al., 2008a; Rocha et al.,  
208 2008; Nakazato et al., 2009), devido as primeiras estarem associadas às infecções extra-  
209 intestinais em galinhas, e algumas amostras de *E. coli* poderem se tornar patogênicas  
210 pela aquisição de fatores de virulência (Vidoto et al., 1990).

211 Estudos envolvendo patotipos de *E. coli* patogênicos para aves (APEC) apontaram  
212 os fenômenos de aderência bacteriana, crescimento em condições de restrição do íon  
213 ferro e resistência sérica como principais responsáveis pela patogênese da doença (Dho-  
214 Moulin e Fairbrother, 1999). A maioria dos isolados analisados apresentou genes que  
215 caracterizam as condições acima citadas, podendo ser consideradas como APEC.

216 Rocha et al. (2008) relataram que o gene *iss* (73,8%), *tsh* (55,7%) e *iutA* (45,9%)  
217 foram encontrados em isolados de *E. coli* em aves com sinais respiratórios. Resultado  
218 superior quanto ao primeiro gene foi encontrado em nosso estudo correspondendo a  
219 75,0% e inferior em relação ao gene *ths* (25,0%), entretanto, quanto ao último gene este  
220 foi mais freqüente em isolados comensais.

221 Rodriguez-Siek et al. (2005) relataram que o gene *iutA*, *iroN*, *iss* e *tsh* foram  
222 encontrados em alta frequência em APEC, do que em *E. coli* de fezes de aves (AFEC),  
223 sugerindo que fatores de virulência contribuem para sobrevivência em ambientes extra-  
224 intestinais. Ao contrário dos resultados obtidos pelo autor, observou-se que o primeiro  
225 gene apresentou uma alta frequência em isolados comensais, entretanto em relação aos  
226 outros genes, houve uma alta frequência em isolados de *E. coli* de seios infra-orbitários  
227 provenientes de aves com sinais clínicos respiratórios.

228 Yoder (1989) utilizou a técnica do vermelho congo obtendo resultado negativo de  
229 *E. coli* isoladas de aves em caso de morte por septicemia, porém Silva e Fiorentin  
230 (1995) consideraram que este método revelou não ser eficiente como técnica de  
231 diagnóstico. Correlacionar amostras patogênicas de *E. coli* com absorção do vermelho  
232 congo não foi determinante neste estudo, pois amostras que não absorveram o vermelho  
233 congo apresentaram genes de virulência que as caracterizaram como APEC.

234 A detecção de citotoxinas também é utilizada para verificar a capacidade  
235 patogênica pela produção de verotoxinas em amostras de *E. coli* que podem estar  
236 envolvidas em doenças intestinais e extraintestinais (Ismaili et al., 1995). Blanco et al.  
237 (1996) observaram que das 625 amostras de *E. coli* de órgãos de galinhas com  
238 colisepticemia e fezes de aves saudáveis, apenas 20 apresentaram citotoxicidade em  
239 células HeLa, mas não em células Vero. Sob condições experimentais, VTEC O157: H7  
240 é capaz de colonizar cecos de galinhas, seguido de prolongada eliminação nas fezes  
241 (Beery et al., 1985). Esta constatação levou a proposta de que as galinhas podem ser um  
242 reservatório do organismo, apesar de nossos resultados não confirmarem esta afirmação.  
243 Irwin et al. (1989) avaliaram 500 *swabs* cloacais de galinhas e os resultados  
244 apresentaram-se também negativos. Os resultados obtidos são semelhantes aos dos  
245 autores citados em relação à produção de citotoxinas, pois nenhuma dos isolados dos  
246 seios infra-orbitários e comensais apresentaram efeito citotóxico nas células Vero.

247 Isolados de *E. coli* hemolíticos são considerados altamente virulentos para humanos  
248 e suínos, devido a sua habilidade em lisar as células do sangue (Kuhnert et al., 2000;  
249 Silveira et al., 2001). Rodriguez-Siek et al. (2005) realizaram estudo em isolados de  
250 APEC e de AFEC e observaram que todos apresentaram resultado negativo para  
251 hemólise em ágar sangue. Neste estudo, a presença de hemólise em ágar sangue foi  
252 observada em 80% (28/35) dos isolados, enquanto que na PCR a detecção do gene *hlyF*

253 foi observada em 48,6% (17/35) dos isolados. Esta diferença pode estar associada a uma  
254 expressão silenciosa ou mutação do gene *hly* em *E. coli* (Schimidt e Karch, 1996;  
255 Pimenta et al., 2005). De acordo com Schmid e Karch (1996), a detecção de hemólise  
256 em ágar sangue não é suficiente para caracterização de *E. coli*, devendo ser utilizada  
257 outra técnica como a PCR.

258 De acordo com Clermont et al. (2000) a análise filogenética é utilizada para  
259 determinar os grupos de *E. coli* em A, B1, B2 e D, sendo as cepas pertencentes ao grupo  
260 D consideradas como patogênicas, no grupo A comensais e não patogênicas e cepas  
261 virulentas de *E. coli* extra-intestinal ao grupo B2. Entretanto, estudos relataram que *E.*  
262 *coli* isolada de bovinos e suínos pertencem aos grupos filogenéticos A e B1, enquanto  
263 que isolados de *E. coli* patogênica de aves pertencem aos grupos A, D e B1, onde 37%  
264 de APEC pertenceram ao grupo A e 30% ao grupo D (Johnson et al., 2008b;  
265 Ghanbarpour et al., 2010) e que isolados patogênicos de humanos pertenciam  
266 predominantemente ao grupo filogenético B2 e D (Johnson et al., 2003). Observou-se  
267 neste estudo, que 75,0% dos isolados dos seios infra-orbitários foram classificados  
268 dentro do grupo A apresentando também de dois a seis genes de virulência que  
269 caracterizam a patogenicidade.

270 A constatação de que a maioria das cepas de *E. coli* isoladas de quadros de onfalite  
271 foram classificadas como não patogênicas (Grupo A) sugere que provavelmente tenha  
272 origem comensal e atuem como patógenos oportunistas causando onfalite em embriões  
273 de galinha (Silveira et al., 2002). Campos et al. (2008) relatam em seu estudo que 50%  
274 das cepas septicêmicas pertenciam ao grupo A sendo provavelmente de origem  
275 comensal, mas podiam tornar-se patogênicas por aquisição de genes relacionados a  
276 virulência e serem transmitidas de forma horizontal. A pesquisa de genes de virulência  
277 utilizando-se a PCR demonstra que a maioria das cepas de *E. coli* patogênica de aves

278 (APEC) apresentam dois ou mais genes de virulência (Campos et al., 2008). Por meio  
279 desta técnica, observamos que os resultados obtidos dos isolados comensais (70,83%)  
280 de frangos de corte e poedeiras comerciais apresentaram de dois a oito genes de  
281 virulência, e nos isolados dos seios infra-orbitários (91,67%) foram detectados de dois  
282 até seis genes de virulência incluindo os genes *iss*, *tsh* e *iroN*. A presença de alguns  
283 fatores de virulência como *iss*, *ths* e *iroN* pode tornar uma cepa mais adaptável e  
284 melhorar a sua sobrevivência no hospedeiro, e a associação de mais de um gene de  
285 virulência na mesma cepa pode proporcionar maior patogenicidade e resultar em uma  
286 maior virulência (Camarda et al., 2008).

287 As informações sobre a epidemiologia das APECs, como a ocorrência de  
288 marcadores de virulência e a possibilidade de transmissão de isolados clínicos de *E. coli*  
289 é bem documentada em vários países, entretanto, no Brasil há poucos dados, o que  
290 restringe o emprego de medidas eficientes para o controle epidemiológico e para  
291 prevenção de colisepticemia (Ikuno et al., 2006).

292

### 293 **Conclusão**

294 Neste estudo, vários genes de virulência foram detectados em isolados de *E. coli*  
295 de frangos de corte sadios e com sinais clínicos respiratórios, apresentando um menor  
296 número em poedeiras comerciais com doença respiratória. Os seios infra-orbitários  
297 apresentaram um maior número de genes que classificam *E. coli* em APEC. A detecção  
298 de genes de virulência em isolados do conteúdo cecal pode estar associada a quadros  
299 respiratórios mais expressivos e doença extra-intestinal.

300

301

302

303

**304 Agradecimentos**

305 Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq  
306 (Processos Nº 561360/2008-1 e Nº 372675/2010-7) e ao Médico Veterinário Glédiston  
307 Posso da empresa ALIVET produtos agropecuários Ltda, Brasil pelo apoio financeiro  
308 para realização desse estudo.

309

**310 Referências**

- 311 Babai, R., Blum-Oelher, G., Stern, B.E., Hacker, J., Ron, E.Z., 1997. Virulence patterns  
312 from septicemic *Escherichia coli* O78 strains. FEMS. Microbiol. Lett. 149, 99-105.  
313
- 314 Beery, J.T., Doyle, M.P., Schoeni, J.L., 1985. Colonization of chicken cecae by  
315 *Escherichia coli* associated with hemorrhagic colitis. Appl. Environm. Microbiol. 49,  
316 310-315.
- 317 Bjerrum, L., Engberg, R. M., Leser, T. D., Jensen, B. B., Finster, K., Pedersen. K.,  
318 2006. Microbial community composium of the ileum and cecum of broiler chickens as  
319 revealed by molecular and culture-based techiques. Poult. Sci. 85, 1151-1164.
- 320 Blanco, J., Cid, D., Blanco, J.E., Blanco, M., Ruíz Santa Quiteira, J.A., La Fuente, R.,  
321 1996. Serogroups, toxins and antibiotic resistance of *Escherichia coli* strains isolated  
322 from diarrhoeic lambs in Spain. Vet. Microbiol. 49, 209-217.  
323
- 324 Brito, B.G., 2000. Fatores de virulência de *Escherichia coli* de origem aviária – APEC.  
325 In: Simpósio de Sanidade Avícola, 2000, Concórdia.. *Anais...* Concórdia: EMBRAPA,  
326 p. 56-69.  
327
- 328 Camarda, A., Circella, E., Pennelli, D., Battista, P., Di Paola, G., Madio, A., Tagliabue,  
329 S., 2008. Occurence of pathogenic and faecal *Escherichia coli* in layers hens. Ital. J.  
330 Anim. Sci. 7, 385-389.  
331
- 332 Campos, T.A., Lago, J.C., Nakazato, G., Stehling, E.G., Brocchi, M., Castro, A.F.P.,  
333 Silveira, W.D., 2008. Occurence of virulence related sequences and phylogenetic  
334 analyses of commensal and pathogenic avian *Escherichia colistrains* (APEC). Pesq.  
335 Vet. Bras. 28, 533-540.  
336
- 337 Carter, G.R. 1988. Fundamentos de Bacteriologia e Micologia Veterinária. Roca, São  
338 Paulo, 250p. 1988.  
339
- 340 Caza, M., Lepine, F., Milot, S., Dozois, C.M., 2008. Specific roles of the *ironBCDEN*  
341 genes in virulence of an avian pathogenic *Escherichia coli* O78 strain and in production  
342 of salmochelins. Infect. Immun. 76, 3539-3549.  
343
- 344 Clermont, O., Bonacorsi, S., Bingen, E., 2000. Rapid and simple determination of the  
345 *Escherichia coli* phylogenetic group. Appl. Env. Microbiol. 66, 4555-4558.  
346

- 347 Costa, M. M., Drescher, G., Maboni, F., Weber, S., Schrank, A., Vainstein, M. H.,  
348 Schrank, I., Vargas, A. C., 2010. Virulence factors, antimicrobial resistance and plasmid  
349 content of clinical and environmental *Escherichia coli* swine isolates. Arq. Bras. Med.  
350 Vet. Zootec. v. 62, 30-36.  
351
- 352 Dho-Moulin, M., Fairbrother, J.M., 1999. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC).  
353 Vet. Res. 30, 299-316.  
354
- 355 Ferreira, A.J.P., Knöbl, T., 2000. Colibacilose aviária. In: Berchieri Júnior, A.; Macari,  
356 M. Doenças das aves. Campinas: FACTA. 197-204.  
357
- 358 Ghanbarpour, R., Salehi, M., Oswald, E., 2010. Virulence genotyping of *Escherichia coli*  
359 isolates from avian cellulitis in relation to phylogeny. Comp. Clin. Pathol. 19, 147-153.  
360
- 361 Gomis, S.M., Riddell, C., Potter, A.A., Allan, B.J., 2001. Phenotypic and genotypic  
362 characterization of virulence factors of *Escherichia coli* isolated from broiler chickens  
363 with simultaneous occurrence of cellulitis and other colibacillosis lesions. Can. J. Vet  
364 Res. 65, 1-6.  
365
- 366 Ikuno, A.A., Guastalli, E.A.L., Buim, M.R., Gama, N.M.S.Q., França, S.B., Alonso,  
367 A.C., Fujikura, L.M., Ferreira, V.C.A., 2006. Genes de virulência associados em  
368 *Escherichia coli* (APEC) isoladas de poedeiras comerciais, do meio ambiente e de água  
369 de dessedentação de granjas de postura de ovos. Arq. Inst. Biol. 67, 68-72.  
370
- 371 Irwin, R.J., Scott, A.M., Clarke, R.C., Meek, A.H., 1989. The prevalence of  
372 Verocytotoxin producing *Escherichia coli* and antimicrobial resistance patterns of  
373 nonverocytotoxin producing *Escherichia coli* and *Salmonella* in otario broiler chickens.  
374 Can. J. Vet. Res. 53, 411-418.  
375
- 376 Ismaili, A., Philipott, D.J., Dytoc, M.T., Sherman, P.M., 1995. Signal trasdiction  
377 responses following adhesion of verocytotoxin producing *Escherichia coli*. Infect.  
378 Immun. 63, 3316-3326.  
379
- 380 Johnson, J.R., 1991. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. Clin.  
381 Microbiol. Rev. 4, 80-128.  
382
- 383 Johnson, J., Kuskowski, M., Owens, K., Gajewski, A., Winokur, P., 2003. Phylogentic  
384 origin and virulence genotype in relation to resistance to fluorquinolones and/or extend-  
385 spectrum cephalosporins and cephamycin among *Escherichia coli* isolates from animals  
386 and humans. J. Infect. Dis. 188, 759-768.  
387
- 388 Johnson, T.J., Siek, K.E., Johnson, S.J., Nolan, L.K., 2006. DNA sequence of a ColV  
389 plasmid and prevalence of selected plasmid-encoded virulence genes among avian  
390 *Escherichia coli* strains. J. Bacteriol. 188, 745-758.  
391
- 392 Johnson, T.J., Wannemuehler, Y., Doetkott, C., Johnson, S.J., Rosenberg, S.C., Nolan,  
393 L.K., 2008a. Identification of minimal predictors of avian pathogenic *Escherichia coli*  
394 (APEC) virulence for use as a rapid diagnostic tool. J. Clin. Microbiol. 46, 3987-3996.  
395
- 396 Johnson, T.J., Wannemuehler, Y., Johnson, S.J., Adam, L.S., Doetkott, C., James, R.J.,  
397 Kim, K.S., Spanjaard, L., Nolan, L.K., 2008b. Comparison of extraintestinal pathogenic

- 398 *Escherichia coli* strains from Human and Avian sources reveals a mixed subset  
399 representing potential zoonotic pathogens. Appl. Environ. Microbiol. 74, 7043-7050.  
400
- 401 Kuhnert, P., Boerlin, P., Frey, J., 2000. Target genes for virulence assessment of  
402 *Escherichia coli* isolates from water, food and the environment. FEMS. Microbiol. Rev.  
403 24, 107-117.  
404
- 405 Knöbl, T., 2005. Caracterização epidemiológica molecular e de virulência de  
406 *Escherichia coli* *sfa* + isoladas de aves. São Paulo, 2005. 100p. Tese (Doutorado).  
407 Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.  
408
- 409 La Ragione, R.M., Woodward, M.J., 2002. Virulence factors of *Escherichia coli*  
410 serotypes associated with avian colisepticemia. Res. Vet. Sci. 73, 27-35.  
411
- 412 Le Bouguenec, C., Archambaud, M., Labigne, A., 1992. Rapid and Specific detection of  
413 the *pap*, *afa*, and *sfa* adhesion encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli*  
414 strains by polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol. 30, 1189-1193.  
415
- 416 Ludwig, A., Goebel, W., 1997. Haemolysins of *Escherichia coli*. In: Sussman, M.  
417 *Escherichia coli* mechanisms of virulence. Cambridge: Cambridge University, 281-329.  
418
- 419 Marc, D., Dho-Moulin, M., 1996. Analyses of the *fim* cluster of an avian O2 strain  
420 *Escherichia coli*: serogroup specific sites within *fimA* and nucleotide sequence of *fim*. J.  
421 Med. Microbiol. 44, 444-452.  
422
- 423 Maurer, J.J., Brown, T.P., Steffens, W.L., Thayer, S.G., 1998. The occurrence of  
424 ambient temperature regulated adhesions, curli, and the temperature sensitive  
425 hemagglutinin Tsh among avian *Escherichia coli*. Avian. Dis. 42, 106-118.  
426
- 427 Nakazato, G., Campos, T.A., Stehling, E.G., Brocchi, M., Silveira, W.D., 2009.  
428 Virulence factors of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). Pesq. Vet. Bras. 29,  
429 479-486.  
430
- 431 Okeke, I.N., Scaletsky, I.C.A., Soars, E.h., Macfarlane, L.r., torres, A.G., 2004.  
432 Molecular epidemiology of the iron utilization genes of enteroaggregative *Escherichia*  
433 *coli*. J. Clin. Microbiol. 42, 36-44.  
434
- 435 Pimenta, A.L., Racher, K., Jamieson, L., Blight, M.A., Holland, I.B., 2005. Mutations in  
436 HlyD, part of the type 1 translocator for hemolysin secretion, affect the folding of the  
437 secreted toxin. J. Bacteriol. 187, 7471-7480.  
438
- 439 Rocha, A.C.G.P., Rocha, S.L.S., Lima-Rosa, C.A.V., Souza, G.F., Moraes, H.L.S.,  
440 Salle, F.O., Moraes, L.B., Salle, C.T.P., 2008. Genes associated with pathogenicity of  
441 avian *Escherichia coli* (APEC) isolated from respiratory cases of poultry. Pesq. Vet.  
442 Bras. 28, 183-186.  
443
- 444 Rodriguez-Siek, K.E., Giddings C.W., Doetkott, C., Johnson, T.J., Nolan, L.K., 2005.  
445 Characterizing the APEC pathotype. Vet. Res. 36, 241-256.  
446
- 447 Riley, G., Toma, S., 1989. Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* by using  
448 congo red magnesium oxalate agar medium. J. Clin. Microbiol. 27, 213-214.  
449

- 450 Sampaio, I.B.M. 1998. Estatística aplicada à experimentação animal. Belo Horizonte:  
451 UFMG. 221p.
- 452 Schmidt, H., H. Karch., 1996. Enterohemolytic phenotypes and genotypes of Shiga  
453 toxin-producing *Escherichia coli* O111 strains from patients with diarrhea and  
454 hemolytic uremic syndrome. J. Clin. Microbiol. 34, 2364-2367.  
455
- 456 Silva, G., Fiorentin, L., 1995. Correlação entre a patogenicidade de *Escherichia coli* em  
457 pintos e a coloração das colônias crescidas em Agar contendo vermelho congo. Hora  
458 Vet. 87, 22-24.  
459
- 460 Silveira, W., Benetti, F., Lancelotti, M., Ferreira, A., Solferini, V., Brocchi, M., 2001.  
461 Biological and genetic characteristics of uropathogenic *Escherichia coli* strains. Rev. Inst.  
462 Med. Trop. São Paulo. 43, 303-310.  
463
- 464 Silveira, W.D., Ferreira, A., Brocchi, M., Hollanda, L.M., Castro, A.F.P., Yamada, A.T.,  
465 Lancellotti, M., 2002. Biological characteristics and pathogenicity of avian *Escherichia*  
466 *coli* strains. Vet. Microbiol. 85, 47-53.  
467
- 468 Tivendale, K.A., Allen, J.L., Ginns, C.A., Crabb, B.S., Browning, G.F., 2004.  
469 Association of *iss*, and *iucA*, but not *tsh*, with plasmid mediated virulence of avian  
470 pathogenic *Escherichia coli*. Infect. Immun. 72, 6554-6560.  
471
- 472 Vidoto, M.C., Muller, E.E., Freitas, J.C., Alfieri, A.A., Guimarães, I.G., Santos, D.S.,  
473 1990. Virulence factors of avian *Escherichia coli*. Avian. Dis. 34, 531-538.  
474
- 475 Yoder, H.W.JR., 1989. Congo red binding by *Escherichia coli* isolates from chickens.  
476 Avian. Dis. 33, 502-505.



## NORMAS DA REVISTA

### Veterinary Microbiology

#### Guide for Authors

##### Types of contribution

1. Original research papers (Regular Papers)
2. Review articles
3. Short Communications
4. Letters to the Editor
5. Book Reviews

*Original research papers* should report the results of original research. The material should not have been previously published elsewhere, except in a preliminary form.

*Review articles* should cover subjects falling within the scope of the journal. Of particular interest are topical, short (Mini) Reviews in areas of current interest. Instructions for the preparation of such articles are available from the Reviews Editor J. Glenn Songer (gsonger@u.arizona.edu). Prior to submitting Review papers, authors should discuss the proposed content with the Reviews Editor.

*A Short Communication* is a concise but complete description of a limited investigation, which will not be included in a later paper. Short Communications should be as completely documented, both by reference to the literature and description of the experimental procedures employed, as a regular paper. They should not occupy more than 6 printed pages (about 12 manuscript pages, including figures, tables and references).

*Letters to the Editor* offering comment or useful critique on material published in the journal are welcomed. The decision to publish submitted letters rests purely with the Editor-in-Chief. It is hoped that the publication of such letters will permit an exchange of views which will be of benefit to both the journal and its readers.

*Book Reviews* will be included in the journal on a range of relevant books which are not more than 2 years old.

##### Submission of manuscripts

Submission to *Veterinary Microbiology* now proceeds online via Elsevier Editorial System - <http://ees.elsevier.com/vetmic>. Authors will be guided step-by-step through uploading files directly from their computers. Authors should select a set of classifications for their papers from a given list, as well as a category designation (Original Research Paper, Short Communication, and so on). Electronic PDF proofs will be automatically generated from uploaded files, and used for subsequent reviewing.

Authors are invited to suggest the names of up to 5 referees (with email addresses) whom they feel are qualified to evaluate their submission. Submission of such names does not, however, imply that they will definitely be used as referees.

Authors should send queries concerning the submission process or journal procedures to: [AuthorSupport@elsevier.com](mailto:AuthorSupport@elsevier.com). Authors can check the status of their manuscript within the review procedure using Elsevier Editorial System.

Authors submitting hard copy papers will be asked to resubmit using Elsevier Editorial System.

Submission of an article is understood to imply that the article is original and is not being considered for publication elsewhere. Submission also implies that all authors have approved the paper for release and are in agreement with its content. Upon acceptance of the article by the journal, the author(s) will be asked to transfer the copyright of the article to the Publisher. This transfer will ensure the widest possible dissemination of information.

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted.

### **Acknowledgements**

All contributors who do not meet the criteria for authorship as defined above should be listed in an acknowledgements section. Examples of those who might be acknowledged include a person who provided purely technical help, writing assistance, or a department chair who provided only general support. Authors should disclose whether they had any writing assistance and identify the entity that paid for this assistance.

### **Conflict of interest**

At the end of the text, under a subheading "Conflict of interest statement" all authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organisations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding.

### **Role of the funding source**

All sources of funding should be declared as an acknowledgement at the end of the text. Authors should declare the role of study sponsors, if any, in the study design, in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the manuscript; and in the decision to submit the manuscript for publication. If the study sponsors had no such involvement, the authors should so state.

### **Ethics**

Circumstances relating to animal experimentation must meet the International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals as issued by the Council for the International Organizations of Medical Sciences. They are obtainable from: Executive Secretary C.I.O.M.S., c/o WHO, Via Appia, CH-1211 Geneva 27, Switzerland, or at the following URL: [http://www.cioms.ch/frame\\_1985\\_texts\\_of\\_guidelines.htm](http://www.cioms.ch/frame_1985_texts_of_guidelines.htm).

Unnecessary cruelty in animal experimentation is not acceptable to the Editors of *Veterinary Microbiology*.

Any new nucleotide or amino acid sequence data will be deposited in publicly accessible databases, such as GenBank, and the accession numbers will be included in the manuscript (Methods section) before it is finally accepted for publication. In addition, it is expected that any plasmids, transposons, viruses, microbial strains, or cell lines described for the first time in the paper will be made available to scientists for non-commercial purposes at reasonable cost following publication.

### **Preparation of manuscripts**

1. Manuscripts should be written in English. Authors whose native language is not English are strongly advised to have their manuscripts checked by an English-speaking colleague prior to submission.

*Language Editing:* Elsevier's Authors Home provides details of some companies who can provide English language and copyediting services to authors who need assistance *before* they submit their article or *before* it is accepted for publication. Authors should contact these services directly. For more information about language editing services, please email [authorsupport@elsevier.com](mailto:authorsupport@elsevier.com).

Please note that Elsevier neither endorses nor takes responsibility for any products, goods or services offered by outside vendors through our services or in any advertising. For more information please refer to our terms & conditions  $\Rightarrow$  <http://www.elsevier.com/termsandconditions>.

2. Manuscripts should have **(numbered lines)** with wide margins and **double spacing** throughout, i.e. also for abstracts, footnotes and references. **Every page of the manuscript, including the title page, references, tables, etc. should be numbered.** However, in the text no reference should be made to page numbers; if necessary, one may refer to sections. Avoid excessive usage of italics to emphasize part of the text.

3. Manuscripts in general should be organized in the following order:

Title (should be clear, descriptive and not too long)

Name(s) of author(s)

Complete postal address(es) of affiliations

Full telephone, Fax No. and E-mail of the corresponding author

Present address(es) of author(s) if applicable

Complete correspondence address including e-mail address to which the proofs should be sent

Abstract

Keywords (indexing terms), normally 3 – 6 items. Please refer to the cumulative index.

Introduction

Material studied, area descriptions, methods, techniques

Results

Discussion

Conclusion

Acknowledgements and any additional information concerning research grants, etc.

References

Tables

Figure captions

Tables (separate file(s))

Figures (separate file(s))

4. Titles and subtitles should not be run within the text. They should be typed on a separate line, without indentation. Use lower-case letter type.
5. SI units should be used.
6. Elsevier reserves the privilege of returning to the author for revision accepted manuscripts and illustrations which are not in the proper form given in this guide.

### **Abstracts**

Manuscripts of original research papers should include a structured Abstract of 250 or fewer words, organised under the sections: Problem addressed; Objective; Methods and approach; Results; Conclusions. Do not actually include section headings, but use this structure for the Abstract.

### **Tables**

1. Authors should take notice of the limitations set by the size and lay-out of the journal. Large tables should be avoided. Reversing columns and rows will often reduce the dimensions of a table.
2. If many data are to be presented, an attempt should be made to divide them over two or more tables.
3. Tables should be numbered according to their sequence in the text. The text should include references to all tables.
4. Each table should occupy a separate page of the manuscript. Tables should never be included in the text.
5. Each table should have a brief and self-explanatory title.
6. Column headings should be brief, but sufficiently explanatory. Standard abbreviations of units of measurement should be added between parentheses.
7. Vertical lines should not be used to separate columns. Leave some extra space between the columns instead.
8. Any explanation essential to the understanding of the table should be given as a footnote at the bottom of the table.

### **Illustrations**

1. All illustrations (line drawings and photographs) should be submitted as separate files, preferably in TIFF or EPS format.
2. Illustrations should be numbered according to their sequence in the text. References should be made in the text to each illustration.
3. Illustrations should be designed with the format of the page of the journal in mind. Illustrations should be of such a size as to allow a reduction of 50%.
4. Lettering should be big enough to allow a reduction of 50% without becoming illegible, any lettering should be in English. Use the same kind of lettering throughout and follow the style of the journal.
5. If a scale should be given, use bar scales on all illustrations instead of numerical scales that must be changed with reduction.
6. Each illustration should have a caption. The captions to all illustrations should be typed on a separate sheet of the manuscript.
7. Explanations should be given in the figure legend(s). Drawn text in the illustrations should be kept to a minimum.
8. Photographs are only acceptable if they have good contrast and intensity.
9. If you submit usable colour figures, Elsevier would ensure that these figures appeared free-of-charge in colour in the electronic version of your accepted paper, regardless of whether or not these illustrations are reproduced in colour in the printed version. Colour

illustrations can only be included in print if the additional cost of reproduction is contributed by the author: you would receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please note that because of technical complications which may arise by converting colour figures to 'grey scale' (for the printed version, should you not opt for colour in print), you should submit in addition usable black and white figures corresponding to all colour illustrations.

10. Advice on the preparation of illustrations can be found at the following URL: <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

### Preparation of supplementary data

Elsevier now accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, movies, animation sequences, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com/>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please ensure that data is provided in one of our recommended file formats. Authors should submit the material together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

### References

1. All publications cited in the text should be presented in a list of references following the text of the manuscript. The manuscript should be carefully checked ensure that the spelling of author's names and dates are exactly the same in the text as in the reference list. For original research papers, the list should not exceed 35 references (it may be longer for review articles).
2. In the text refer to the author's name (without initial) and year of publication, followed– if necessary – by a short reference to appropriate pages. Examples: "Since Peterson (1988) has shown that..." "This is in agreement with results obtained later (Kramer, 1989, pp.12–16)".
3. If reference is made in the text to a publication written by more than two authors the name of the first author should be used followed by "et al.". This indication, however, should never be used in the list of references. In this list names of first author and co-authors should be mentioned.
4. References cited together in the text should be arranged chronologically. The list of references should be arranged alphabetically on authors' names, and chronologically per author. If an author's name in the list is also mentioned with co-authors the following order should be used: publications of the single author, arranged according to publication dates –publications of the same author with one co-author – publications of the author with more than one co-author. Publications by the same author(s) in the same year should be listed as 1974a, 1974b, etc.
5. Use the following system for arranging your references:
  - a. *For periodicals*  
Chin, J.C., Dai, Y., Watts, J.E., 1995. Antibody response against *Pseudomonas aeruginosa* membrane proteins in experimentally infected sheep. *Vet. Microbiol.* 43, 21–32.
  - b. *For edited symposia, special issues, etc. published in a periodical*  
Caffrey, J.P., 1994. Status of bovine tuberculosis eradication programmes in Europe. In: Wood, P.R., Monaghan, M.L., Rothel, J.S. (Eds.), *Bovine Tuberculosis*. *Vet. Microbiol.*

40, 1–4.

c. *For books*

Armitage, P., Berry, G., 1987. *Statistical Methods in Medical Research*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp. 94–100, 411–416.

d. *For multi-author books*

Butler, J.E., 1981. A concept of humoral immunity among ruminants and an approach to its investigation. In: Butler, J.E., Nielson, K., Duncan, J.R. (Eds.), *The Ruminant Immune System*, Plenum Press, New York, pp. 3–55.

6. Abbreviate the titles of periodicals mentioned in the list of references; according to the International *List of Periodical Title Word Abbreviations*. The correct abbreviation for this journal is *Vet. Microbiol.*

7. In the case of publications in any language other than English, the original title is to be retained. However, the titles of publications in non-Latin alphabets should be transliterated, and a notation such as "(in Russian)" or "(in Greek, with English abstract)" should be added.

8. Work accepted for publication but not yet published should be referred to as "in press".

9. References concerning unpublished data and "personal communications" should not be cited in the reference list but may be mentioned in the text.

10. Web references may be given. As a minimum, the full URL is necessary. Any further information, such as Author names, dates, reference to a source publication and so on, should also be given.

11. Articles available online but without volume and page numbers may be referred to by means of their Digital Object identifier (DOI) code.

### Formulae

1. Give the meaning of all symbols immediately after the equation in which they are first used.

2. For simple fractions use the solidus (/) instead of a horizontal line.

3. Equations should be numbered serially at the right-hand side in parentheses. In general only equations explicitly referred to in the text need be numbered.

4. The use of fractional powers instead of root signs is recommended. Powers of e are often more conveniently denoted by exp.

5. In chemical formulae, valence of ions should be given as, e.g.  $\text{Ca}^{2+}$ , not as  $\text{Ca}^{++}$ .

6. Isotope numbers should precede the symbols, e.g.  $^{18}\text{O}$ .

7. The repeated writing of chemical formulae in the text is to be avoided where reasonably possible; instead, the name of the compound should be given in full.

Exceptions may be made in the case of a very long name occurring very frequently or in the case of a compound being described as the end product of a gravimetric determination (e.g. phosphate as  $\text{P}_2\text{O}_5$ ).

### Footnotes

1. Footnotes should only be used if absolutely essential. In most cases it should be possible to incorporate the information in normal text.

2. If used, they should be numbered in the text, indicated by superscript numbers, and kept as short as possible.

### Nomenclature

1. Authors and editors are, by general agreement, obliged to accept the rules governing biological nomenclature, as laid down in the *International Code of Botanical*

*Nomenclature*, the *International Code of Nomenclature of Bacteria*, and the *International Code of Zoological Nomenclature*. Virologists should consult the latest Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses for proper nomenclature and spelling.

2. All biotica (crops, plants, insects, birds, mammals, etc.) should be identified by their scientific names when the English term is first used, with the exception of common domestic animals.

3. All biocides and other organic compounds must be identified by their Geneva names when first used in the text. Active ingredients of all formulations should be likewise identified.

4. For chemical nomenclature, the conventions of the *International Union of Pure and Applied Chemistry* and the official recommendations of the *IUPAC-IUB Combined Commission on Biochemical Nomenclature* should be followed.

### Copyright

If excerpts from other copyrighted works are included, the Author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by Authors in these cases: contact Elsevier's Rights Department, Oxford, UK: phone (+1) 215 239 3804 or +44(0)1865 843830, fax +44(0)1865 853333, e-mail [healthpermissions@elsevier.com](mailto:healthpermissions@elsevier.com). Requests may also be completed online via the Elsevier homepage <http://www.elsevier.com/permissions>.

Material in unpublished letters and manuscripts is also protected and must not be published unless permission has been obtained.

### Authors Rights

As an author you (or your employer or institution) may do the following:

- make copies (print or electronic) of the article for your own personal use, including for your own classroom teaching use
- make copies and distribute such copies (including through e-mail) of the article to research colleagues, for the personal use by such colleagues (but not commercially or systematically, e.g., via an e-mail list or list server)
- post a pre-print version of the article on Internet websites including electronic pre-print servers, and to retain indefinitely such version on such servers or sites
- post a revised personal version of the final text of the article (to reflect changes made in the peer review and editing process) on your personal or institutional website or server, with a link to the journal homepage (on elsevier.com)
- present the article at a meeting or conference and to distribute copies of the article to the delegates attending such a meeting
- for your employer, if the article is a 'work for hire', made within the scope of your employment, your employer may use all or part of the information in the article for other intra-company use (e.g., training)
- retain patent and trademark rights and rights to any processes or procedure described in the article
- include the article in full or in part in a thesis or dissertation (provided that this is not to be published commercially)
- use the article or any part thereof in a printed compilation of your works, such as collected writings or lecture notes (subsequent to publication of your article in the journal)
- prepare other derivative works, to extend the article into book-length form, or to



otherwise re-use portions or excerpts in other works, with full acknowledgement of its original publication in the journal

### **Funding body agreements and policies**

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors who publish in Elsevier journals to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

### **Proofs**

One set of page proofs in PDF format will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post). Elsevier now sends PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 available free from <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs. The exact system requirements are given at the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/acrobat/acrrsystemreqs.html#70win>. If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Therefore, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

### **Offprints**

The corresponding author will, at no cost, be provided with a PDF file of the article via e-mail. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use.

### **Author Services**

Questions arising after acceptance of the manuscript, especially those relating to proofs, should be directed to Elsevier Ireland, Elsevier House, Brookvale Plaza, East Park, Shannon, Co. Clare, Ireland, Tel.: (+353) 61 709600, Fax: (+353) 61 709111/113.

Authors can also keep a track of the progress of their accepted article, and set up e-mail alerts informing them of changes to their manuscript's status, by using the "Track your accepted article" option on the journal's homepage <http://www.elsevier.com/locate/vetmic> For privacy, information on each article is password-protected. The author should key in the "Our Reference" code (which is in the letter of acknowledgement sent by the Publisher on receipt of the accepted article) and the name of the corresponding author.

***Veterinary Microbiology has no page charges***



**ARTIGO 3**

**RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA E PERFIL PLASMIDIAL DE *Escherichia coli* ISOLADA DE FRANGOS DE CORTE E POEDEIRAS COMERCIAIS NO ESTADO DE PERNAMBUCO, BRASIL**

**(Artigo formatado para o periódico Brazilian Journal of Poultry Science)**

1 **Resistência Antimicrobiana e Perfil Plasmidial de *Escherichia coli* Isolada de**  
2 **Frangos de Corte e Poedeiras Comerciais no Estado de Pernambuco, Brasil**

3  
4 **RESUMO:** Objetivou-se com este estudo avaliar o perfil de sensibilidade dos isolados  
5 frente aos antimicrobianos e determinar o perfil plasmidial de *Escherichia coli* isolada  
6 em amostras dos seios infra-orbitários e conteúdo cecal de frangos de corte e poedeiras  
7 comerciais no Estado de Pernambuco. Todos os 35 isolados de *E. coli* foram submetidos  
8 ao teste de sensibilidade por meio de disco difusão e Concentração Inibitória Mínima  
9 (CIM). Para a detecção de plasmídios foi utilizada a extração de DNA e visualização do  
10 perfil plasmidial. Os resultados obtidos quanto ao isolamento de *E. coli* confirmaram a  
11 presença deste microorganismo em 12 amostras de seios infra-orbitários e 23 amostras  
12 do conteúdo cecal de frangos de corte e de poedeiras comerciais. No perfil de  
13 resistência frente a 13 drogas antimicrobianas, observou-se que 33 (94,28%) isolados  
14 foram resistentes a três ou mais antibióticos e a lincomicina apresentou o maior  
15 percentual de resistência (100%). Na Concentração Inibitória Mínima (CIM) observou-  
16 se multirresistência a vários antimicrobianos. Quanto aos plasmídios, obteve-se a  
17 frequência de 80,0% (28/35) nos isolados de *E. coli*, onde 16 destes isolados  
18 apresentaram plasmídio de 88 MDa, havendo também isolados com um a seis  
19 plasmídios de alto e baixo peso molecular. Isolados de *E. coli* resistentes a  
20 antimicrobianos utilizados na avicultura estão presentes no Estado de Pernambuco,  
21 tanto em frangos de corte quanto em poedeiras comerciais. A presença de plasmídios  
22 detectados na maioria dos isolados pode estar associada à resistência aos  
23 antimicrobianos. Monitorar a resistência a antibióticos em bactérias isoladas de animais  
24 torna-se um fator determinante para eleição e êxito do tratamento.

25  
26 **Palavras-chave:** Antibióticos, *Escherichia coli*, resistência, plasmídio, aves

27  
28  
29  
30  
31  
32

33        **Antimicrobial Resistance and Plasmidial Profile of Isolated *Escherichia coli* of**  
34        **Broilers and Commercial Layers in the State of Pernambuco, Brazil**

35  
36        **ABSTRACT:** The objective of this study was to evaluate the sensibility of isolates with  
37 antimicrobials and to determine the plasmidial profile in the *Escherichia coli* in samples  
38 of infraorbital sinus and cecal content of broilers and commercial layers in the state of  
39 Pernambuco. All 35 isolates of *E. coli* were submitted to a sensitivity test through a  
40 diffusion disc and Minimum Inhibitory Concentration (MIC). To detect plasmids, the  
41 extraction of DNA and the visualization of plasmidial profile were used. The results  
42 obtained regarding *E. coli* isolation confirmed the presence of this microorganism in 12  
43 samples of infraorbital sinus and 23 samples of cecal content of broilers and commercial  
44 layers. In the profile of resistance with 13 antimicrobial drugs, it was observed that 33  
45 (94.28%) *E. coli* isolates were resistant to three or more antibiotics and that lincomicine  
46 presented the highest percentage of resistance (100%). In the Minimum Inhibitory  
47 Concentration (MIC), multi-resistance to various antimicrobials was observed. In  
48 relation to the plasmids, a frequency of 80.0% (28/35) is observed in the *E. coli* isolates,  
49 where 16 of these samples presented plasmid of 88 MDa, there have been isolates with  
50 one to six plasmids of high and low molecular weight. Isolates of *E. coli* resistant to  
51 antimicrobials used in aviculture are present in the state of Pernambuco, both in broilers  
52 and in commercial layers. The presence of plasmids detected in most isolates may be  
53 associated to antimicrobial resistance. To monitor antibiotics resistance of isolated  
54 bacteria in animals becomes a determining factor for the choice and success of the  
55 treatment.

56  
57        **Keywords:** Antibiotics; *Escherichia coli*; resistance; plasmid; birds.  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65  
66

## 67 **INTRODUÇÃO**

68 Na avicultura, o uso de antimicrobianos é uma medida preventiva muito utilizada  
69 para minimizar os danos causados por infecções causadas por *Escherichia coli* (Giurov,  
70 1981), e também para reduzir a mortalidade associada à colibacilose aviária (Freed,  
71 1993; Watts, 1993). A alta prevalência desta enfermidade justifica a preocupação na  
72 busca de recursos que permitam o desenvolvimento de novos métodos de controle para  
73 a doença (Morris & Fletcher, 1988).

74 São cada vez maiores os coeficientes de resistência das bactérias frente aos  
75 antimicrobianos, representando um sério problema mundial (Blanco et al., 1997; Cohen,  
76 2000). A emergência de *E. coli* aviária multirresistentes, é preocupante sendo indicado  
77 testes de sensibilidade para evitar resistência cruzada (Blanco et al., 1997; Cardoso et  
78 al., 2001; Yang et al., 2004).

79 O uso prolongado de antibióticos em animais para o tratamento, ou como  
80 promotores de crescimento, pode selecionar patógenos resistentes às drogas. Bactérias  
81 comensais ou do ambiente podem ser reservatórios para a transferência de genes de  
82 resistência aos antimicrobianos para bactérias patogênicas (Nandi et al., 2004; Smith et  
83 al., 2007).

84 Vários fatores contribuem com a virulência de *E. coli* aviária e muitos dos genes  
85 que codificam esses fatores têm sido encontrados em grandes plasmídios conjugativos.  
86 Devido à ocorrência de genes de resistência antimicrobiana em plasmídios é possível  
87 que o uso de agentes antimicrobianos possa selecionar *E. coli* mais resistentes (Johnson  
88 et al., 2004).

89 A presença de alguns plasmídios como o ColV tem sido associada à sobrevivência  
90 de APEC em diferentes ambientes e hospedeiros, permitindo a mesma resistir a pressões  
91 ambientais desfavoráveis (Johnson et al., 2008). Os plasmídios podem codificar várias

92 características como resistência a antibióticos e metais pesados, virulência e persistência  
93 em diferentes ambientes (Frost et al., 2005).

94 Objetivou-se com esse estudo pesquisar a resistência a antimicrobianos e  
95 determinar o perfil plasmidial em amostras de *E. coli* isoladas de frangos de corte  
96 sadios, frangos de corte e poedeiras comerciais com sinais clínicos respiratórios e  
97 digestivos no Estado de Pernambuco, Brasil.

98

## 99 **MATERIAL E MÉTODOS**

100 O protocolo experimental deste estudo seguiu os Princípios Éticos na  
101 Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e  
102 aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Rural de  
103 Pernambuco (CEUA-UFRPE), processo N° 23082.001526.

104

### 105 **Amostragem**

106 Foram utilizadas 11 granjas de frangos de corte com animais sadios e sete granjas  
107 de frangos de corte com sinais clínicos respiratórios, além de seis granjas de poedeiras  
108 comerciais com sinais clínicos de doença respiratória e digestiva. O número de granjas  
109 estudadas correspondeu a aproximadamente 20% do total de granjas no Estado de  
110 Pernambuco. Foi colhido material biológico dos seios infra-orbitários e conteúdo cecal  
111 de 55 frangos de corte sadios e 35 com sinais clínicos (30 com sinais respiratórios e  
112 cinco com sinais respiratório e digestivo) e 30 poedeiras comerciais com sinais clínicos  
113 (25 com sinais respiratórios e cinco com sinais respiratório e digestivo).

114 Para fins de processamento das técnicas microbiológicas e moleculares foram  
115 formados “pools” de amostras por granja. Cada amostra foi constituída por um “pool”  
116 de cinco aves, totalizando 24 amostras de cada material biológico.

## 117 Exame bacteriológico

118 Para o isolamento de *Escherichia coli*, as amostras do conteúdo cecal (CC) foram  
119 semeadas em ágar Eosina Azul de Metileno (EMB) e os *swabs* dos seios infraorbitários  
120 (SI) foram transferidos para tubos contendo 10 ml de caldo Infusão Cérebro Coração  
121 (BHI) e incubados a 37°C durante 24 horas. Posteriormente, as amostras foram  
122 semeadas em placas contendo ágar EMB. Logo após foi selecionada uma colônia típica  
123 de cada amostra para a realização de provas bioquímicas no tríplice açúcar ferro (TSI),  
124 Citrato, Vermelho de Metila (VM), Voges Proskauer (VP), Indol, Motilidade, produção  
125 de gás sulfídrico no meio SIM (Carter, 1988). Para realização de todos os testes foi  
126 utilizada a cepa ATCC (25922) de *E. coli*.

127

## 128 Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos

129 Os isolados de *E. coli* foram submetidos ao teste de sensibilidade por meio da  
130 técnica de disco difusão (Bauer et al., 1966). Os antimicrobianos utilizados foram  
131 Amoxicilina (10µg), cefalexina (30µg), clortetraciclina (15µg), enrofloxacina (5µg),  
132 lincomicina (2µg), norfloxacina (10µg), oxitetraciclina (5µg), tiafenicol (30µg),  
133 trimetoprimulfadiazina (30µg), trimetoprimulfadiazinacortetraciclina (30µg),  
134 trimetoprimulfametoxazolclortetraciclina (30µg), trimetoprimulfadiazinadoxilina  
135 (30µg) e trimetoprimulfametoxipiridazinaeritromicina (10µg). E a determinação da  
136 concentração inibitória mínima (CIM) foi realizada de acordo com o National  
137 Committee for Clinical Laboratory Standards (CLSI/NCCLS, 2008). Foram utilizados  
138 os antimicrobianos Amoxicilina, clortetraciclina, enrofloxacina, lincomicina,  
139 norfloxacina, trimetoprim e sulfadiazina. A interpretação dos resultados foi realizada de  
140 acordo com as especificações do fabricante e do CLSI/NCCLS.

141 O índice de resistência múltipla aos antimicrobianos (IRMA) foi calculado  
142 conforme metodologia descrita por Krumperman (1983), sendo este índice determinado  
143 pela relação entre o número de antimicrobianos que a amostra é resistente e o número  
144 total de antimicrobianos testados.

145

#### 146 **Extração de DNA plasmidial**

147 Após cultivo em caldo Luria Bertani (LB), os isolados de *E. coli* foram  
148 incubados a 37°C por 24h e o DNA foi extraído de acordo com a metodologia descrita  
149 por Sambrook *et al.* (1989). As amostras de DNA plasmidial foram analisadas em gel  
150 de agarose a 0,8%, corado com brometo de etídio a (5%) e os fragmentos obtidos foram  
151 visualizados sob luz ultravioleta. Utilizou-se como marcador de peso molecular a cepa  
152 padrão V517 de *E. coli*.

153

#### 154 **Análise estatística**

155 Para esse estudo realizou-se análise estatística descritiva calculando-se a  
156 frequência absoluta e relativa (Sampaio, 1998).

157

### 158 **RESULTADOS**

159 Os resultados obtidos confirmaram o isolamento de 35 isolados de *E. coli*, sendo  
160 12 dos seios infra-orbitários (50,0%) e 23 do conteúdo cecal (95,8%) de frangos de  
161 corte e poedeiras comerciais. Quanto à multirresistência, observou-se que 94,2%  
162 (33/35) dos isolados foram resistentes a três ou mais antimicrobianos pertencentes a  
163 diferentes grupos. Os isolados dos seios infraorbitários e conteúdo cecal, tanto de  
164 frangos de corte quanto de poedeiras comerciais apresentaram maior resistência à  
165 lincomicina, sendo também observados coeficientes de resistência superiores a 50% em

166 relação às drogas associadas, exceto para isolados dos seios infraorbitários, frangos de  
 167 corte sadios e com sinais clínicos em relação à  
 168 trimetoprim sulfametoxipiridazinaeritromicina (Tabelas 1 e 2).

169  
 170 **Tabela 1.** Perfil de resistência dos isolados de *E. coli* de frangos de corte e poedeiras  
 171 comerciais no Estado de Pernambuco

Antibióticos	Fc SSC		Fc CSC		Pc CSC	
	F.A.	F. R. (%)	F.A.	F. R. (%)	F.A.	F. R. (%)
Amoxicilina (10 µg)	8	50,0	11	84,6	4	66,6
Cefalexina (30 µg)	0	0,0	8	61,5	1	16,6
Clortetraciclina (15 µg)	10	62,5	11	84,5	6	100,0
Enrofloxacina (5 µg)	5	31,2	10	76,9	1	16,6
Lincomicina (2 µg)	16	100,0	13	100,0	6	100,0
Norfloxacina (10 µg)	6	37,5	8	61,5	0	0,0
Oxitetraciclina (5 µg)	10	62,5	13	100,0	6	100,0
Tiafenicol (30 µg)	4	25,0	10	76,9	1	16,6
Trimetoprim sulfadiazina (30 µg)	7	43,7	11	84,6	5	83,3
Trimetoprim sulfadiazina clortetraciclina (30 µg)	7	43,7	11	84,6	4	66,6
Trimetoprim sulfadiazina doxicilina (30 µg)	6	37,5	11	84,6	5	83,3
Trimetoprim sulfametoxazol clortetraciclina (30 µg)	7	43,7	11	84,6	5	83,3
Trimetoprim sulfametoxipiridazinaeritromicina (10 µg)	7	43,7	6	46,1	4	66,6

172  
 173 Convenções: F.A. – Frequência Absoluta; F.R. – Frequência Relativa. Fc SSC – Frangos de corte sem sinais clínicos;  
 174 Fc CSC e Pc CSC – Frangos de corte e Poedeiras comerciais com sinais clínicos respiratório.  
 175

176  
 177 **Tabela 2.** Perfil de resistência dos isolados de *E. coli* de seios infra-orbitários e  
 178 conteúdo cecal de frangos de corte e poedeiras comerciais no Estado de Pernambuco

Antibióticos	SI		CC	
	F.A.	F. R. (%)	F.A.	F. R. (%)
Amoxicilina (10 µg)	9	75,0	14	60,8
Cefalexina (30 µg)	3	25,0	6	26,0
Clortetraciclina (15 µg)	7	58,3	20	86,9
Enrofloxacina (5 µg)	6	50,0	10	43,4
Lincomicina (2 µg)	12	100,0	23	100,0
Norfloxacina (10 µg)	5	41,6	9	39,1
Oxitetraciclina (5 µg)	9	75,0	20	86,9
Tiafenicol (30 µg)	5	41,6	10	43,4
Trimetoprim sulfadiazina (30 µg)	8	66,6	16	69,5
Trimetoprim sulfadiazina clortetraciclina (30 µg)	7	58,3	15	65,2
Trimetoprim sulfadiazina doxicilina (30 µg)	6	50,0	16	69,5
Trimetoprim sulfametoxazol clortetraciclina (30 µg)	6	50,0	17	73,9
Trimetoprim sulfametoxipiridazinaeritromicina (10 µg)	5	41,6	12	52,1

179  
 180 Convenções: F.A. – Frequência Absoluta; F.R. – Frequência Relativa. SI – Seios infra-orbitários; CC – Conteúdo  
 181 Cecal.



182 Quando analisada a Concentração Inibitória Mínima (CIM) de sete antimicrobianos  
 183 frente aos 35 isolados de *E. coli*, observou-se um percentual de amostras com  
 184 coeficientes elevados no CIM, sendo observada multirresistência a vários  
 185 antimicrobianos (Tabela 3).

186

187 **Tabela 3.** Determinação da concentração inibitória mínima dos isolados de *E. coli* de  
 188 frangos de corte e poedeiras comerciais no Estado de Pernambuco

Antimicrobiano	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )												Ponto de corte ( $\mu\text{g/ml}$ )	N° Isolados resistentes (%)
	$\leq 3,12$	6,25	12,5	25	50	100	93,75	187,5	375	750	1500	$\geq 3000$		
Amoxicilina	1	2	1				5	5	2	4	10	5	$\geq 32^A$	31 (88,6)
Clortetraciclina	2		2		3		10	10	6		2		$\geq 16^A$	31 (88,6)
Enrofloxacina	4	1	4	4	2		10	2	5	2	1		$\geq 2^A$	35 (100,0)
Lincomicina							2		2	1	4	26	$\geq 64^B$	35 (100,0)
Norfloxacina	6	1	1	2	2		4	4	6	4	1	4	$\geq 16^A$	27 (77,1)
Trimetoprim	1		1		1		3			1	1	27	$\geq 16^A$	33 (94,2)
Sulfadiazina	1			1			3	2	2	1		25	$\geq 512^A$	26 (74,2)

189

190

191

192

193

194

195

196

197

198

199

200

201

202

203

204

205

<sup>A</sup> Valor do Ponto de corte – CLSI/NCCLS, 2008.

<sup>B</sup> Raemdoenk et al., 1992

194 Quanto aos resultados em relação à detecção de plasmídios, observou-se  
 195 frequência de 80,0% (28/35), 16 isolados apresentaram plasmídio de 88 MDa, sendo 11  
 196 (47,8%) do conteúdo cecal e cinco (41,6%) dos seios infra-orbitários. Observou-se que  
 197 14 isolados provenientes de frangos de corte apresentaram um maior número de  
 198 plasmídio de alto peso molecular em relação a apenas dois de poedeiras comerciais.  
 199 Foram detectados também isolados que apresentaram de um a seis plasmídios com alto  
 200 e baixo peso molecular (Figura 1).

201

## 202 DISCUSSÃO

203

204

205

203 A alta resistência aos antimicrobianos tem preocupado os vários segmentos da  
 204 avicultura mundial (Amara et al., 1995; Gunner et al., 2004) e a resistência adquirida  
 205 por *E. coli* devido à utilização inadequada de antimicrobianos seleciona as bactérias

206 mais resistentes (Ferreira & Knöbl, 2000; Gunner et al., 2004). Neste estudo foi possível  
207 verificar que as amostras de *E. coli*, isoladas de frangos de corte e poedeiras comerciais  
208 apresentaram elevados coeficientes de resistência aos antimicrobianos testados, sendo  
209 estes utilizados rotineiramente na avicultura.

210 Recentes trabalhos sugerem também que o uso das tetraciclinas, sulfas,  
211 cefalosporinas e penicilinas servem como fator de disseminação de *E. coli* resistentes  
212 (Galland et al., 2001; Van Den Bogaard et al., 2001). Mas a resistência às novas  
213 quinolonas também vem sendo observada em cepas isoladas de frangos de corte  
214 (Lambie et al., 2000; Ogunleye et al., 2008). Isto se deve principalmente ao uso  
215 indiscriminado e prolongado, concentrações subterapêuticas e terapias inadequadas de  
216 antimicrobianos (Ferreira & Knöbl, 2000).

217 Neste estudo, o perfil de resistência *in vitro* no antibiograma apresentou  
218 coeficientes elevados de resistência para os isolados de *E. coli* frente aos  
219 antimicrobianos testados pertencentes a vários grupos, foi observado também um perfil  
220 de multirresistência de 94,2% (33/35) nos isolados. Na criação de frangos de corte, o  
221 uso de antimicrobianos é comum e a resistência de *E. coli* provenientes do trato  
222 intestinal de aves permanece por muito tempo, mesmo na ausência do uso destes  
223 (Chaslus et al., 1987). De acordo com Gama et al. (2004) isolados de *E. coli*  
224 provenientes de aves de postura e ambiente de granjas sugerem que está havendo uma  
225 ampliação do perfil de resistência a antibióticos nessa bactéria.

226 Segundo Albuquerque (2005) a lincomicina, está inserida dentre os  
227 antimicrobianos autorizados no Brasil para uso na avicultura como aditivo para  
228 alimentação. O uso de antibióticos na Medicina Veterinária e humana é considerado um  
229 fator importante para promover a seleção e disseminação de microorganismos  
230 resistentes (Witte et al., 1998; Gunner et al., 2004). Verificamos que independente do

231 tipo de criação, os isolados de *E. coli* apresentaram resistência de 100,0% para  
232 lincomicina. Ikuno et al. (2008), também obtiveram os mesmos resultados, mas em  
233 isolados de *E. coli* obtidos de aves silvestres.

234 O índice de resistência múltipla aos antimicrobianos (IRMA) foi desenvolvido  
235 para o estudo do risco de contaminação de alimentos por isolados de *E. coli*, e serve  
236 como uma informação adicional do potencial patogênico das amostras (Krumperman,  
237 1983). Observamos que os resultados obtidos com base nesse índice demonstraram que  
238 houve variação entre 0,07 até 1 nos isolados de *E. coli* obtidos de frangos de corte e  
239 poedeiras comerciais.

240 A CIM é útil para correlacionar a suscetibilidade do microorganismo à  
241 concentração do antimicrobiano nos tecidos do hospedeiro (Spinosa et al., 2005). Os  
242 dados gerados a partir do perfil de resistência a antimicrobianos podem ser uma valiosa  
243 referência para o tratamento de doenças bacterianas em aves de produção (Huang et al.,  
244 2009). De acordo com Raemdonck et al. (1992), isolados de *E. coli* de aves de produção  
245 na CIM apresentaram-se sensível para danofloxacina e trimetoprim-sulfametoxazol, e  
246 resistentes para lincomicina e oxitetraciclina. Neste estudo, os resultados observados  
247 por meio da CIM apresentaram resistência para a enrofloxacin e lincomicina (100%) e  
248 74,2% a 94,2% de resistência aos demais antimicrobianos.

249 Huang et al. (2009) observaram na CIM que de 60 isolados de *E. coli* 82% foram  
250 sensíveis as fluorquinolonas, com resultados acima de 50% para espectinomicina,  
251 tetraciclina e tilmicosin, com resistência de 51,46%, 79,33% e 98,28%,  
252 respectivamente. Os dados obtidos por Ozawa et al. (2008) demonstraram resistência  
253 para oxitetraciclina de 75,9% e para trimetoprim de 25,3%.

254 De acordo com Kmet & Kmetova (2010) isolados de *Echerichia coli* de frangos  
255 de corte saudáveis apresentaram níveis elevados de resistência ao ácido nalidíxico,

256 ciprofloxacina e enrofloxacin, sendo também detectado o gene *qnrS* mediado pelos  
257 plasmídios de resistência às quinolonas, estando presente em uma cepa com alto nível  
258 de resistência à ciprofloxacina. Os seus resultados demonstraram o aumento da  
259 ocorrência de cepas de *E. coli* multirresistentes com um alto nível de resistência  
260 cromossômica e plasmidial às fluoroquinolonas.

261 *E. coli* é uma das principais espécies onde podem ser detectados plasmídios  
262 contendo genes envolvidos no processo de resistência múltipla aos antimicrobianos.  
263 Esta característica está relacionada à sua grande distribuição ambiental e propensão a  
264 albergar elementos genéticos móveis, em especial os plasmídios (Schroeder et al., 2002;  
265 Sherley et al., 2004). Neste trabalho, observou-se a presença de plasmídios em 80,0%  
266 (28/35) dos isolados de *E. coli*, onde 16 isolados apresentaram plasmídios de alto peso  
267 molecular (88MDa), sendo também observado isolados com um a seis plasmídios. Esses  
268 isolados apresentaram resistência a três ou mais antimicrobianos de diferentes grupos.  
269 Os isolados que não apresentaram plasmídios também foram resistentes aos  
270 antimicrobianos testados.

271 Estudo realizado por Doetkott et al. (1996) revelou que linhagens de *E. coli*  
272 isoladas de aves geralmente possuem plasmídios de alto peso molecular e estes, em sua  
273 maioria, possuem genes relacionados à virulência. *E. coli* isoladas APEC são grandes  
274 reservatórios de genes de virulência para as *E. coli* patogênicas para seres humanos  
275 (Skyberg et al., 2006). Em alguns casos como o plasmídio ColV (80-180Kb), a sua  
276 presença e não de genes específicos tem sido associada à patogenicidade em APEC  
277 (Johnson et al., 2006).

278 A caracterização de *E. coli* quanto ao padrão de resistência a antibióticos e a  
279 identificação do padrão de virulência são informações fundamentais para a  
280 caracterização de isolados clínicos, tanto de aves, como da água e do ambiente, e

281 possibilitam discriminar o potencial patogênico dessas bactérias e a identificação de  
282 clones patogênicos emergentes (Ikuno et al., 2008).

283

## 284 **CONCLUSÕES**

285 Amstras de *E. coli* resistentes a antimicrobianos utilizados na avicultura estão  
286 presentes no Estado de Pernambuco, tanto em frangos de corte quanto em poedeiras  
287 comerciais. A presença de plasmídios com alto peso molecular detectados na maioria  
288 dos isolados, pode indicar uma associação com a resistência aos antimicrobianos.  
289 Monitorar a resistência de bactérias isoladas de animais a antibióticos torna-se um fator  
290 determinante para eleição e êxito do tratamento.

291

## 292 **Agradecimentos**

293 Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq  
294 (Processos Nº 561360/2008-1 e Nº 372675/2010-7) e ao Médico Veterinário Glédiston  
295 Posso da empresa ALIVET produtos agropecuários Ltda, Brasil pelo apoio financeiro  
296 para realização desse estudo.

297

## 298 **REFERÊNCIAS**

299 Albuquerque R. Antimicrobianos como promotores de crescimento. In: João Palermo N,  
300 Spinosa HS, Górnaiak SL. Farmacologia aplicada à avicultura. São Paulo: ROCA, 2005.  
301 p.149-159.

302

303 Amara A, Ziani Z, Bouzoubaa K. Antibioresistance of *Escherichia coli* isolated in  
304 Morroco from chickens with colibacillosis. *Veterinary Microbiology* 1995; 43(4):325-  
305 30.

306

307 Bauer, AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. Antibiotics susceptibility testing by a  
308 standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, Dordrecht.,  
309 v. 45, n. 4, p. 493-496, 1966.

310

311 Blanco JE, Blanco M, Mora A, Blanco J. Prevalence of bacterial Resistance to  
312 Quinolones and Other Antimicrobials among Avian *Escherichia coli* Strains Isolated  
313 from Septicemic and Healthy Chickens in Span. *Journal of clinical microbiology* 1997;  
314 35(8):2184-5.

- 315 Cardoso ALSP, Tessari ENC, Castro AGM, Zanatta GF. Avaliação da susceptibilidade  
316 a antimicrobianos de cepas de *Escherichia coli* de origem aviária. Arquivo Instituto  
317 Biológico 2001; 69(2):1-5.  
318
- 319 Carter, GR. Fundamentos de Bacteriologia e Micologia Veterinária. Roca, São Paulo,  
320 250p, 1988.  
321
- 322 Chaslus Dancla E, Gerbaud G, Lagorce M, Lafont JP, Courvalin P. Persistence of an  
323 antibiotic resistance plasmid in intestinal *Escherichia coli* of chickens in the absence of  
324 selective pressure. Antimicrobial Agents Chemotherapy 1987; 31(5):784-788.  
325 Cohen ML. Changing patterns of infectious diseases. Nature 2000, 406:762-67.
- 326 CLSI/NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution  
327 Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals, 3a. Edição 2008; 28(8) M31-  
328 A3.  
329
- 330 Doetkott D, Nolan LK, Giddings CW, Berryhill DL. Large plasmids in avian  
331 *Escherichia coli*. Avian Diseases 1996; 40(4):927-30.  
332
- 333 Ferreira AJP, Knöbl T. Colibacilose Aviária. In: Berchieri Junior A, Macari M, editor.  
334 Doenças das aves. Campinas: Facta; 2000. p. 197-207.  
335
- 336 Freed M, Clarke JP, Bowersock TL, Van Alstine WG, Balog JM, Hester PY. Effect of  
337 spectinomycin on *Escherichia coli* infection in 1-day-old ducklings. Avian diseases  
338 1993; 37(3):763-77.  
339
- 340 Frost LS, Leplae R, Summers AO, Toussaint A. Mobile genetic elements: the agents of  
341 open source evolution. Nature Reviews Microbiology 2005; 3:722-32.  
342
- 343 Galland JC, Hyatt DR, Crupper SS, Acheson DW. Prevalence, antibiotic susceptibility,  
344 and diversity of *Escherichia coli* O157:H7 isolates from a longitudinal study of beef  
345 cattle. feedlots. Applied and Environmental Microbiology 2001; 67(4):1619-27.  
346
- 347 Gama NMSQ, Guastalli EAL, Paulillo AC. Isolamento de *Escherichia coli* de amostras  
348 de água de dessedentação de galinhas poedeiras. Arquivos do Instituto Biológico 2004,  
349 v.71, suplemento1:522-524.  
350
- 351 Giurov B, Korudzhiiski N, Bineva I. Drug resistance of *Escherichia coli* strains isolated  
352 from poultry. Veterinary Medical Nauki 1981; 18(8):12-18.  
353
- 354 Gunner SS, John WL, Benedetta A, Elizabeth AL, Stefano L. The antimicrobial  
355 resistance containment and surveillance approach – a public health tool. WHO Bulletin  
356 2004; 82(12).  
357
- 358 Huang TM, Lin TL, Wu CC. Antimicrobial Susceptibility and Resistance of chicken  
359 *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., and *Pasteurella multocida* Isolates. Avian Diseases  
360 2009; 53(1):89-93.  
361
- 362 Ikuno AA, Gama NMSQ, Guastalli EAL, Guimarães MB, Ferreira VCA. Características  
363 de isolados de *Escherichia coli* provenientes de aves silvestres quanto a genes de

- 364 virulência e resistência a antibióticos. In: 38° Congresso Brasileiro de Medicina  
365 Veterinária; 2008; Gramado, Porto Alegre. Brasil. **Anais...** Gramado, 2008.  
366
- 367 Johnson TJ, Skyberg J, Nolan LK. Multiple Antimicrobial Resistance Region of a  
368 Putative Virulence Plasmid from an *Escherichia coli* Isolate Incriminated in Avian  
369 Colibacillosis. *Avian Diseases* 2004; 48(2):351-60.  
370
- 371 Johnson TJ, Siek, KE, Johnson, SJ, Nolan, LK. DNA sequence of a ColV plasmid and  
372 prevalence of selected plasmid-encoded virulence genes among avian *Escherichia coli*  
373 strains. *Journal of Bacteriology* 2006; v.188(2):745-758.  
374
- 375 Johnson TJ, Wannemuehler Y, Doetkott C, Johnson SJ, Rosenberger SC, Nolan LK.  
376 Identification of Minimal Predictors of Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC)  
377 Virulence for Use as a Rapid Diagnostic Tool. *Journal Clinical Microbiology* 2008;  
378 46:3987-96.  
379
- 380 Kmet V, Kmetova M. High levels of Quinolone Resistance in *Escherichia coli* from  
381 Healthy Chicken Broilers. *Folia Microbiologica* 2010; 55(1):79-82.  
382
- 383 Krumperman P.H. 1983. Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to  
384 identify high-risk sources of fecal contamination of foods. *Applied Environmental*  
385 *Microbiology* 1983; 46(1):165-170.  
386
- 387 Lambie N, Ngeleka M, Brown G, Ryan J. Retrospective study on *Escherichia coli*  
388 infection in broilers subjected to postmortem examination and antibiotic resistance of  
389 isolates in Trinidad. *Avian diseases* 2000; 44(1):155-160.  
390
- 391 Morris MP, Fletcher OJ. Diagnostic summary of 1986 turkey, broiler breeder, and layer  
392 necropsy cases at the University of Georgia 1988; 32(3):391-403.  
393
- 394 Nandi S, Maurer JJ, Hofacre CL, Summers AO. Gram positive bacteria, major reservoir  
395 of class 1 antibiotic resistance integron in poultry litter. *Proceedings National Academy*  
396 *Science United States America* 2004; 101(18):7118-22.  
397
- 398 Ogunleye AO, Oyekunle MA, Sonibare AO. Multidrug resistant *Escherichia coli*  
399 isolates of poultry origin in Abeokuta, South Western Nigeria. *Veterinarski Arhiv* 2008;  
400 78(6):501-09.  
401
- 402 Ozawa M, Harada K, Kojima, A, Asai T, Sameshima T. Antimicrobial susceptibilities,  
403 serogroups, and molecular characterization of avian pathogenic *Escherichia coli* isolates  
404 in Japan. *Avian Diseases* 2008; 52(3):392-397.  
405
- 406 Raemdonck DL, Tanner AC, Tolling ST, Michener SL. In vitro Susceptibility of Avian  
407 *Escherichia coli* and *Pasteurella multocida* to Danofloxacin and five Other  
408 Antimicrobials. *Avian Diseases* 1992; 36(4):964-67.  
409
- 410 Sambrook, J., Maniatis, T. & Fritsch, E. F. (1989). *Molecular Cloning: a Laboratory*  
411 *Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- 412 Sampaio IBM. *Estatística aplicada à experimentação animal*. Belo Horizonte: UFMG,  
413 1998. 221p.

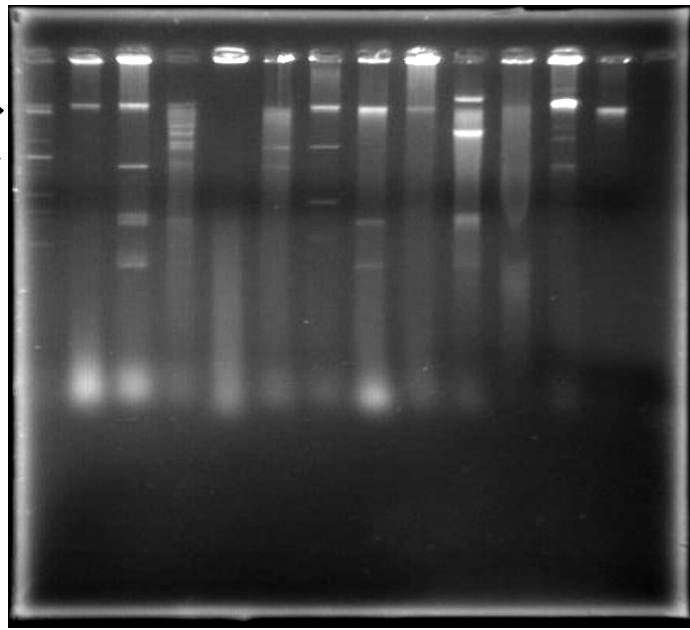
- 414 Schroeder CM, Meng J, Zhao S, DebRoy C, Torcolini J, Zhao C, McDermott PF,  
415 Wagner DD, Walker RD, White DG. Antimicrobial Resistance of *Escherichia coli* O26,  
416 O103, O111, O128, and O145 from Animals and Humans. *Emerging Infectious*  
417 *Diseases* 2002; 8(12):1409-14.
- 418 Sherley M, Gordon DM, Collignon PJ. Evolution of multi-resistance plasmids in  
419 Australian clinical isolates of *Escherichia coli*. *Microbiology* 2004; 150:1539-46.  
420
- 421 Skyberg JA, Johnson TJ, Johnson JR, Clabots C, Logue CM, Nolan LK. Acquisition of  
422 avian pathogenic *Escherichia coli* plasmids by a commensal *E. coli* isolate enhances its  
423 abilities to kill chicken embryos, grow in human urine, and colonize the murine kidney.  
424 *Infection Immunity* 2006; 74(11):6287-6292.  
425
- 426 Smith JL, Drum DJV, Dai Y, Kim JM, Sanchez S, Maurer JJ. Impact of Antimicrobial  
427 Resistance in Commensal *Escherichia coli* Strains Colonizing Broiler Chickens.  
428 *Applied And Environmental Microbiology* 2007; 73(5):1404-14.  
429
- 430 Spinosa, HS, Ito, NMK, Miyaji, CI, Lima, EA, Okabayashi, S. Antimicrobianos:  
431 considerações gerais. In: Palermo-Neto, J, Spinosa, HS, Górnaiak, SL. *Farmacologia*  
432 *aplicada à avicultura*. São Paulo: Roca, 2005. p. 87-103.  
433
- 434 Van Den Bogaard, AE, London N, Driessen C, Stobberinogh EE. Antibiotic resistance  
435 of faecal *Escherichia coli* in poultry, poultry farmers and poultry slaughterers. *Journal*  
436 *Antimicrobial Chemotherapy* 2001, 47(6):763-771.  
437
- 438 Watts JL, Salmon SA, Yancey RJ, Nersessian B, Kounev ZV. Minimum inhibitory  
439 concentrations of bacteria isolated from septicemia and airsacculitis in ducks. *Journal*  
440 *Veterinary Diagnostic Investigation* 1993; 5:62528.  
441
- 442 Witte W. Medical consequences of antibiotics use in Agriculture. *Science* 1998;  
443 279(5353):996-997.  
444
- 445 Yang H, Chen S, White DG, Zhao S, McDermott P, Walker R, Meng J.  
446 Characterization of multiple antimicrobial resistant *Escherichia coli* isolates from  
447 diseased chickens and swine in China. *Journal of Clinical Microbiology* 2004;  
448 v.42(8):3483-3489.  
449  
450  
451  
452  
453  
454  
455  
456  
457  
458  
459  
460  
461



462

PM  
(MDa)

88 MDa →  
43 MDa →  
32 MDa →  
5,12 MDa →  
1,25 MDa →



463

464 Figura 1 - Perfil plasmidial detectado em isolados de *Escherichia coli* de frangos de  
465 corte e poedeiras comerciais. 1- Cepa padrão - *E.coli* V517 (pesos moleculares 1,25  
466 Mda, 5,12 Mda, 32 Mda, 43 MDa e 88 MDa); 2 a 14- isolados de *E.coli* de frangos de  
467 de corte e poedeiras comerciais.

## NORMAS DA REVISTA

### Brazilian Journal of Poultry Science

#### INSTRUCTIONS TO AUTHORS

ISSN 1516-635X *printed*  
*version*

ISSN 1806-9061 *online*  
*version*

- Scope and policy
- Editorial norms
- Presentation of the articles

#### Scope and policy

The publication of the **Revista Brasileira de Ciência Avícola** is coordinated by the Publishing Committee of FACTA (Fundação APINCO de Ciências e Tecnologia Avícolas). All published research data and conclusions are of authors' full responsibility.

The Brazilian Journal of Poultry Science is published four times a year and publishes only original research material relevant to the field of poultry science. Considered subject areas include: Biochemistry and cellular biology; construction, environment and welfare; exotic and wild birds; hysbandry and management; immunology, avian disease control; layer and quail management; nutrition and feeding; physiology, genetics, reproduction and hatching; technology, processing and food safety.

The journal's main objective is to publish complete scientific and technical papers as well as literature reviews in the area of poultry science written by researchers and poultry science specialists. Authors wishing to submit a literature review, guest editorial or technical review should contact the journal's editor.

All manuscripts must be submitted in English and will be evaluated in a totally confidential and impartial way.

Submission of a manuscript to the Revista Brasileira de Ciência Avícola implies that:

1. it has not been previously published;
2. it is not being submitted for publication elsewhere;
3. all authors have approved the submission;

4. all authors have obtained permission from their employer or institution to publish it
5. relevant permissions, including ethical approval, has been obtained. Papers describing experiments which demonstrate a lack of concern of current ethical and welfare standards will not be considered for publication.

The manuscript and other correspondence should be sent preferentially by e-mail: [rvfacta@terra.com.br](mailto:rvfacta@terra.com.br)

## **Editorial norms**

### **Full length scientific articles**

The manuscript should contain the results of original research which contributes in a relevant way to the development of poultry science. If part of the results has been published previously as a summary or short paper in scientific events, this must be stated. Priority will be given to manuscripts presenting new concepts, methodologies or innovative experimental approaches.

The manuscript should have the following sections: Title, Author(s), Mail address (email and/or postal address), Abstract, Keywords, Introduction, Material and Methods, Results, Discussion, References, and Acknowledgements should be included after Discussion.

The sections Results and Discussion can be presented jointly if preferred. The Abstract should contain up to 250 (two hundred and fifty) words, followed by the key words in alphabetical order, limited to 5 (five) words which correspond to words or expressions that identify the contents of the article.

### **Short communications and Case Reports**

Short communications and Case Reports should have the same layout as full length papers, including the headings (Introduction, Abstract, Material and Methods, Results, Discussion, Acknowledgments and References). They should be presented in a text with up to 1000 words (plus Abstract and References) and should contain no more than three tables and/or figures.

### **Technical articles**

Technical articles should present the development of new methodologies and/or techniques that can be applied to

improve poultry production. These should follow the editorial norms including all sections of the full length scientific articles.

### **Guest Editorials and Invited Reviews**

Guest Editorials and Invited Reviews will be published by invitation only. The reviews should follow the editorial norms of the full length scientific article without the sub-items of Material and Methods, Results and Discussion.

### **Presentation of the articles**

**1. Format:** each original manuscripts must be properly identified by the title and the name(s) of the author(s). It should be typed in Times New Roman (font sizes: 16pt for the title, 14pt for the section headings in the body of the text, and 12pt for the main text), double spaced, in A4 format (21,0 x 29,7cm), 2cm margins. Consecutive numbering of pages and of lines (numbered consecutively throughout the manuscript) of the main text are required. The manuscript should be saved in a .doc format, (file written with Microsoft Word for Windows®) or compatible text editor format. Only official and well known nomenclature is accepted. Abbreviations in the title are not allowed.

**2. Cover Page:** all manuscripts should have a cover page with the title, complete name(s) of the author(s) and institution of origin. A footnote mentioning the complete address (e-mail is essential) of the author to whom correspondence should be addressed must also be included.

**3. Tables** must be numbered consecutively with Arabic numerals in the text. Tables must have a descriptive title. All explanatory information should be given in a note immediately below the table. All abbreviations must be defined in this note, even if they are explained in the text. Tables must be understandable without referring to the text.

**4. Illustrations (photographs, graphs, drawings)** must be numbered consecutively with Arabic numerals. All illustrations should be submitted in the same document but on separate pages, which should include the title of the article, name(s) of the author(s) and indication of the part of the text where they should appear. Photographs, figures and scanned material must be sent in high resolution (minimum 600 dpi, .tif or .jpg format). The

figures will be published in black and white. A printing expenses agreement is needed if the author wishes to publish color photos and/or pictures.

**5. Units:** the International Metric System must be used for units and abbreviations.

**6. References** should be arranged in alphabetic order by the author's last name. The complete title of sources should be mentioned. All authors of each article must be cited.

Examples:

Bakst MR, Gupta K, Akuffo V. Comparative development of the turkey and chicken embryo from cleavage through hypoblast formation. *Poultry Science* 1997; 76(1):83-90.

Bouzoubaa K, Nagaraja KV. Epidemiological studies on the incidence of salmonellosis in chicken breeder/hatchery operations in Marocco. In: Snoeyenbos GH, editor. *Proceedings of the International Symposium on Salmonella*; 1984; Kenneth Square, PA: American Association Avian Pathologists; 1985. p.337.

Briceno WNO, Guimarães FCR, Cruz FGG. Efeitos da densidade populacional de frangos de corte em época quente no município de Manaus. In: 10o Congresso Brasileiro de Avicultura; 1987; Natal, Rio Grande do Norte. Brasil. p. 131-2.

Gabriel JE. Efeitos do nível energético da ração e do estresse térmico na expressão da proteína de choque térmico Hsp70 e nos níveis do seu mRNA no fígado de frangos de corte em diferentes estágios de desenvolvimento. [Dissertation]. Jaboticabal (SP): Universidade Estadual Paulista; 1996.

Ginsburg M. Primordial germ cell development in avians. *Poultry Science* 1997; 76(1):91-5.

Simon VA, Oliveira C. Vacinação em avicultura através da água de bebida. In: Macari M, editor. *Água na avicultura industrial*. Jaboticabal: Funep-Unesp; 1996. p. 73-85.

Summers JD, Leeson S. *Commercial poultry nutrition*. 2 ed. New York; N.Y / State Manual Book & Periodical Services; 1997.

**7. Quotations in the text:** state the last name of the author followed by the year in parenthesis. In the case of two authors both should be stated. In the case of more than two

authors the quotation should be given by the last name of the first author followed by the expression *et al.* (italicised).

Examples: Simon (1996)

Silva & Silva (1988)

Briceno *et al.* (1987)

**8. Scientific names of microorganisms: must follow Berg's Manual recommendations.**

**9. Fees:** publication fees vary from US\$30.00 to US\$ 50.00 per edited page, depending on the type of revision made and whether the author is a subscriber of the Brazilian Journal of Poultry Science. Only Credit Card payment will be accepted from foreign authors.

**10. Manuscript Proof:** A proof will be sent to the corresponding author, who should be identified on the cover page of the manuscript. The corrected proof should be returned within three days, preferably by fax. The Editor reserves the right to forward the manuscript to press without submitting the final proof to the author. The Editor shall not be hold responsible for any mistakes shown in the final publication.

**11. Copyright:** it is a condition of publication that the authors transfer copyrights of submitted article to FACTA. Authors may use the article after the publication without prior permission from FACTA, provided that acknowledgement is given to the journal as its original source of publication. Authors are responsible for obtaining permission to reproduce in the text copyright material from other sources.

**ARTIGO 4**

**PERFIL DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS DE *Staphylococcus* spp.,  
ISOLADOS DE FRANGOS DE CORTE E POEDEIRAS COMERCIAIS NO  
ESTADO DE PERNAMBUCO, BRASIL**

**(Artigo formatado para o periódico Pesquisa Veterinária Brasileira)**

1 **Perfil de resistência a antimicrobianos de *Staphylococcus* spp., isolados de frangos**  
2 **de corte e poedeiras comerciais no Estado de Pernambuco, Brasil**

3  
4 **RESUMO:** Este estudo foi realizado com o objetivo de pesquisar *Staphylococcus* spp.  
5 de frangos de corte sadios e frangos de corte e poedeiras comerciais que apresentassem  
6 sinais clínicos respiratórios. Foram colhidos *swabs* dos seios infraorbitários de 55  
7 frangos de corte sadios, 35 com sinais respiratórios, e 30 poedeiras comerciais também  
8 com sinais respiratórios. Cada amostra foi composta por um “pool” de cinco aves,  
9 totalizando 24 amostras coletadas de 24 granjas comerciais. Para o isolamento foi  
10 utilizado o exame bacteriológico, com posterior avaliação das características  
11 morfológicas, tintoriais e bioquímica para determinação da espécie. Verificou-se a  
12 produção de hemólise, formação de biofilme em ágar Vermelho Congo (ACR),  
13 detecção do gene *mecA* pela PCR e avaliação da suscetibilidade a 13 drogas  
14 antimicrobianas. Das 24 amostras processadas, foram isolados 16 *Staphylococcus*, cinco  
15 isolados foram coagulase-positiva (SCP) e 11 coagulase-negativa (SCN), e nos testes de  
16 hemólise e formação de biofilme, três isolados apresentaram-se hemolíticos e seis foram  
17 positivos, respectivamente. Na avaliação por meio da PCR, para detecção do gene *mecA*  
18 todos os isolados apresentaram resultados negativo. Observou-se que 15 isolados foram  
19 resistentes a cinco ou mais antibióticos, e que as drogas associadas apresentaram melhor  
20 perfil de sensibilidade. A resistência a antimicrobianos e cepas produtoras de biofilme  
21 podem interferir na resposta terapêutica de aves que apresentam sinais clínicos.

22  
23 **TERMOS DE INDEXAÇÃO:** *Staphylococcus*, aves, genes, antimicrobianos

24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33



34       **Resistance of *Staphylococcus* spp., to antimicrobials isolated from broilers and**  
35                               **commercial layers in the State of Pernambuco, Brazil**

36  
37       **ABSTRACT:** This study had the objective of researching *Staphylococcus* spp. on  
38 healthy broilers and commercial broilers and layers, with clinical respiratory signs.  
39 *Swabs* were taken from the infraorbital sinus of 55 healthy broilers, 35 with respiratory  
40 signs and 30 commercial layers also with respiratory signs. Each sample was composed  
41 of a pool of five birds, totaling 24 collected samples from 24 commercial flocks. The  
42 bacteriological exam was used for the isolation, with a later evaluation of the  
43 morphological, tintorial and biochemical characteristics to determine the species. The  
44 production of hemolysis, formation of a biofilm in Congo Red Agar, detection of the  
45 gene *mecA* by the PCR and susceptibility to 13 antimicrobial drugs, was verified. From  
46 the 24 processed samples, 16 *Staphylococcus* spp. were obtained isolates, five samples  
47 were coagulasis-positive (SCP) and 11 coagulasis-negative (SCN). As to hemolysis and  
48 the formation of biofilm tests three samples presented themselves to be hemolytic and  
49 six were positive, respectively. In the PCR evaluation for the detection of the *mecA*  
50 gene, all isolates showed negative results. It was observed that 15 *E coli* isolates were  
51 resistant to five or more antibiotics, and that the associated drugs presented better  
52 sensibility. The resistance to antimicrobials and biofilm productive strains can interfere  
53 in the therapeutic response of birds that present clinical signs.

54  
55       **INDEX TERMS:** *Staphylococcus*, birds, genes, antimicrobials

## INTRODUÇÃO

67

68 A Estafilococose é uma doença frequente nas aves. A maior parte das infecções é  
69 causada por *Staphylococcus* coagulase positiva, especialmente *Staphylococcus aureus*,  
70 contudo outros *Staphylococcus* coagulase negativos também estão envolvidos em  
71 infecções (Scalan & Hargis, 1989, Jordan, 1996, Awan & Matsumoto, 1998, McNamee  
72 et al. 1998).

73

74 A patogênese da doença é atribuída à combinação de diversos fatores celulares e  
75 extracelulares, sendo a formação de biofilme um dos principais mecanismos para a  
76 infecção bacteriana persistente ou crônica (Costerton et al. 1999). Arciola et al. (2002)  
77 relataram que a produção de biofilme está associada à reduzida sensibilidade aos  
78 antimicrobianos.

78

79 O uso de antimicrobianos na alimentação animal pode contribuir com a resistência  
80 de *Staphylococcus* (Aarestrup et al. 2000), e para a seleção de cepas resistentes às  
81 drogas (Awan & Matsumoto, 1998). Os agentes antimicrobianos são amplamente  
82 utilizados no tratamento e controle das infecções estafilocócicas. Entretanto, poucos  
83 estudos têm determinado a ocorrência da resistência antimicrobiana e a presença de  
84 genes de resistência de isolados de aves (Aarestrup et al. 2000).

84

85 De acordo com Lee (2003) a resistência dos *Staphylococcus* spp. à oxacilina está  
86 relacionada com a presença do gene *mecA*, que é considerado um determinante  
87 genético, que torna os microorganismos intrinsecamente resistentes também a outras  
88 drogas. Os genes *icaA* e *icaD* presentes em *S. aureus* e *S. epidermidis* estão associados  
89 à formação de biofilme (Arciola et al. 2001, 2002), que é um importante fator de  
90 virulência e está associado à aderência; podendo reduzir a resposta imune, interferindo  
91 com os mecanismos de defesa do hospedeiro (Bernardi et al. 2007).

91           Objetivou-se com este estudo pesquisar o perfil de resistência a antimicrobianos  
92 e a ocorrência de genes de resistência, além da produção de biofilme em isolados de  
93 *Staphylococcus* spp. provenientes de frangos de corte e poedeiras comerciais no Estado  
94 de Pernambuco.

95

96

## MATERIAL E MÉTODOS

97           O protocolo experimental deste estudo seguiu os Princípios Éticos na  
98 Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e  
99 foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Rural  
100 de Pernambuco (CEUA-UFRPE), processo N° 23082.001526.

101

### 102 **Amostragem**

103           Foram utilizadas 11 granjas de frangos de corte com aves saudáveis e sete granjas com  
104 aves apresentando sinais clínicos, além de seis granjas de poedeiras comerciais com  
105 sinais clínicos de doença respiratória. O número de propriedades estudadas  
106 correspondeu a aproximadamente 20% do total de granjas no Estado de Pernambuco. O  
107 material biológico foi colhido dos seios infra-orbitários de 55 frangos de corte saudáveis,  
108 35 frangos de corte com sinais clínicos e de 30 poedeiras comerciais com sinais clínicos  
109 respiratórios. Cada amostra foi constituída por um “pool” de cinco aves/granja,  
110 totalizando 24 amostras.

111

### 112 **Exame bacteriológico**

113           Os *swabs* obtidos dos seios infraorbitários foram semeados em ágar base acrescido  
114 de sangue desfibrinado de ovino a 5% e as placas foram incubadas a 37°C em aerobiose  
115 por até 48 horas. Em seguida, foi selecionada uma colônia típica e realizou-se a

116 coloração de Gram e o teste de catalase para diferenciação de *Staphylococcus* e  
117 *Streptococcus*. Posteriormente foram realizadas as provas de coagulase para  
118 diferenciação entre *Staphylococcus* coagulase positiva e negativa. Para a identificação  
119 das espécies foram realizadas provas bioquímicas como urease, esculina, ágar púrpura  
120 base (PAB), glicose semi-sólida (GSS), manitol semi-sólido (MSS) e ágar DNase  
121 (Quinn et al. 1994).

122

### 123 **Produção de biofilme**

124 Para estudar a capacidade em produzir biofilme todos os isolados foram semeados  
125 em Ágar Vermelho Congo (ACR) e posteriormente incubados a 37°C por até 48h. Após  
126 o isolamento, as colônias foram avaliadas quanto à coloração, sendo consideradas  
127 positivas aquelas que apresentaram coloração negra (Freeman et al. 1989). Como  
128 controle positivo da reação foi utilizado uma cepa de *Staphylococcus aureus* da  
129 *American Type Culture Collection* (ATCC 25923).

130

### 131 **Extração de DNA**

132 Todos os isolados foram submetidos à extração de DNA utilizando-se a  
133 metodologia descrita por Costa et al. (2010).

134

### 135 **Reações e ciclos da PCR**

136 Para reação de amplificação do DNA foram utilizados iniciadores específicos para  
137 detecção do gene *mecA* (Murakami et al. 1991). A reação de PCR constou de 15µL de  
138 água ultrapura (Milli-Q), 2,5µL de Tampão PCR 1X, 1µL de MgCl<sub>2</sub> (2µM), 1µL de  
139 dNTP mix (0,4µM de cada), 1µL de cada “primer” (0,4µM), 0,5µL de *Taq*Polimerase  
140 (2,5U/µL) e 3µL do DNA extraído, obtendo-se um volume final de 25µL. A reação foi

141 pré-aquecida a 94°C por 1 min. seguida de 15 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 seg.,  
142 anelamento a 68°C por 30 seg e extensão a 72°C por 30 seg. Foi acrescentada uma segunda  
143 etapa com 20 ciclos de 94°C por 30 seg. 60°C por 30 seg. 72°C por 30 seg. e  
144 acrescentada uma extensão final a 72°C por 2 min (Kearns et al. 1999).

145 As amostras foram analisadas em gel de agarose a 1,3% e corado com brometo de  
146 etídio (5%) e os fragmentos obtidos foram visualizados sob luz ultravioleta. Utilizou-se  
147 o marcador de peso molecular 100pb Ladder<sup>®</sup> (Ludwig Biotec, Rio Grande do Sul).

148

#### 149 **Teste de resistência a antimicrobianos**

150 Todos os isolados de *Staphylococcus* spp. foram submetidos ao antibiograma  
151 utilizando-se a técnica de difusão em discos (Bauer et al. 1966) frente aos  
152 antimicrobianos: Amoxicilina (10µg), cefalexina (30µg), clortetraciclina (15µg),  
153 enrofloxacina (5µg), lincomicina (2µg), norfloxacina (10µg), oxitetraciclina (5µg),  
154 tiafenicol (30µg), trimetoprimulfadiazina (30µg),  
155 trimetoprimulfadiazinaclortetraciclina (30µg),  
156 trimetoprimulfametoxazolclortetraciclina (30µg), trimetoprimulfadiazinadoxilicina  
157 (30µg) e trimetoprimulfametoxipiridazinaeritromicina (10µg). A interpretação dos  
158 resultados foi realizada de acordo com as recomendações do fabricante.

159

#### 160 **Análise estatística**

161 Para esse estudo realizou-se análise estatística descritiva calculando-se a frequência  
162 absoluta e relativa (Sampaio, 1998).

163

164

## 164 **RESULTADOS**

165 Do total de amostras estudadas observou-se isolamento de *Staphylococcus* em  
166 66,67% (16/24), sendo cinco (31,25%) identificados como *Staphylococcus hyicus*, três

167 (18,75%) *S. lentus*, três (18,75%) *S. gallinarum*, um (6,25%) *S. chromogenes*, um  
 168 (6,25%) *S. intermedius*, um (6,25%) *S. saprophyticus* e dois (12,5%) *S. epidermidis*.  
 169 Desses isolados, seis foram obtidos de frangos de corte sem sinais clínicos, oito de  
 170 frangos de corte com sinais clínicos respiratórios e dois de poedeiras comerciais com  
 171 sinais clínicos respiratórios (Tabela 1).

172

173 **Tabela 1.** *Staphylococcus* spp. isolados dos seios infra-orbitários de frangos de corte e  
 174 poedeiras comerciais no Estado de Pernambuco

SC	N° de espécies de <i>Staphylococcus</i>						
	<i>hyicus</i>	<i>lentus</i>	<i>gallinarum</i>	<i>chromogenes</i>	<i>intermedius</i>	<i>saprophyticus</i>	<i>epidermidis</i>
Fc SSC	3	1	0	1	0	0	1
Fc CSC	2	2	2	0	1	1	0
Pc CSC	0	0	1	0	0	0	1

175

176 Sistema de Criação; Fc SSC- Frangos de corte sem sinais clínicos; Fc CSC- Frangos de corte com sinais  
 177 clínicos; Pc CSC- Poedeiras comerciais com sinais clínicos

178

179 Quanto à capacidade de coagular o plasma de coelho, 11 (68,75%) isolados foram  
 180 coagulase-negativa (SCN) e seis (37,5%) coagulase-positiva (SCP). Dois isolados SCN  
 181 (*S. epidermidis*) e um SCP (*S. intermedius*) apresentaram-se positivos no teste de  
 182 hemólise.

183 No teste de produção de biofilme, seis (37,5%) isolados foram positivos, sendo dois  
 184 *Staphylococcus hyicus*, um *S. lentus*, dois *S. gallinarum*, um *S. saprophyticus* e 10  
 185 (62,5%) foram negativos. Observou-se também que os isolados produtores de biofilme  
 186 apresentaram multirresistência a diferentes grupos de antimicrobianos.

187 O perfil de resistência aos antimicrobianos demonstraram que 15 (93,75%) isolados  
 188 foram resistentes a cinco ou mais antibióticos, apresentando também alta resistência a  
 189 antibióticos como clortetraciclina, oxitetraciclina e lincomicina (93,8%), amoxicilina  
 190 (87,5%), enrofloxacina (68,8%), norfloxacina e tiafenicol (62,5%), enquanto que a  
 191 utilização de antibióticos utilizados em associação como trimetoprim ou sulfas

192 apresentou perfil de sensibilidade variando de 43,8% a 50,0% exceto para  
193 Trimetoprim sulfadiazina clortetraciclina que apresentou 62,5% de resistência (Tabela 2).

194 **Tabela 2.** Perfil de resistência dos isolados de *Staphylococcus* spp. isolados dos seios  
195 infra-orbitários de frangos de corte e poedeiras comerciais no Estado de Pernambuco

Antibióticos	Interpretação	
	F.A.	F.R. (%)
Amoxicilina (10µg)	14	87,5
Cefalexina (30µg)	9	56,3
Clortetraciclina (15µg)	15	93,8
Enrofloxacina (5µg)	11	68,8
Lincomicina (2µg)	15	93,8
Norfloxacina (10µg)	10	62,5
Oxitetraciclina (5µg)	15	93,8
Tiafenicol (30µg)	10	62,5
Trimetoprim sulfadiazina (30µg)	8	50,0
Trimetoprim sulfadiazina clortetraciclina (30µg)	10	62,5
Trimetoprim sulfadiazina doxicilina (30µg)	8	50,0
Trimetoprim sulfametoxazol clortetraciclina (30µg)	7	43,8
Trimetoprim sulfametoxipiridazina eritromicina (10µg)	7	43,8

196 Convenções: F.A. – Frequência Absoluta; F.R. – Frequência Relativa.

197

198 Os isolados de frangos de corte apresentaram resistência à clortetraciclina,  
199 lincomicina e oxitetraciclina (93,8%), amoxicilina (87,5%), enrofloxacina (68,8%),  
200 norfloxacina, tiafenicol e trimetoprim sulfadiazina clortetraciclina (62,5%), cefalexina  
201 (56,3%), trimetoprim sulfadiazina e trimetoprim sulfadiazina doxicilina (50,0%) e  
202 trimetoprim sulfametoxazol clortetraciclina e  
203 trimetoprim sulfametoxipiridazina eritromicina (43,8%). Observou-se ainda que dois  
204 isolados de poedeiras comerciais apresentaram resistência à maioria dos  
205 antimicrobianos de diferentes grupos.

206 No entanto, no teste para detecção do gene *mecA* relacionado à resistência à  
207 meticilina e oxacilina todos os isolados foram negativos.

208

209

## DISCUSSÃO

210

211

Algumas espécies de *Staphylococcus* são habitantes normais da pele e mucosas dos animais. Nas aves, *S. aureus* é conhecido por causar várias doenças como septicemia

212 aguda, osteomielite crônica (Skeeles, 1997), além de salpingite, ooforite, onfalite,  
213 artrite, conjuntivite, blefarite, foliculite, bursite, dermatite gangrenosa e celulite  
214 (Ferreira & Ferreira, 2000). Estudo realizado por Takeuchi et al. (1985) demonstrou que  
215 *S. hycus* esteve presente na pele e cavidade nasal de 55 (19%) galinhas saudáveis  
216 criadas em granjas no Japão, sendo 17,9% na pele e 6,2% na cavidade nasal. Awan &  
217 Matsumoto (1998) também isolaram várias espécies de *Staphylococcus* de frangos de  
218 corte e detectaram *S. aureus* e *S. intermedius* em articulação das aves, apresentando  
219 artrite. No Brasil, mais especificamente na região Nordeste, não foram encontrados  
220 trabalhos publicados sobre o envolvimento e os prejuízos econômicos causados pela  
221 infecção por *Staphylococcus* spp. em frangos de corte e poedeiras comerciais. Dessa  
222 forma este estudo reveste-se de importância epidemiológica, pois determinou as  
223 espécies de *Staphylococcus* presentes nas vias aéreas respiratórias superiores de frangos  
224 de corte e poedeiras comerciais. Além disso, observou-se que a maioria dos isolados  
225 envolvidos na doença respiratória são SCN, confirmando a participação dessas variantes  
226 na doença aviária. Apesar da maior parte das infecções causadas por *Staphylococcus* em  
227 animais ser por SCP, especialmente *S. aureus*, são crescentes os relatos da participação  
228 dos SCN em infecções em frangos de corte (Scalan & Hargis, 1989, Awan &  
229 Matsumoto, 1998, McNamee et al. 1998).

230 De acordo com alguns autores, apesar de *Staphylococcus* spp. serem  
231 considerados oportunistas ou secundários (Jonsson & Wadstrom, 1993), a doença  
232 ocorre na maioria das vezes quando há queda na resistência devido à infecção por outros  
233 patógenos, imunossupressão e lesões na pele ou nas mucosas. Dependendo da  
234 capacidade de expressão de fatores de virulência pode ocorrer uma infecção localizada  
235 ou septicemia, devido à alta capacidade do microorganismo migrar da pele ou mucosa  
236 para os tecidos internos (Ferreira & Ferreira, 2009). Por esse motivo a identificação dos



237 fatores de virulência dessa bactéria é importante para decidir sobre o tratamento que  
238 deverá ser instituído no lote (Arciola et al. 2001). Apesar desse aspecto, observou-se  
239 ainda no presente estudo a produção de biofilme por alguns isolados obtidos dos seios  
240 infra-orbitários de frangos de corte e poedeiras comerciais. Sabe-se que algumas  
241 espécies de estafilococos produzem um muco ou biofilme que permite à bactéria aderir  
242 às superfícies, sendo importante para a sua colonização. A produção de biofilme é  
243 considerada como um fator de virulência (Veenstra et al. 1996, Vuong & Otto, 2002),  
244 tornando-as menos acessíveis ao sistema de defesa do organismo e aos antimicrobianos  
245 (Arciola et al. 2002, Hume et al. 2004). Esse mecanismo inibe a quimiotaxia,  
246 fagocitose, proliferação de linfócitos e limita a atuação dos macrófagos (Vasudevan et  
247 al. 2003).

248 Alguns estudos têm sugerido que a produção de cápsula facilita a aderência  
249 bacteriana através de seus componentes biopolímeros, contribuindo para a formação de  
250 biofilme (Peters & Pulverer, 1984). Sendo assim, os microorganismos que produzem  
251 biofilme são mais resistentes à ação de agentes físicos e químicos como os utilizados  
252 nos procedimentos de higienização (Rickard et al., 2003; Marques, 2005). A formação  
253 de biofilme é considerada como um dos principais fatores para infecção bacteriana  
254 persistente ou crônica (Costerton et al. 1999). Recentemente foi demonstrado que *S.*  
255 *aureus* e *S. epidermidis* contém o operon *ica* responsável pela produção de biofilme  
256 (Arciola et al. 2001). Destaca-se também, no presente estudo, a produção de biofilme  
257 por amostras de SCN em aves comerciais no estado de Pernambuco, demonstrando a  
258 presença desse fator de virulência geralmente relatado para amostras SCP. Observou-se  
259 também que as amostras produtoras de biofilme apresentaram multirresistência a vários  
260 grupos de antimicrobianos.

261 O coeficiente de resistência a antimicrobianos, inclusive de multirresistência  
262 observada para amostras isoladas em frangos de corte e poedeiras comerciais a vários  
263 antimicrobianos utilizados na avicultura comercial é preocupante para os plantéis  
264 estudados. Esses antimicrobianos são largamente utilizados no tratamento e controle de  
265 infecções bacterianas nas granjas. Além disso, são administrados há muitos anos, não só  
266 para controlar e prevenir a doença, mas também para promover o crescimento e  
267 melhorar a eficiência alimentar das aves (Geonaras & Holy, 2001, Bertolatti et al.  
268 2003). Dessa forma, a resistência de cepas produtoras de biofilme pode interferir na  
269 resposta terapêutica de aves que apresentam sinais clínicos de doença respiratória. É  
270 importante ressaltar ainda a necessidade de se investigar a presença de genes  
271 relacionados com a resistência às drogas utilizadas na avicultura.

272 Informações sobre a prevalência de *Staphylococcus* resistentes a antimicrobianos  
273 na avicultura industrial nos Estados Unidos é escassa, sendo necessária para avaliar os  
274 riscos da utilização de antimicrobianos na criação animal e suas consequências na saúde  
275 pública (Simjee et al. 2007). No Brasil, pouco se sabe sobre os impactos do uso de  
276 antibióticos na avicultura comercial e os danos gerados à saúde animal e pública. A  
277 ocorrência de resistência antimicrobiana entre isolados recentes e antigos indica que a  
278 resistência aos antimicrobianos em estafilococos de origem aviária aumentou ao longo  
279 do tempo em indústrias avícolas da Bélgica e isto pode ser devido ao uso frequente de  
280 agentes antimicrobianos na criação de aves (Geonaras & Holy, 2001, Bertolatti et al.  
281 2003).

282 Poucos estudos têm determinado a ocorrência da resistência antimicrobiana e a  
283 presença de genes de resistência entre isolados de estafilococos em aves de produção  
284 comercial (Aarestrup et al. 2000). A disseminação de cepas resistentes de  
285 *Staphylococcus* spp. aviária à eritromicina pode causar um impacto considerável sobre a

286 eficácia do tratamento, controle da doença e a rentabilidade da indústria avícola (Nawaz  
287 et al. 1999).

288 O fato da eritromicina ser rotineiramente empregada no tratamento de doenças  
289 em aves, em longo prazo pode trazer consequências indesejáveis, como  
290 desenvolvimento de *Staphylococcus* spp. resistentes à eritromicina (Mota et al., 2005).  
291 De acordo com Sahm (1994) e Lee (2003) a resistência dos *Staphylococcus* spp. a  
292 oxacilina está relacionada à presença do gene *mecA* que é considerado um determinante  
293 genético, que torna os microorganismos intrinsecamente resistentes também a outras  
294 drogas.

295 Kawano et al. (1996) verificaram que os SCN meticilina resistente isolados de  
296 galinhas saudáveis apresentaram resistência para maioria dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos,  
297 e alguns isolados foram também resistentes para os macrolídeos e aminoglicosídeos. A  
298 maior causa da resistência aos  $\beta$ -lactâmicos é atribuída a presença de uma proteína  
299 produzida pelo gene *mecA* (Warsa et al. 1996, Hartman & Tomasz, 1984). Apesar da  
300 ausência do gene *mecA* nos isolados de *Staphylococcus* observou-se neste estudo que os  
301 mesmos apresentaram resistência a todos os antimicrobianos. De acordo com  
302 Gruthuysen et al. (2005) amostras de *Staphylococcus aureus* armazenadas sob  
303 congelamento demonstraram a perda do gene *mecA* e que a mesma aumentou de acordo  
304 com o tempo de estocagem, ou seja, quanto maior o tempo maior a probabilidade de  
305 perda do gene. Demonstrando em seus resultados, que apesar da especificidade da  
306 técnica utilizada, a sensibilidade da mesma pode variar conforme a forma de  
307 conservação das amostras.

308

309

310

## CONCLUSÕES

311

312 Os resultados obtidos neste estudo permitem caracterizar a participação dos  
313 *Staphylococcus* spp. na doença respiratória de frangos de corte e poedeiras comerciais  
314 no estado de Pernambuco. Além disso, o elevado coeficiente de resistência a  
315 antimicrobianos observada nos isolados pode comprometer o tratamento da  
316 estafilococose, indicando-se a realização de testes de sensibilidade *in vitro* antes do  
317 tratamento nas granjas estudadas.

318

## 319 Agradecimentos

320 Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq  
321 (Processo Nº 561360/2008-1) e ao Médico Veterinário Glédiston Posso da empresa  
322 ALIVET produtos agropecuários Ltda pelo apoio financeiro para realização desse  
323 estudo.

324

## 325 REFERÊNCIAS

326 Aarestrup, F.M.; Agerso, Y., Ahrens, P., Jorgensen, J.C.O., Madsen, M. & Jensen, L.B.  
327 2000. Antimicrobial susceptibility and presence of resistance genes in staphylococci  
328 from poultry. *Veterinary Microbiology*. 74(4):353-364.

329 Arciola, C.R., Collamati, S., Donati, E. & Montanaro, L. 2001. A rapid PCR methods for  
330 detection of slime producing strains of *Staphylococcus epidermidis* and *S. aureus* in  
331 periprosthetic infections. *Diagnostic Molecular Pathology*. 10(2):130-137.  
332

333 Arciola, C.R., Campoccia, D., Gamberini, S., Cernellati, M., Donati, E. & Montanaro,  
334 L. 2002. Detection of slime production by means of an optimized congo red agar plate  
335 test based on a colorimetric scale in *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates  
336 genotyped for ica locus. *Biomaterials*. 23(21):4233-4239.  
337

338 Awan, M.A. & Matsumoto, M. 1998. Heterogeneity of staphylococci and other bacteria  
339 isolated from six-week-old broiler chickens. *Poultry Science*. 77(7):944-949.  
340

341 Bauer, A.W., Kirby, W.M., Sherris, J.C. & Turck, M. 1966. Antibiotics susceptibility  
342 testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*.  
343 45(4):493-496.

- 344 Bernardi, A.C.A., Pizzolitto, E.L. & Pizzolitto, A.C. 2007. Detecção da produção de  
345 slime por estafilococos coagulase-negativa isolados de cateter venoso central. Revista  
346 Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada. 28(1):57-66.  
347
- 348 Bertolatti, D., O'Brien, F.G. & Grubb, W.B. 2003. Characterization of drug-resistant  
349 *Staphylococcus aureus* isolated from poultry processing plants in Western Australia.  
350 International Journal Environmental Health Research. 13(1):43-54.  
351
- 352 Costa, M.M., Drescher, G., Maboni, F., Weber, S., Schrank, A., Vainstein, M.H.,  
353 Schrank, I. & Vargas, A.C. 2010. Virulence factors, antimicrobial resistance and  
354 plasmid content of clinical and environmental *Escherichia coli* swine isolates. Arquivo  
355 Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. 62(1):30-36.  
356
- 357 Costerton, J.W., Stewart, P. & Greenberg, P. 1999. Bacterial biofilms: A common cause  
358 of persistent infections. Science. 284(5418):1318-1322.  
359
- 360 Ferreira, A.J.P. & Ferreira, C.S.A. 2009. Estafilococose e Estreptococose aviária. In:  
361 Berchieri Junior, A., Silva, E.N., Di Fabio, J., Sesti, L. & Zuanaze, M.A.F. Doenças das  
362 aves. Campinas: FACTA. p.475-482.  
363
- 364 Freeman, D.J., Falkiner, F.R. & Keane, C.T. 1989. New method for detecting slime  
365 production by coagulase negative staphylococci. Journal of Clinical Pathology.  
366 42(8):872-874.  
367
- 368 Geonaras, I. & Holy, A.V. 2001. Antimicrobial susceptibilities of isolates of  
369 *Staphylococcus aureus*, *Listeria* and *Salmonella* serotypes associated with poultry  
370 processing. International Journal Food Microbiology. 70(1-2):29-35.  
371
- 372 Gruthuysen, A.V., Loo, I.V., Alex, V.B., Grauls, C.V., Wannet, W., Keulen, P.V. &  
373 Kluytmans, J. 2005. Loss of the *mecA* Gene during Storage of Methicillin-Resistant  
374 *Staphylococcus aureus* Strains. Journal of Clinical Microbiology. 43:1361-1365.  
375
- 376 Hartman, B.J. & Tomasz, A. 1984. Low-affinity penicillin-binding protein associated  
377 with b-lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. Journal of Bacteriology.  
378 158(2):513-516.  
379
- 380 Hume, E.B.H., Baveja, J., Muir, B., Schubert, T.L., Kumar, N., Kjelleberg, S., Griesser,  
381 H.J., Thissen, H., Read, R., Poolewarren, L.A., Schindhelm, K. & Willcox, M.D.P.  
382 2004. The control of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation and in vivo  
383 infection rates by covalently bound furanones. Biomaterials. 25(20):5023-5030.  
384
- 385 Jonsson, P. & Wadstrom, T. 1993. *Staphylococcus*. In: Pathogenesis of Bacterial  
386 Infections in Animals. 2ed. Gyles, C.L. & Thoen, C.O. Iowa: State University Press, p.  
387 21-35.  
388
- 389 Jordan, F.T.W. 1996. Staphylococci. In: Jordan, F.T.W., Pattison, M. (Eds.), Poultry  
390 Diseases, 4th Edition. Saunders, London, p.66-69.  
391
- 392 Kawano, J., Shimizu, A., Saitoh, Y., Yagi, M., Saito, T. & Okamoto, R. 1996. Isolation  
393 of Methicillin-Resistant Coagulase-Negative staphylococci from Chickens. Journal of  
394 Clinical Microbiology. 34(9):2072-2077.

- 395 Kearns, A. M., Seiders, P. R., Wheeler, J., Freeman, R. & Steward, M. 1999. Rapid  
396 detection of methicilin-resistant Staphylococci by multiplex PCR. *Journal of Hospital*  
397 *Infection*. 43(1):33-37.  
398
- 399 Lee, J.H. 2003. Methicilin (oxacilin) resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated  
400 from major food animals and their potential transmission to humans. *Applied*  
401 *Environmental Microbiology*. 69(11):6489-6494.  
402
- 403 Marques, C.S. 2005. Formação de Biofilmes por *Staphylococcus aureus* na superfície  
404 de aço inoxidável e vidro e sua resistência a sanificantes químicos. Dissertação  
405 (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). UFLA (Universidade Federal de  
406 Lavras), Lavras. 64p.  
407
- 408 McNamee, P.T., McCullagh, J.J., Thorp, B.H., Graham, D., McCullough, S.J.,  
409 McConaghy, D. & Smyth, J.A. 1998. Study of leg weakness in two commercial broiler  
410 flocks. *Veterinary Research*. 143(5):131-135.  
411
- 412 Mota, R.A., Silva, K.P.C., Freitas, M.F.L., Porto, W.J.N., Silva, L.B.G. Utilização  
413 indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a multirresistência bacteriana.  
414 **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 42, n. 6,  
415 p. 465-470, 2005.  
416
- 417 Murakami, K., Minamide, W., Wada, K., Nakamura, E., Teraoka, H. & Watanabe, S.  
418 1991. Identification of methicilin-resistant strains of staphylococci by polimerase chain  
419 reaction. *Journal of Clinical Microbiology*. 29(10):2240-2244.  
420
- 421 Nawaz, M.S., Khan, A.A., Khan, S.A., Paine, D.D., Pothuluri, J.V. & Cerniglia, C.E.  
422 1999. Biochemical and molecular characterization of erythromycin resistant avian  
423 *Staphylococcus* spp. isolated from chickens. *Poultry Science*. 78(8):1191-1197.  
424
- 425 Peters, G. & Pulverer, G. 1984. Pathogenesis and management of Staphylococcus  
426 epidermidis 'plastic' foreign body infections. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*.  
427 14:67-71.  
428
- 429 Quinn, P.J., Carter, M.E., Markey, B.K. & Carter, G.R. 1994. *Clinical Veterinary*  
430 *Microbiology*. London: wolf, 648p.  
431
- 432 Rickard, A.H., Gilbert, P., High, N.J., Kolenbrander, P.E. & Handley, P.S. 2003.  
433 Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species  
434 biofilms. *Trends in Microbiology*. 11(2):94-100.
- 435 Sampaio, I.B.M. 1998. Estatística aplicada à experimentação animal. Belo Horizonte:  
436 UFMG. 221p.
- 437 Scanlan, C.M. & Hargis, B.M. 1989. A bacteriologic study of scabby-hip lesions from  
438 broiler chickens in Texas. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 1(2):170-173.  
439
- 440 Sahm, D.F. 1994. Streptococci and staphylococci: laboratory considerations for in vitro  
441 susceptibility testing. *Clinical Microbiology Newsletter*. 16(1):9-13.  
442

- 443 Simjee, S., McDermont, P.F., White, D.G., Hofacre, C., Berghaus, R.D., Carter, P.J.,  
444 Stewart, L., Liu, T., Maier, M. & Maurer, J.J. 2007. Antimicrobial susceptibility and  
445 distribution of antimicrobial resistance genes among *Enterococcus* and coagulase-  
446 negative *Staphylococcus* isolates recovered from poultry litter. *Avian Diseases*.  
447 51(4):884-892.  
448
- 449 Skeeles, J.K. 1997. Staphylococcosis. In: Calnek, B.W. *Diseases of Poultry*, Ames:  
450 Iowa State University Press. p. 247-253.  
451
- 452 Takeuchi, S., Kobayashi, Y., Morozumi, T. & Niibori, S. 1985. Isolation and some  
453 properties of *Staphylococcus hyicus* subsp. *hyicus* from pigs, chickens and cows.  
454 *Japanese Journal of Veterinary Science*. 47(5):841-843.  
455
- 456 Veenstra G., Cremers F., Van Dijk, H. & Fleer A. 1996. Ultrastructural organization  
457 and regulation of a biomaterial adhesion of *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of*  
458 *Bacteriology*. 178(2):537-41.  
459
- 460 Vuong C. & Otto M. 2002. *Staphylococcus epidermidis* infections. *Microbes and*  
461 *Infection*. 4(4):481-489.  
462
- 463 Vasudevan, P., Nair, M.K.M., Annamalai, T. & Venkitanarayana, K.S. 2003.  
464 *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. *Veterinary Microbiology*. 92:179-185.  
465
- 466 Warsa, U.C., Okubo, T. & Okamoto, R. 1996. Antimicrobial susceptibilities and phage  
467 typing of *Staphylococcus aureus* clinical isolates in Indonesia. *Journal Infectious*  
468 *Chemotherapy*. 2(1):29-33.

## NORMAS DA REVISTA



### INSTRUÇÕES AOS AUTORES

- Objetivo e política editorial
- Apresentação de manuscritos

ISSN 0100-736X *versión impresa*

ISSN 1678-5150 *versión online*

#### Objetivo e política editorial

O objetivo da revista **Pesquisa Veterinária Brasileira** é contribuir, através da publicação dos resultados de pesquisa e sua disseminação, para a manutenção da saúde animal que depende, em grande parte, de conhecimentos sobre as medidas de profilaxia e controle veterinários.

Com periodicidade mensal, a revista publica trabalhos originais e artigos de revisão de pesquisa no campo da patologia veterinária no seu sentido amplo, principalmente sobre doenças de importância econômica e de interesse para a saúde pública.

Apesar de não serem aceitas comunicações ("Short communications") sob forma de "Notas Científicas", não há limite mínimo do número de páginas do trabalho enviado, que deve porém conter pormenores suficientes sobre os experimentos ou a metodologia empregada no estudo.

Os trabalhos, em 3 vias, escritos em português ou inglês, devem ser enviados, junto com disquete de arquivos (de preferência em Word 7.0), ao editor da revista **Pesquisa Veterinária Brasileira**, no endereço abaixo. Devem constituir-se de resultados ainda não publicados e não considerados para publicação em outra revista.

Embora sejam de responsabilidade dos autores as opiniões e conceitos emitidos nos trabalhos, os editores, com a assistência da Assessoria Científica, reserva-se o direito de sugerir ou solicitar modificações aconselháveis ou necessárias.

#### Apresentação de manuscritos

1. Os trabalhos devem ser organizados, sempre que possível, em **Título, Abstract, Resumo, Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão, Conclusões** (ou combinações destes três últimos), **Agradecimentos e Referências**:



- a) o **Título** do artigo deve ser conciso e indicar o conteúdo do trabalho;
- b) um **Abstract**, um resumo em inglês, deverá ser apresentado com os elementos constituintes observados nos artigos em português, publicados no último número da revista, ficando em branco apenas a paginação, e, no final, terá indicação dos *index terms*;
- c) o **Resumo** deve apresentar, de forma direta e no passado, o que foi feito e estudado, dando os mais importantes resultados e conclusões; será seguida da indicação dos termos de indexação; nos trabalhos em inglês, Resumo e *Abstract* trocam de posição e de constituição (veja-se como exemplo sempre o último fascículo da revista);
- d) a **Introdução** deve ser breve, com citação bibliográfica específica sem que a mesma assuma importância principal, e finalizar com a indicação do objetivo do trabalho;
- e) em **Material e Métodos** devem ser reunidos os dados que permitam a repetição do trabalho por outros pesquisadores;
- f) em **Resultados** deve ser feita a apresentação concisa dos dados obtidos; quadros devem ser preparados sem dados supérfluos, apresentando, sempre que indicado, médias de várias repetições; é conveniente, às vezes, expressar dados complexos por gráficos, ao invés de apresentá-los em quadros extensos;
- g) na **Discussão** os resultados devem ser discutidos diante da literatura; não convém mencionar trabalhos em desenvolvimento ou planos futuros, de modo a evitar uma obrigação do autor e da revista de publicá-los;
- h) as **Conclusões** devem basear-se somente nos resultados apresentados no trabalho;
- i) os **Agradecimentos** devem ser sucintos e não devem aparecer no texto ou em notas de rodapé;
- j) a lista de **Referências**, que só incluirá a bibliografia citada no trabalho e a que tenha servido como fonte para consulta indireta, deverá ser ordenada alfabeticamente pelo sobrenome do primeiro autor, registrando os nomes de todos os autores, o título de cada publicação e, por extenso ou abreviado, o nome da revista ou obra, usando as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas - ABNT, *Style Manual for Biological Journals* (American Institute for Biological Sciences) e/ou *Bibliographic Guide for Editors and Authors* (American Chemical Society, Washington, D.C.).

2. Na elaboração do texto deverão ser atendidas as normas abaixo:

a) os trabalhos devem ser apresentados em uma só face do papel, em espaço duplo e com margens de, no mínimo, 2,5 cm; o texto será escrito corridamente; quadros serão feitos em folhas separadas, usando-se papel duplo ofício, se necessário, e anexados ao final do trabalho; as folhas, ordenadas em texto, legendas, quadros e figuras, serão numeradas seguidamente;

b) a redação dos trabalhos deve ser a mais concisa possível, com a linguagem, tanto quanto possível, no passado e impessoal; no texto, os sinais de chamada para notas de rodapé serão números arábicos colocados um pouco acima da linha de escrita, após a palavra ou frase que motivou a nota; essa numeração será contínua; as notas serão lançadas ao pé da página em que estiver o respectivo sinal de chamada; todos os quadros e todas as figuras serão mencionados no texto; estas remissões serão feitas pelos respectivos números e, sempre que possível, na ordem crescente destes; *Resumo e Abstract* serão escritos corridamente em um só parágrafo e não deverão conter citações bibliográficas;

c) no rodapé da primeira página deverá constar endereço profissional do(s) autor(es);

d) siglas e abreviações dos nomes de instituições, ao aparecerem pela primeira vez no trabalho, serão colocadas entre parênteses e precedidas do nome por extenso;

e) citações bibliográficas serão feitas pelo sistema "autor e ano"; trabalhos de dois autores serão citados pelos nomes de ambos, e de três ou mais, pelo nome do primeiro, seguido de "et al.", mais o ano; se dois trabalhos não se distinguirem por esses elementos, a diferenciação será feita pelo acréscimo de letras minúsculas ao ano, em ambos; todos os trabalhos citados terão suas referências completas incluídas na lista própria (Referências), inclusive os que tenham sido consultados indiretamente; no texto não se fará menção do trabalho que tenha servido somente como fonte; este esclarecimento será acrescentado apenas ao final das respectivas referências, na forma: "(Citado por Fulano 19...)"; a referência do trabalho que tenha servido de fonte será incluída na lista uma só vez; a menção de comunicação pessoal e de dados não publicados é feita, de preferência, no próprio texto, colocada em parênteses, com citação de nome(s) ou autor(es); nas citações de trabalhos colocados entre parênteses, não se usará vírgula entre o nome do autor e o ano, nem ponto-e-vírgula após cada ano; a separação entre trabalhos, nesse caso, se fará apenas por vírgulas, exemplo: (Flores & Houssay 1917, Roberts 1963a,b, Perreau et al. 1968, Hanson 1971);

f) a lista das referências deverá ser apresentada com o mínimo de pontuação e isenta do uso de caixa alta, sublinhando-se apenas os nomes

científicos, e sempre em conformidade com o padrão adotado no último fascículo da revista, inclusive quanto à ordenação de seus vários elementos.

3. As **figuras** (gráficos, desenhos, mapas ou fotografias) deverão ser apresentadas em tamanho maior (cerca de 150%) do que aquele em que devam ser impressas, com todas as letras ou sinais bem proporcionados para assegurar a nitidez após a redução para o tamanho desejado; parte alguma da figura será datilografada; a chave das convenções adotadas será incluída preferentemente, na área da figura; evitar-se-á o uso de título ao alto da figura; desenhos deverão ser feitos com tinta preta em papel branco liso ou papel vegetal, vedado o uso de papel milimetrado; cada figura será identificada na margem ou no verso, a traço leve de lápis, pelo respectivo número e o nome do autor; havendo possibilidade de dúvida, deve ser indicada a parte superior da figura; fotografias deverão ser apresentadas em branco e preto, em papel brilhante, e sem montagem, ou em diapositivos (*slides*) coloridos; somente quando a cor for elemento primordial a impressão das figuras será em cores; para evitar danos por grampos, desenhos e fotografias deverão ser colocados em envelope.

4. As legendas explicativas das figuras conterão informações suficientes para que estas sejam compreensíveis e serão apresentadas em folha separada que se iniciará com o título do trabalho.

5. Os **quadros** deverão ser explicativos por si mesmos; cada um terá seu título completo e será caracterizado por dois traços longos, um acima e outro abaixo do cabeçalho das colunas; entre esses dois traços poderá haver outros mais curtos, para grupamento de colunas; não há traços verticais; os sinais de chamada serão alfabéticos, recomeçando de *a* em cada quadro, e as notas serão lançadas logo abaixo do quadro respectivo, do qual serão separadas por um traço curto, à esquerda.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Bactérias como *Mycoplasma* spp., *Escherichia coli* e *Staphylococcus* spp., participam como agentes primários e secundários de doença respiratória em frangos de corte e poedeiras comerciais no Estado de Pernambuco. Devem ser consideradas no tratamento e controle quando envolvidas em patologia nos plantéis estudados;
- A identificação molecular de *Mycoplasma synoviae* em granjas de frangos de corte e poedeiras comerciais serve de alerta para se discutir medidas de controle na propagação dessa espécie nos plantéis;
- A PCR pode ser utilizada para o monitoramento e diagnóstico das micoplasmoses nos plantéis avícolas comerciais e como ferramenta para diferenciação da cepa de campo e vacinal de MG;
- A detecção de genes de virulência contribui para determinação da epidemiologia de isolados de *Escherichia coli* patogênica de aves (APEC);
- A determinação do perfil plasmidial presente em isolados de *Escherichia coli* pode contribuir para o conhecimento da transferência de resistência a antibióticos e sua disseminação nos plantéis avícolas na região estudada;
- *Staphylococcus* spp. e *Escherichia coli* isolados de frangos de corte e poedeiras comerciais no Estado de Pernambuco apresentam níveis elevados de multirresistência a antimicrobianos utilizados na avicultura, sugerindo uma avaliação criteriosa na eleição das drogas antimicrobianas empregadas para o tratamento das doenças aviárias.