

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM HIGIENE VETERINÁRIA
E PROCESSAMENTO TECNOLÓGICO DE PRODUTOS
DE ORIGEM ANIMAL

THAÍS BADINI VIEIRA

CARACTERIZAÇÃO DE *Escherichia coli* ISOLADOS DE
MIÚDOS E CARÇAÇA COM CELULITE POR RAPD E
DETECÇÃO DOS GENES *iss* E *fe1A* POR PCR.

UNIVERSIDADE
FEDERAL
FLUMINENSE

Niterói/RJ
2010

THAÍS BADINI VIEIRA

**CARACTERIZAÇÃO DE *Escherichia coli* ISOLADOS DE MIÚDOS E
CARÇA COM CELULITE POR RAPD E DETECÇÃO DOS GENES
iss E *fe1A* POR PCR.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutor – Área de Concentração: Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Virgínia Leo de Almeida Pereira

Departamento de Saúde Coletiva Veterinária e Saúde Pública - UFF

Co-orientadores: Prof. Dr. Robson Maia Franco

Prof. Dr. PhD Elmiro do Nascimento

Prof. Dr. Rogério Tortelly

Niterói/RJ

2010

THAÍS BADINI VIEIRA

**CARACTERIZAÇÃO DE *Escherichia coli* ISOLADOS DE MIÚDOS E CARÇAÇA
COM CELULITE POR RAPD E DETECÇÃO DOS GENES *iss* E *fe1A* POR PCR.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutor – Área de Concentração: Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal.

Aprovada em 26 agosto de 2010.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Virgínia Leo de Almeida Pereira
Universidade Federal Fluminense

Prof. Dr. Robson Maia Franco
Universidade Federal Fluminense

Prof. Dr. PhD Elmiro Rosendo do Nascimento
Universidade Federal Fluminense

Prof. Dr. Antônio José Piantino Ferreira
Departamento de Patologia - FMVZ-USP

Dr. Harrison Magdinier Gomes
Pesquisador Adjunto - Fundação Oswaldo Cruz

Niterói/RJ
2010

Aos meus pais Celme Faria Badini Vieira e Elpídio Gonçalves Vieira, à minha irmã Thatiana Badini Vieira, às minhas filhas queridas e a todos que diretamente ou indiretamente me ajudaram na realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me guiar e abençoar, a cada minuto, em meu aprendizado.

Ao meu pai e a minha irmã, Elpídio Gonçalves Vieira e Thatiana Badini Vieira, os quais amo tanto, pelo amor, amizade e compreensão.

À minha mãezinha, Celme Faria Badini Vieira (*“in memoriam”*), que sempre esteve ao meu lado em tudo, e mesmo hoje, tão longe, tem sido minha inspiração e minha força para alcançar meus objetivos.

Às minhas filhinhas Mel e Julie que, apesar de bagunceiras, são tão companheiras e amigas.

Ao cunhado Jucian Cabral pela amizade e pelos momentos de alegria.

À minha madrinha Sandra Badini Nacif e ao meu padrinho Luis Eduardo Nacif que me acolheram com tanto amor e carinho.

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Virgínia Leo de Almeida Pereira por ter acreditado e confiado em mim, apoiado e incentivado o meu trabalho.

Ao Prof. Dr. Robson Maia Franco pela amizade, dedicação, disponibilidade e confiança, por me incentivar e acreditar em minha capacidade como aluna e profissional e por ser uma pessoa espetacular com todos.

Ao Prof. Dr. Rogerio Tortelly, pela amizade, dedicação, carinho e compreensão.

Ao Prof. Dr. Elmiro Rosendo do Nascimento pela paciência, dedicação e preciosos ensinamentos.

Ao pesquisador Dr. Philip Noel Suffys, da Fundação Oswaldo Cruz, Laboratório de Biologia Molecular Aplicada a Micobactérias, pela colaboração, por ter disponibilizado o laboratório possibilitando a execução da pesquisa.

Aos pesquisadores Dr. Harrison Magdinier Gomes e a Dr^a. Márcia Quinhones Pires Lopes pela amizade e pelas valiosas e indispensáveis orientações, sem as quais esse trabalho não teria se desenvolvido.

Aos amigos do Laboratório de Epidemiologia Molecular da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense, do Laboratório de Controle Microbiológico de Produtos de Origem Animal e do Laboratório de Biologia Molecular Aplicada a Micobactérias – FIOCRUZ pelo valioso auxílio, contribuição, amizade e solidariedade em todas as etapas do meu trabalho.

À amiga Nedinéia Gomes Ferreira Moreira (Néia) que, mesmo na correria, sempre teve um tempinho para me ajudar, conversar e me fazer sorrir.

Ao Médico Veterinário Ociron Jader Thomal Vasques pela disponibilidade e apoio.

À Professora Mônica de Queiroz pela atenção e prontidão.

Ao secretário da coordenação da pós-graduação, Drausio Ferreira Paiva, pela ajuda prestada sempre que necessária.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a execução deste trabalho.

À Capes pelo suporte financeiro.

SUMÁRIO

RESUMO, p. 12

ABSTRACT, p. 13

1 INTRODUÇÃO, p. 14

2 REVISÃO DE LITERATURA, p. 17

2.1 INSPEÇÃO SANITÁRIA EM CARNE DE AVES NO BRASIL, p. 17

2.2 CELULITE AVIÁRIA, p. 18

2.2.1 Fatores Predisponentes, p. 20

2.2.2 Aspectos macroscópicos, p. 21

2.2.3 Aspectos microscópicos, p. 22

2.3 *Escherichia coli*, p. 22

2.3.1 APEC e sua importância para Saúde Coletiva, p. 26

2.3.2 Fatores de virulência em APEC, p. 28

2.3.3 *E. coli* e celulite aviária, p. 33

2.3.4 Genotipagem de *E. coli* pela RAPD, p. 35

3 DESENVOLVIMENTO

3.1 ARTIGO 1 POTENCIAL PATOGÊNICO E CARÁTER SÉPTICO DE *Escherichia coli* PELA IDENTIFICAÇÃO DOS FATORES DE VIRULÊNCIA *iss* e *felA* EM CELULITE E MIÚDOS DE FRANGOS SOB INSPEÇÃO SANITÁRIA (A ser submetido à revista Brazilian Journal of Microbiology), p. 37

3.2 ARTIGO 2 - ANÁLISE MOLECULAR DE *Escherichia coli* ISOLADAS DE CELULITE E MIÚDOS (FÍGADO E CORAÇÃO) DE FRANGOS SOB INSPEÇÃO SANITÁRIA (A ser submetido à Revista de Saúde Pública - USP), p. 63

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS, p. 78

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS, p. 80

6 APÊNDICES, p. 99

6.1 Dendograma das estirpes de *E. coli* diferenciadas pelo RAPD - amostras de celulite e miúdos de sete frangos numerados de 1 ao 7, p. 100

6.2 Dendograma das estirpes de *E. coli* diferenciadas pelo RAPD - amostras de celulite e miúdos de oito frangos numerados de 8 a 15, p. 101

6.3 Dendograma das estirpes de *E. coli* diferenciadas pelo RAPD - amostras de celulite e miúdos de oito frangos numerados de 16 a 23, p. 102

6.4 Dendograma das estirpes de *E. coli* diferenciadas pelo RAPD - amostras de celulite e miúdos de nove frangos numerados de 24 a 32, p. 103

6.5 Dendograma das estirpes de *E. coli* diferenciadas pelo RAPD - amostras de celulite e miúdos de oito frangos numerados de 33 a 40, p. 104

6.6 Dendograma das estirpes de *E. coli* diferenciadas pelo RAPD - amostras de celulite e miúdos de sete frangos numerados de 41 a 47, p. 105

6.7 Dendograma das estirpes de *E. coli* diferenciadas pelo RAPD - amostras de celulite e miúdos de quatro frangos numerados de 48 a 51, p. 106

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

ARTIGO 1

FIGURA 1. Frequência relativa (%) do local de aparecimento das lesões de celulite. RCLE: Região Caudo-Lateral Esquerda; RCLD: Região Caudo-Lateral Direita; RCLE e RCLD: Lesões em Região Caudo-Lateral Direita e Caudo Lateral Esquerda, p. 46

FIGURA 2. Frequência relativa (%) das principais alterações macroscópicas encontradas em tegumento de frangos de corte com celulite. EP: Espessamento de Pele; FOUL: Focos Ulcerativos; PFC: Placa Fibrinocaseosa em Subcutâneo; FFP: Fluido Amarelado Fibrinopurulento; FHM: Focos Hemorrágicos em Tecido Muscular, p. 46

TABELA 1. Tamanho de lesão *versus* Isolamento de *E. coli* em celulite e miúdos (fígado e coração) de frangos de corte sob Inspeção Sanitária, p. 47

FIGURA 3. Marcador Molecular de DNA 100pb; CN: controle negativo; CP: controle positivo; 1 a 8: estirpes de *E. coli iss* positivas, p. 48

FIGURA 4: Marcador Molecular de DNA 100pb; CN: controle negativo; CP: controle positivo; 1 e 2: estirpes de *E. coli felA* positivas; 3 e 4: estirpes de *E. coli felA* negativa, p. 49

TABELA 2. Isolados de *E. coli iss* e *fel A* positivos em casos de celulite e miúdos (fígado e coração) de frangos de corte sob Inspeção Sanitária, p. 49

TABELA 3. Identificação do gene *iss* nos isolados de *E. coli* de celulite e miúdos (fígado e/ou coração) em frangos de corte sob Inspeção Sanitária, p. 50

Tabela 4. Tamanho de Lesão *versus* *E. coli iss* positiva isolada de Celulite e Miúdos (fígado e/ou coração) de frangos de corte sob Inspeção Sanitária, p. 51

ARTIGO 2

Tabela 1. Similaridade entre os isolados de *E. coli* de celulite *versus* os isolados de miúdos (fígado e/ou coração) pertencentes ao mesmo “cluster”, p. 71

LISTA DE ABREVIATURAS

APEC	“Avian Pathogenic” <i>E. coli</i>
BHI	“Brain Heart Infusion”
Col-V	Colicina V
<i>cva</i>	gene - Produção de colicina
DAEC	“Diffusely adherent <i>E. coli</i> ”
DNA	“Deoxyribonucleic Acid”
dNTP	Deoxinucleotídeo trifosfatado
EAggEC	“Enteraggregative” <i>E. coli</i>
EDTA	“Ethylenediaminetetraacetic acid”
EHEC	“Enterohaemorrhagic” <i>E. coli</i>
EIEC	“Enteroinvasive” <i>E. coli</i>
EMB	Agar “Eosyn Methylen Blue”
EP	Espessamento de pele
EPEC	“Enteropathogenic” <i>E. coli</i>
EPM	Meio de Rugai e Araújo modificado
ETEC	“Enterotoxigenic” <i>E. coli</i>
ExPEC	“Extraintestinal Pathogenic” <i>E. coli</i>
FEEC	“Facultative enteropathogenic” <i>E. coli</i>
<i>felA</i>	gene - Fímbria F11
FFP	Fluido amarelado fibrinopurulento
FHM	Focos hemorrágicos em tecido muscular
FOUL	Focos ulcerativos
<i>fyuA</i>	gene - “ferric yersiniabactin uptake”
<i>hly</i>	gene – “hemolysin”
IgA	Imunoglobulina A

IROMPS	“Iron Regulated Outer Membrane Protein “
<i>irp-2</i>	gene - “iron repressible protein”
<i>iss</i>	gene – “Increased serum survival”
<i>iut</i>	gene – “aerobactin receptor”
<i>Kps</i>	gene – “capsular antigen”
LTs	“Heat Labile Toxin”
MILi	Motilidade Indol Lisina
MLST	“Multilocus Sequence Typing”
<i>pap</i>	gene – “Pyelonephritis-associated pilus”
PCR	“Polymerase Chain Reaction”
PFC	Placa Fibrinocaseosa em Subcutâneo
PFGE	“Pulsed-Field Gel Electrophoresis”
RAPD	“Random Amplified Polimorphic DNA”
RCLD	Região Caudo-Lateral Direita
RCLE	Região Caudo-Lateral Esquerda
RFLP	“Restriction Fragment Length Polymorphism”
SIM	Sulfeto Indol Motilidade
STEC	“Shiga Toxin-producing <i>Escherichia coli</i> ”
<i>STs</i>	“Heat Stable Toxin”
<i>stx1 e stx2</i>	genes - Shiga toxinas (verotoxinas)
TAE	Tampão Tris- acetato
TBE	Tampão Tris-Borato- EDTA
<i>tsh</i>	gene - “temperature-sensitive haemagglutinin”
UPEC	“Urophatogenic” <i>E. coli</i>

RESUMO

O Brasil é o terceiro maior produtor mundial e o primeiro colocado nas exportações de carne de frango. Em função da produção em larga escala, do tipo de criação e do manejo de frangos de corte, as lesões cutâneas como a celulite aviária, vêm se tornando cada vez mais frequentes e são consideradas como uma das maiores causas de condenações totais e parciais em todo o mundo. Neste estudo objetivou-se isolar e identificar *E. coli* de lesões de celulite e miúdos (coração e fígado) de frangos de corte, identificar fatores de virulência de resistência sérica (*iss*) e fimbrial F11 (*fel A*) pela PCR, identificar os isolados pela RAPD e correlacioná-los pela análise molecular, a fim de avaliar o potencial patogênico dos isolados e o caráter séptico da doença. Foram utilizados 51 frangos de corte com lesões típicas de celulite identificadas pela Inspeção Sanitária. Na Inspeção, as lesões de celulite apresentaram úlcera cutânea, sendo que oito com espessamento de pele, alterações na coloração tendendo ao amarelo-avermelhado e irregularidade na superfície cutânea. Ao corte, notou-se presença de fluido gelatinoso e placas amarelas destacáveis e em alguns casos foi visível o acometimento da musculatura adjacente. Foram isoladas estirpes de *Escherichia coli* das lesões de celulite e de miúdos (fígado e coração) dos frangos estudados, a fim de estabelecer o caráter séptico da lesão. Estirpes de *E. coli* foram recuperadas em 96% das lesões de celulite, em 50,98% das amostras de fígado e em 41,17% das de coração. *E. coli* foi isolada de 50 frangos. Em 19, a bactéria estava presente somente em lesões de celulite; em 11, nas lesões de celulite e no fígado; em cinco, nas lesões de celulite e no coração; em 14, nas lesões de celulite, no fígado e no coração; e em uma, somente no fígado e no coração. Não houve significância pelo coeficiente de qui-quadrado ($p > 0,05$) ao correlacionar os tamanhos das lesões com os isolamentos de *E. coli* em celulite e celulite e miúdos (fígado e coração). Dos 190 isolados de *E. coli* provenientes dos 51 frangos estudados, 59,47% foram positivos para o gene *iss* e 4,2%, para o gene *felA*. Os resultados da RAPD-PCR, comparados pelo software BIONUMERCS, foram agrupados em 46 “clusters” com 80% ou mais de similaridade, sendo o menor composto por duas estirpes e o maior por doze. Das 30 aves em que foi isolada *E. coli*, em lesões de celulite associada a miúdos (fígado e/ou coração), em 10, foram obtidas estirpes com mais de 85% de similaridade entre os isolados de celulite e miúdos, em nove amostras, houve 85% de similaridade entre isolados de fígado e de coração sem similaridade entre os isolados de celulite, e em 11, não houve correlação entre os isolados. A detecção de estirpes de *E. coli* com alta similaridade genética em celulite e em miúdos pode significar que a remoção parcial das lesões não minimiza o risco à saúde coletiva. Assim, o isolamento de *E. coli* de celulite e miúdos em frangos de corte fortalece a ideia de que a remoção parcial das lesões de celulite apenas minimiza o aspecto repugnante da carcaça, sendo mais estética do que higiênica, visto que não contribui para eliminação da contaminação que poderia se estender às linhas de produção.

Palavras-chave: colissepticemia; celulite; frango; PCR; RAPD-PCR

ABSTRACT

Brazil is the third largest chicken producer and first in exports of broiler meat. Due to the large scale production, the type of establishment and management of broilers, the skin lesions such as avian cellulitis, are becoming increasingly frequent and are considered a major cause of total and partial condemnations throughout the world. This study aimed at isolating and identifying *Escherichia coli* from lesions of cellulitis and offal (heart and liver) from broilers to identify virulence factors of serum resistance (iss) and F11 fimbrial (fel A) by PCR, identify the isolates by RAPD and correlate them by molecular analysis in order to establish the pathogenic potential of the isolates and the septic characteristic of the disease. It was used 51 broilers with typical lesions of cellulitis diagnosed by Sanitary Inspection. The cellulitis at inspection was characterized as skin ulcer, being eight with skin thickening, color changes tending to reddish-yellow, and irregular skin surface. At cutting, it was seen gelatinous fluid and yellowish patches, in some cases, with involvement of the adjacent musculature. It was isolated strains of *E. coli* from cellulitis lesions and offal (liver and heart) from broilers studied in order to establish the septic character of the lesion. Strains of *E. coli* were recovered from 96% of cellulitis, 50.98% from liver and 41.17% from the heart samples. *E. coli* was isolated from 50 broilers. In 19, from cellulitis, 11, from cellulitis and liver, five from cellulitis and heart, 14, from cellulitis, liver and heart, and one, only from liver and heart. There was no significant association between cellulitis lesion size and *E. coli* rate of recovery from cellulitis and offal (liver and heart) by chi-square test ($p > 0.05$). Of 190 *E. coli* isolated from the 51 studied broilers, 59.47% were positive for iss gene and 4.2% for the *felA* gene. The results of RAPD-PCR, compared by software BIONUMERCS, were grouped into 46 clusters with 80% or more similarity, the lowest consisting of two strains and increased by twelve. Of the 30 broilers which were isolated *E. coli*, from lesions of cellulitis associated with offal (liver and / or heart), 10, were obtained strains with more than 85% similarity between isolated from cellulitis and offal; in nine samples, there was 85% similarity between isolated from liver and heart with no similarity between the isolated from cellulitis; and 11, there was no correlation between the isolates. The detection of strains of *E. coli* with high genetic similarity in cellulite and offal may indicate that the partial removal of the lesions does not minimize the risk to public health. Thus, the isolation of *E. coli* from cellulitis cases and offal in broiler strengthens the idea that the partial removal of the lesions of cellulitis only minimizes the repulsive aspect of the carcass being are more aesthetic than hygienic, not contributing to *E. coli* elimination witch could spread to production lines.

Keywords: colissepticemia; cellulitis; broiler; PCR; RAPD-PCR.

1 INTRODUÇÃO

A avicultura brasileira desenvolveu-se e modernizou-se rapidamente alcançando níveis elevados de produtividade, destacando-se por uma trajetória de incremento tecnológico expressivo, alavancada pela destacada articulação entre os diferentes agentes que a compõe (GIROTTI; MIELE, 2006). O Brasil é o terceiro maior produtor mundial e o primeiro colocado nas exportações de carne de frango (ABEF, 2009). Apesar destes avanços tecnológicos, ainda há uma grande preocupação com a sanidade na avicultura. Falhas neste setor podem representar prejuízos econômicos ocasionados pela perda de mercados por restrições sanitárias (ANTUNES, 2006).

Conforme a Portaria nº 210 de 26/11/1998 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento do Brasil, qualquer órgão ou partes de carcaça que estiverem afetados por um processo inflamatório, como a celulite, deve sofrer condenação parcial, e condenação total, quando houver a evidência de caráter sistêmico em carcaça e vísceras (BRASIL, 1998). Devido a produção em larga escala, ao tipo de criação e ao manejo de frangos de corte, as lesões cutâneas, incluindo celulite, vêm se tornando cada vez mais frequentes, sendo uma das maiores causas de condenações totais e parciais em todo o mundo (ANDRADE, 2005).

A celulite é caracterizada pela formação de placas fibrinocaseosas no tecido subcutâneo profundo, oriundas de uma inflamação purulenta, aguda e difusa, localizando-se principalmente nas regiões de abdômen e sobrecoxa (ALVES et al., 2007; ANDRADE, 2005; SILVA, MOTA, 2003; VIEIRA, 2006). Apresenta etiologia multifatorial, porém a *Escherichia coli* tem sido um dos agentes mais frequentemente isolado. É indispensável que a pele esteja lesada para que as bactérias invadam e se multipliquem no hospedeiro, embora este fator não seja isoladamente suficiente

para a ocorrência da enfermidade (ALLAN, 1997; FALLAVENA, 2000; NORTON; MACKLIN; MACMURTREY, 1999).

A presença de *E. coli* nas lesões de celulite favorece a contaminação cruzada nas linhas de processamento de frangos, além disso, o descarte parcial de algumas lesões difusas pode favorecer ao aumento da quantidade inicial de bactérias na carcaça. Além disso, pesquisas têm demonstrado que aves condenadas por celulite apresentaram uma combinação com outras lesões em coração, sacos aéreos, ossos, articulações e/ou fígado, embora, em alguns casos não seja possível o isolamento do mesmo sorogrupo nas lesões de celulite e dos outros tecidos (GOMIS et al, 1997a, 1997b; 2000).

Não existem relatos de *E. coli* isoladas de lesões de celulite causando doenças em humanos, entretanto a análise molecular das estirpes tem mostrado que *E. coli* isoladas de celulite estão geneticamente relacionadas àquelas responsáveis por septicemia e meningite em humanos. Além disso, deve ser considerado que estirpes de *E. coli* podem adquirir fatores de virulência por transferência, o que sugere a possibilidade de trocas genéticas entre cepas e a probabilidade do surgimento de estirpes patogênicas emergentes (KUHNER et al., 2000; KUMOR et al., 1998; NGELEKA et al., 1996).

Os mecanismos de virulência da “*Avian Pathogenic Escherichia coli*” (APEC) têm sido continuamente estudados e considerados multifatoriais. Os mais frequentemente mencionados são: de adesão (*pap* e *felA*), de produção de colicina (*cva*), de presença de aerobactina (*iut*), de resistência sérica (*iss*), flagelos, antígenos capsulares (*kps*) e hemaglutinina temperatura-sensível (*tsh*) (EWERS et al., 2004; LA RAGIONE; WOODWARD, 2002; ROCHA et al., 2002).

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

O gene *iss* tem sido localizado em vários plasmídios de grandes dimensões que são capazes de carrear simultaneamente fatores de virulência e de resistência a antimicrobianos (JOHNSON et al., 2002). É um determinante genético que pode

mediar a resistência da bactéria aos efeitos bactericidas do soro do hospedeiro. A resistência sérica tem sido associada com a capacidade da *E. coli* resistir ao sistema imune do hospedeiro, produzindo infecções generalizadas em frangos e infecções extraintestinais em outras espécies (ALLAN, 1997; NGELEKA et al., 1996). Serve como marcador de virulência das estirpes patogênicas nas aves, uma vez que a expressão desse gene frequentemente prediz seus efeitos patogênicos (GIBBS et al., 2003; NOLAN et al., 2002).

O uso da “Polymerase Chain Reaction” (PCR) na rotina de diagnósticos é uma ferramenta de rápida detecção de organismos infecciosos através da amplificação de um segmento específico do genoma do agente (EWERS et al. 2005), permitindo a identificação de genes correspondentes aos fatores de virulência.

A discriminação molecular de cepas de *E. coli* pode ser evidenciada a partir de diferentes técnicas baseadas no princípio da PCR, como por exemplo a “Random Amplified Polymorphic DNA” (RAPD-PCR) utilizada para diferenciação de estirpes de origem humana (VOGEL et al., 2000) e de animais (SALEHI et al., 2008), e em estudos epidemiológicos de contaminação cruzada em alimentos (KANUNGO, 2009). Esta técnica tem sido considerada eficiente e adequada para a tipagem molecular de *E. coli* (SAHILAH et al., 2010), sendo relativamente mais fácil e rápida de ser reproduzida, quando comparada a outras técnicas moleculares.

Objetivou-se neste estudo isolar e identificar *E. coli* de lesões de celulite e miúdos (coração e fígado) de frangos de corte, identificar fatores de virulência de resistência sérica (*iss*) e fimbrial F11 (*fel A*) pela PCR, identificar os isolados pela RAPD e correlacioná-los pela análise molecular, a fim de avaliar o potencial patogênico dos isolados e o caráter séptico da doença.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.2 INSPEÇÃO SANITÁRIA EM CARNE DE AVES NO BRASIL

A avicultura brasileira desenvolveu-se e modernizou-se rapidamente, alcançando níveis elevados de produtividade, alavancada pela destacada articulação entre os diferentes agentes que a compõe (GIROTTTO; MIELE, 2006).

Desde 2004, o Brasil está classificado como o terceiro produtor e maior exportador mundial de carne de frangos. A produção de carne de frango tornou-se vantajosa tendo em vista que estão a seu favor em relação às outras carnes, os preços competitivos, a forte preferência dos consumidores e o crescente uso desta na preparação de alimentos prontos para o consumo (ibid, 2006).

Esta indústria avícola é eficiente e de alta produtividade, baseada em um sistema técnico-científico avançado (GIROTTTO; MIELE, 2006). Apesar dos avanços tecnológicos na avicultura, ainda há uma grande preocupação com a sanidade avícola. Falhas neste setor podem representar prejuízos econômicos ocasionados pela perda de mercados por restrições sanitárias (ANTUNES, 2006).

As aves destinadas ao consumo são julgadas conforme a Portaria 210 de 26 de novembro de 1998 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 1998). Conforme essa legislação, qualquer órgão ou partes de carcaça

que estiverem afetados por um processo inflamatório, como a celulite, deverá ter condenação parcial e havendo a evidência de caráter sistêmico (vísceras e carcaça) ocorrerão condenações totais.

Em função da produção em larga escala, do tipo de criação e do manejo de frangos de corte, as lesões cutâneas, como a celulite aviária, vêm se tornando cada vez mais frequente, sendo uma das maiores responsáveis por condenações totais e parciais em todo o mundo (ANDRADE, 2005).

A inspeção *post-mortem* dos frangos deve ser efetuada individualmente durante o abate, através do exame visual macroscópico de carcaças e vísceras e, conforme o caso, com palpação e corte. A inspeção da linha é realizada por pessoas treinadas especificamente para tal função, mas o juízo final sobre o destino da carcaça e vísceras cabe única e exclusivamente ao médico veterinário (BRASIL, 1998).

2.2 CELULITE AVIÁRIA

A pele, maior órgão do corpo, é constantemente afetada por uma variedade de fatores. As doenças de pele em frangos incluem a celulite, a varíola, o carcinoma dérmico de células escamosas, a forma cutânea da doença de Marek e outras dermatites, como a gangrenosa, de contato, traumática e micótica. Alguns aspectos inerentes à criação em escala industrial de frangos de corte como alta densidade nos galpões, confinamento, entre outras, favorecem o aparecimento de lesões cutâneas que vêm adquirindo importância crescente devido aos prejuízos econômicos que provocam com as condenações parciais e totais das carcaças de frangos (FALLAVENA, 2000; 2006).

A celulite aviária é motivo de intensa preocupação para a indústria avícola por ser uma das maiores fontes de condenações nos abatedouros devido ao aspecto repugnante que determina na carcaça, ao temor às enfermidades sistêmicas e implicações com a saúde coletiva (FALLAVENA, 2000; KUMOR et al., 1998; ONDERKA et al., 1997). Acomete principalmente frangos de corte, tendo sido descrita em perus (CARR et al., 1996; GOMIS et al., 2002; JEFFREY et al., 1993; OLKOWSKI et al., 1999; St-HILAIRE; ARELLANO; RIBBLE, 2003) e codornas (BURNS et al., 2003).

Além dos prejuízos com as condenações, o ônus é maior alterações no manejo e diminuição da velocidade de processamento (FALLAVENA, 2000).

Lotes de frangos de corte podem se apresentar normais durante a criação e o problema somente ser detectado durante a inspeção no abate (NORTON, 1997; SILVA; MOTA, 2003), após a escaldagem e depenagem (BOULIANNE, 1999), pela observação da descoloração e do engrossamento da pele, além da inflamação no tecido subcutâneo.

A lesão de celulite é caracterizada por uma inflamação purulenta, aguda e difusa do tecido subcutâneo profundo que envolve camadas celulares. Ocorre a formação de placas fibrinocaseosas no subcutâneo (ALVES, 2005; ANDRADE, 2005; FALLAVENA, 2000; NORTON, 1997; RANDALL et al., 1984; VIEIRA, 2006), podendo estender-se para músculos adjacentes que em alguns casos apresentam pequenos pontos hemorrágicos (ALVES et al., 2007; ANDRADE, 2005; RANDALL et al., 1984; SILVA; MOTA, 2003; VIEIRA, 2006). A celulite localiza-se principalmente nas regiões de abdômen e sobrecoxa, podendo estar presente também em cabeça, pescoço, coxa, dorso e asas (ALVES, 2005; ANDRADE, 2005; FALLAVENA, 2000), peito (ANDRADE, 2005; BRITO, 2002), sendo frequentemente unilateral (ANDRADE, 2005; MESSIER et al., 1993; SILVA; MOTA, 2003).

A gravidade das lesões dependerá de variáveis como a estirpe e a quantidade de células bacterianas que penetram no hospedeiro, o tipo da lesão do tecido epitelial e o estado imunológico da ave (FALLAVENA, 2000).

A doença apresenta etiologia multifatorial e diversas bactérias são associadas, tais como o *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Proteus spp.*, *Aeromonas spp.*, *Citrobacter freundii*, além de anaeróbicas como *Clostridium colinum*, *Clostridium septicum* e *Clostridium perfringens* (FALLAVENA, 2000; SILVA; MOTA, 2003). Entretanto, a *Escherichia coli* tem sido a mais frequentemente isolada como agente etiológico (ANDRADE, 2005; BRITO, 2002; BRITO, GAZIRI, VIDOTTO, 2003; FALLAVENA, 2000; MESSIER et al., 1993; RANDALL et al., 1984).

2.2.1 Fatores Predisponentes

Diferentes fatores predisponentes associam-se ao aumento de lesões de celulite em frangos de corte. Estudos realizados por Elfadil et al. (1996a; 1996b) demonstraram que o ganho de peso, o sexo da ave e a densidade populacional nos galpões também podem contribuir para o aumento dessas lesões. A idade e o sexo estão relacionados ao empenamento e o sexo e a densidade, à agressividade.

Os machos tendem ao empenamento mais lento, expondo por mais tempo a pele abdominal ao ambiente, sendo, portanto, mais vulneráveis às lesões. A temperatura ambiental também pode afetar o empenamento, visto que aves criadas em altas temperaturas apresentam velocidade de empenamento mais lento, aumentando a susceptibilidade de lesões abdominais e, conseqüentemente de celulite (SCHRADER; SINGER; ATWILL, 2004).

A frequência das lesões de pele é maior em frangos aos 35 dias do que em frangos aos 28 dias de idade, o que indica que a prevalência das lesões de pele aumenta com a idade (ELFADIL; VAILLANCOURT; MEEK, 1996a).

A limitação do número de aves vivendo sobre a mesma cama e o aumento no tempo de descanso do galpão favorece a redução significativa nas taxas da celulite (SCHRADER, SINGER; ATWILL, 2004). A cama utilizada nos galpões tem sido relatada como fator predisponente à ocorrência de celulite. Camas de palha, por exemplo, desempenham dois papéis no desenvolvimento da celulite, por consistir em fragmentos pontudos que podem infligir injúrias na pele e por possibilitar o crescimento e multiplicação da *E. coli* (ELFADIL et al., 1996a; ELFADIL; VAILLANCOURT; MEEK, 1996b).

Apesar da alta prevalência de lesões na pele de frangos, a grande maioria das aves com lesões na pele não desenvolve a celulite. Estes dados indicam que embora seja necessária a presença de lesões na pele para a ocorrência da celulite, esta não é isoladamente suficiente para causar a lesão (ALLAN, 1997; ELFADIL et al., 1996a). É indispensável que a pele esteja lesada para que bactérias invadam e se multipliquem no hospedeiro (FALLAVENA, 2000; NORTON; MACKLIN; McMURTREY, 1999).

Lesões de celulite apresentaram-se associadas à serosite, embora não seja possível determinar se as lesões em serosas ocorreram antes, depois ou concomitantemente com a celulite (ELFADIL et al., 1996a).

Fatores imunossupressores estão diretamente correlacionados à colonização de *E. coli* em frangos. Alves (2005) relatou uma associação entre lesões de celulite e lesões graves na bolsa de Fabrício. As aves com celulite apresentaram o menor diâmetro da bolsa, sugerindo que a imunossupressão decorrente de lesões na bolsa de Fabrício favoreceria a lesões de celulite.

2.2.2 Aspectos macroscópicos

As lesões de celulite observadas nos matadouros podem apresentar diferentes diâmetros variando de um a dez centímetros (MESSIER et al., 1993; SILVA; MOTA, 2003, VIEIRA, 2006).

Macroscopicamente observa-se o aumento na espessura e mudança de coloração da pele, que varia do amarelo-brilhante ao marrom-avermelhado. Ao corte há a formação de uma placa amarelada que pode variar de fibrinopurulenta a fibrinocaseosa, edema subcutâneo e hemorragias musculares (ALVES, 2005; ANDRADE, 2005; BERCHIERI; MACARI, 2000; BRITO, 2002; JEFFREY; CHIN; SINGER, 1999; MESSIER et al., 1993; NORTON, 1997; NORTON; MACKLIN, McMURTREY, 1999; ONDERKA et al., 1997; VIEIRA, 2006).

As lesões podem ser classificadas como leves, moderadas, severas e crônicas de acordo com a evolução de descoloração da pele, características das manchas e do material fibrinoso, presença de exudato e sangue no tecido subcutâneo abaixo das lesões (SILVA; MOTA, 2003). Em casos mais severos, a pele pode apresentar-se extremamente espessada com alterações denominadas “pele do tipo favo de mel” (RANDALL et al., 1984). Algumas carcaças podem apresentar lesões crônicas, localizadas e bem demarcadas, contudo outras carcaças podem exibir lesões extensivas e purulentas, que se alastram pelo abdômen e músculos do peito (BOULIANNE, 1999).

Relato de celulite em perus comerciais foi feito por Carr et al. (1996), em que a maioria dos animais afetados apresentavam acúmulo de líquido gelatinoso no tecido subcutâneo da cauda e do peito, presença de vesículas, além da musculatura adjacente escura e com petéquias, sendo isolado *Clostridium perfringens* tipo A.

2.2.3 Aspectos microscópicos

Microscopicamente, há inflamação do tecido subcutâneo formando massa constituída de restos celulares necróticos e bandas de fibrina, circundadas por cápsula de tecido conjuntivo contendo heterófilos, linfócitos e macrófagos, podendo haver formação granulomatosa, e em alguns casos envolvimento do folículo plumoso (ALVES, 2005; ANDRADE, 2005; FALLAVENA, 2000; MESSIER et al., 1993; ONDERKA et al., 1997, VIEIRA, 2006).

A formação granulomatosa é caracterizada por uma fina camada de células epitelióides e células gigantes multinucleadas, além de poucas células mononucleares entremeadas com fibroblastos e fibras colágenas, podendo haver focos de bastonetes Gram negativos envoltos por um acúmulo de exsudato fibrino-caseoso (ANDRADE, 2005; MESSIER et al., 1993; PEIGHAMBARI et al., 1995b, VIEIRA 2006). Nota-se moderada hiperqueratose e hiperplasia da epiderme, com áreas de ulceração focal, espessamento da derme associada à neovascularização e congestão dos capilares subcutâneos (ANDRADE, 2005; MESSIER et al., 1993; ONDERKA et al., 1997; PEIGHAMBARI et al., 1995b).

2.3 *Escherichia coli*

A *E. coli* é um dos diversos microrganismos anaeróbios facultativos que fazem parte da microbiota intestinal dos animais homeotérmicos (FRANCO; LANDERGRAF, 1996; HOLT et al., 1994; MENG; FENG; DOYLE, 2001), sendo considerado um patógeno oportunista de interesse nas indústrias de alimentos (VARNAN; EVANS, 1996)

Pertence a família *Enterobacteriaceae* cujos membros se caracterizam por serem bacilos Gram negativos, não esporulados, capazes de fermentar a glicose com produção de ácido e gás. Possuem motilidade quando apresentam flagelos peritríquios ou podem ser imóveis. São facultativamente anaeróbicos, possuindo o metabolismo oxidativo e fermentativo. A maioria das espécies cresce a uma temperatura de 37⁰C (HOLT et al., 1994).

O gênero *Escherichia* é bioquimicamente capaz de utilizar em seu metabolismo a glicose e outros carboidratos com produção de ácido, e em algumas espécies observa-se também a produção de gás. São negativas para a prova de

oxidase, citrato de simmons, urease, produção de sulfeto, Voges-Proskauer e fenilalanina desaminase. Sendo positivas no teste do vermelho de metila, indol, catalase e redução do nitrato. Todas as estirpes de *E. coli* são O-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo positivas (BARNES; VAILLANCOUT; GROSS, 2003; HOLT et al., 1994). São lisina positivos, porém apresentam variação na descarboxilação da ornitina (BARNES; VAILLANCOUT; GROSS, 2003).

Apesar da maioria das estirpes de *E. coli* fermentarem a lactose, estirpes negativas para esta prova podem ser ocasionalmente encontradas (BARNES; VAILLANCOUT; GROSS, 2003). Em meio Agar eosina azul de metileno são visualizadas como colônias verdes com brilho metálico e centro preto-azulado e em Agar MacConkey são avermelhadas (MERCK, 1994).

Falha ao fermentar o sorbitol é uma propriedade frequentemente comum nos sorovares de *E. coli* O157:H7, podendo ser observada concomitantemente falha em produzir β -glucoronidase. Tais comportamentos são descritos como raros de serem identificados em outros sorogrupos (VARNAN; EVANS, 1996).

Algumas estirpes de *E. coli*, senão todas, crescem entre 4-5°C, e possivelmente em temperaturas menores (VARNAN; EVANS, 1996). São capazes de sobreviver por tempo prolongado em alimentos congelados. Por exemplo, o sorotipo O157:H7 sobrevive acima de nove meses à -20°C em carne bovina moída (DOYLE; SCHOENI, 1987). Temperatura entre 60°C e 70°C por um tempo de 30 minutos inativa a maioria das estirpes (HIM-ATHONGKHAM et al., 2000).

A reprodução de grande parte das estirpes é inibida por pH menor que 4,5 ou maior que 9,0, porém este pH extremo não é capaz de destruir a bactéria. Ácidos orgânicos são mais efetivos do que ácidos inorgânicos na inibição do crescimento. Da mesma forma, concentração de sal a 8,5% previne o crescimento bacteriano, mas não inativa o microrganismo (BELL; KYRIAKIDES¹, 1998 apud BARNES; VAILLANCOUT; GROSS, 2003).

A célula bacteriana é composta de estruturas antigênicas que contribuem para a caracterização dos sorogrupos de *E. coli*, baseados na identificação de antígenos somáticos "O", relacionados a polissacarídeos da membrana externa; antígenos flagelares "H", relacionados a proteínas dos flagelos; antígenos capsulares "K", relacionados com polissacarídeos capsulares (FRANCO;

¹ BELL, C.; KYRIAKIDES, A. *E. coli a Pratical Approach to the Organism and its Control in food*. London: Blackie Academic & Professional, 1998, 200p.

LANDGRAF, 1996) e antígenos fimbriais “F”, importantes no processo de aderência e colonização do hospedeiro (FERREIRA; KNOBL, 2009).

O antígeno “O” identifica o sorogrupo da cepa enquanto que a combinação do antígeno “O” com o antígeno “H” irá identificar o sorotipo (MENG; FENG; DOYLE, 2001).

O antígeno “O” é caracterizado por ser uma endotoxina termoestável, liberado durante a fase de multiplicação ou após a morte bacteriana. O “H” não possui relação com a patogenicidade bacteriana e pode ser destruído pelo aquecimento a 100°C. O antígeno “K” é um ácido polimérico contendo 2% de açúcares reduzidos. A presença do ácido N-acetil neuramínico na cápsula está relacionada à resistência da bactéria aos efeitos bactericidas causados pelo sistema complemento. Este antígeno pode ser removido pelo aquecimento a 100°C por cerca de uma hora, embora algumas amostras necessitem de aquecimento a 121°C por duas horas e meia. A presença de antígeno capsular K1 tem sido relacionada com a patogenicidade de amostras de origem aviária, associada à septicemia em humanos e outros animais (FERREIRA; KNOBL, 2009). As fímbrias são apêndices filamentosos presentes na superfície celular em número de 1000 por célula (EISENSTEIN, 1987).

Nas estirpes de *E. coli* a virulência está associada às variedades cromossomais e genes plasmidiais que codificam variedade de pili, fatores de aderência intestinal, flagelos, antígenos capsulares, enterotoxinas termolábeis e termoestáveis, entero-hemolisinas, produção de colicina, presença de aerobactina, resistência sérica, entre outros, sendo esses fatores de virulência importantes indicadores de patogenicidade (EWERS et al., 2004; LA RAGIONE; WOODWARD, 2002; NATARO; STEINER; GUERRANT, 1998; ROCHA et al., 2002).

Com base nos fatores de virulência da *E. coli*, nas manifestações clínicas e epidemiologia do hospedeiro, as linhagens de *E. coli* consideradas patogênicas são atualmente agrupadas em “enteropathogenic” *E. coli* (EPEC); “enteroinvasive” *E. coli* (EIEC); “enterotoxigenic” *E. coli* (ETEC); “enterohaemorrhagic” *E. coli* (EHEC); “enteroaggregative” *E. coli* (EAggEC), “facultative enteropathogenic” *E. coli* (FEEC) (FRANCO; LANDGRAF, 1996) e “diffusely adherent” *E. coli* (DAEC) (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

A designação de EHEC foi inicialmente empregada para estirpes de *E. coli* pertencentes ao sorotipo O157:H7, implicadas como agente etiológico da colite hemorrágica. Esta por sua vez pode evoluir para uma doença grave denominada de

Síndrome urêmica hemolítica (FRANCO; LANDGRAF, 1996), compreendendo assim uma grave enfermidade transmitida por alimentos. A EHEC tem emergido como a maior causa de doenças transmitidas por alimentos provocando enfermidades em humanos. O mecanismo de patogenicidade está relacionado com a produção de citotoxinas (verotoxinas), uma vez que a sua atividade biológica pode ser observada em cultura de células Vero, originárias de rim de macaco (FRANCO; LANDGRAF, 1996; MENG; FENG; DOYLE, 2001). Estirpes de *E. coli* que portam o gene *stx* (verotoxinas *stx1* e/ou *stx 2*) ou elaboram *stx* são referidas como “Shiga toxin-producing” *Escherichia coli* (STEC). Essas citotoxinas são também denominadas de *shiga-like*, visto que são semelhantes à toxina produzida pelo bacilo de Shiga (*Shigella dysenteriae* tipo 1), causador da disenteria bacilar (FRANCO; LANDGRAF, 1996).

Algumas estirpes de *E. coli* são incriminadas por causar infecções extraintestinais (“Extraintestinal Pathogenic” *Escherichia coli* - ExPEC). Estas agrupam as estirpes de “Urophatogenic” *E. coli* (UPEC) que determinam infecções no trato urinário em humanos e “Avian Pathogenic” *E. coli* (APEC), que causam infecções respiratórias, pericardite e septicemia em aves (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

ExPEC com padrões similares de resistência a antimicrobianos foram isoladas de diferentes tecidos animais e de humanos com infecções extraintestinais, havendo a possibilidade de que a infecção do trato urinário em humanos seja causada por estirpes de UPEC resistentes a antimicrobianos que tiveram sua origem a partir de estirpes de animais (MAYNARD et al., 2004; RAMCHANDANI et al., 2005). Somando-se a isso, clones de *E. coli* estreitamente relacionados foram recuperados de sangue e meningite em humanos e frangos com colibacilose (MOULIN-SCHOULEUR et al, 2006).

Isolados de *E.coli* provenientes de animais e de humanos apresentam uma grande diversidade de patótipos, com muitos genes comuns, sugerindo a possibilidade de trocas genéticas entre as estirpes e à probabilidade do surgimento de patógenos emergentes (KUHNERT; BOERLIN; FREY, 2000). Além disso, muitas bactérias evoluem por transferência horizontal o que facilita sua adaptação em novos ambientes e contribui para a aquisição de fatores de virulência envolvidos diretamente em infecções (DAM; DAS, 2006). A presença de fatores de virulência

compartilhados entre as cepas humanas e de animais sugere que esses organismos são patógenos de caráter zoonótico (FERNANDEZ-BERO et al., 1990).

Seres humanos podem obter *E. coli* resistente a antimicrobianos ou genes resistentes oriundos de animais por contato direto com animais, por via alimentar ou através do ambiente. As bactérias podem se instalar e promover a colonização do hospedeiro ou transferir genes de resistência durante a passagem através do trato gastrointestinal. Embora a presença de *E. coli* resistente a antimicrobianos no intestino não seja um perigo em potencial para a saúde humana as cepas podem dar origem a uma infecção bacteriana com opções limitadas de tratamento, correndo o risco do tratamento falhar (HAMMERUM; HEUER, 2009). Somando-se a isso, animais de produção têm sido considerados como principais fontes de integrons cerreadores de genes resistentes a antimicrobianos, servindo de fonte de transferência de resistência não só para estirpes de *E. coli*, como para outras espécies bacterianas, promovendo mudança na prevalência de resistência de infecções humanas em diferentes partes do mundo (AJIBOYE et al., 2009).

2.3.1 APEC e sua importância para Saúde Coletiva

A *E. coli* é incriminada por uma variedade de doenças nas aves, incluindo infecção do trato respiratório, onfalite, síndrome da cabeça inchada, enterite, septicemia e celulite. Estas doenças são responsáveis por uma maior perda econômica na indústria aviária (LA RAGIONE; WOODWARD, 2002; RANDALL et al., 1984), podendo acometer galinhas, perus e outras espécies aviárias (DHO-MOULIN; FAIRBROTHER, 1999).

Alguns clones de APEC podem ser específicos em casos de celulite, mas, muitas vezes, são idênticos a outras estirpes de *E. coli* aviárias patogênicas (NGELEKA et al., 1996).

Dos sorogrupos descritos como causadores de enfermidades em aves, alguns pertencem à categoria EPEC (O111 e O18), ETEC (O8, O20, O78 e O115) e EHEC (O111) (VARNAN; EVANS, 1996). Os sorogrupos O1, O2, O8 e O25 foram descritos relacionados a infecções urinárias em humanos e animais (FERREIRA; KNOBL, 2009).

O isolamento de *E. coli* O157:H7 foi relatado pela primeira vez em carne de aves por Doyle e Schoeni (1987). Contudo, a prevalência da EHEC O157 em aves

tem sido considerada mínima quando comparada a prevalência em outras espécies animais (LA RAGIONE et al., 2005; STAVRIC, BUCHANAN, GLEESON, 1993).

Isolados de *E. coli* pertencente ao sorogrupo O157 foram identificados em duas aves com lesão de celulite de em um total de 102. Dessa forma, as aves podem servir como reservatório deste sorogrupo, apesar destes isolados não possuírem o antígeno flagelar H7 e não produzirem toxina (ONDERKA et al., 1997).

Em isolados de *E. coli* de frango, 12% das amostras foram positivas para *stx2*, e em isolados de peru, a positividade foi de 7% (SAMADPOUR et al., 1994). Das estirpes analisadas de frangos com septicemia, 29% estavam positivas para o gen *stx1*, 9,6% para o gen *stx2* e das amostras de celulite 32% foram positivas para o gen *stx1*, demonstrando que a seqüência genética do gen *stx1* está difundida entre APEC (PARREIRA; GYLES, 2002).

Estirpes de EPEC e ETEC, causadora de doença entérica em humanos, foram identificadas em galinhas aparentemente saudas. Essas estirpes da *E. coli* aviárias, com freqüência, possuem plasmídios que abrigam um grande número de genes responsáveis não só pelo aumento da virulência das cepas de *E. coli*, mas também pelo aumento da resistência das bactérias a vários antimicrobianos (DOETKOTT et al., 1996; KARIUKI et al., 2002; STEHLING et al., 2003).

Estudando estirpes do sorogrupo O2 e O78, causadoras de septicemia em humanos e aves, Mokady, Uri-Gophna e Ron (2005) relataram que essas estirpes poderiam variar muito em seu conteúdo genômico pela presença de plasmídeos, fagos e elementos transplantáveis, indicando que esta “mistura-e-combinação” seria uma estratégia evolutiva para a espécie, que poderiam colonizar diferentes hospedeiros, determinando um alto grau de risco zoonótico.

Com relação ao sorogrupo O1, Johnson et al. (2007a) demonstraram que o sorogrupo de APEC e de UPEC apresentam 95,5% do genoma idênticos, evidenciando que algumas ExPEC humanas e aviárias são altamente similares. Além disso, estirpes de UPEC e APEC possuem muitos traços associados à virulência como adesinas, sistemas de aquisição de ferro, toxinas, sistemas de proteção e invasibilidade que permitem crescer e causar doenças no hospedeiro (KARIYAWASAM; SCACCIANOCE; NOLAN, 2007; RODRIGUEZ-SIEK et al., 2005). Neste contexto, o fenômeno de aquisição de virulência pode ocorrer, inclusive, através da conjugação entre amostras patogênicas e comensais (SKYBERG et al., 2003) e entre bactérias de espécies diferentes (TRABULSI; TOLEDO, 1991),

Com o conhecimento da genética microbiana, entende-se que os fatores podem ser trocados entre as estirpes presentes na microbiota das aves e na humana por mecanismos de recombinação, possibilitando o aparecimento de amostras resistentes a vários antimicrobianos. Estirpes de *E.coli* que frequentemente apresentam resistência a um ou mais antimicrobianos de relevante importância clínica podem ser isoladas de fragmentos de carne, particularmente de frango, fornecendo evidências de que esses alimentos serviriam como reservatórios importantes de *E.coli* resistente a antimicrobianos, representando um importante veículo de disseminação de patógenos e servindo de reservatório de genes plasmidiais e genes resistentes que podem ser transferidos para a microbiota humana (JOHNSON et al., 2003; 2005a; 2005b; 2006; 2007b; SKYBERG et al., 2006; VINCENTE et al., 2010; WARREN et al., 2008).

2.3.2 Fatores de virulência em APEC

O conceito de patogenicidade das amostras de *E. coli* está relacionado com o impacto acumulativo de um ou vários fatores de virulência identificados em estirpes isoladas de aves com colibacilose que podem ser transferidos através de plasmídeos. Esses fatores de virulência têm sido utilizados para diferenciar amostras patogênicas de não patogênicas. Podem ser constituídos por componentes lipopolissacarídicos (LPS) da estrutura bacteriana (endotoxinas), diferentes cito ou exotoxinas (hemolisinas, verotoxinas, enterotoxinas), representados por propriedades que permitem a multiplicação em meios com restrição de ferro (sideróforos), além da multirresistência aos antimicrobianos, ou colonização celular (pili, adesinas ou fímbrias) (JOHNSON, 1991; TORTORA; FUNKE; CASE, 2003).

Os mecanismos de virulência da APEC têm sido continuamente estudados e os mais frequentemente mencionados são: a capacidade de adesão (*pap* e *felA*), a presença de aerobactina (*iut*), produção de colicina (*cva*), a resistência sérica (*iss*), flagelos, antígenos capsulares (*kps*) e hemaglutinina temperatura sensível (*tsh*) (EWERS et al., 2004; LA RAGIONE; WOODWARD, 2002; ROCHA et al., 2002).

A adesão da bactéria a superfície celular é o primeiro passo para a instalação do processo infeccioso (DHO-MOULIN; FAIRBROTHER, 1999). Através da

produção de estruturas de superfície, as *E. coli* patogênicas são capazes de se aderir às células e crescer em sua superfície (ALLAN, 1997).

De acordo com Tortora, Funke e Case (2003), alguns microbiologistas usam o termo pili e fímbrias como sinônimos, porém essas estruturas apresentam funções diferentes. As fímbrias podem estar nos pólos das células bacterianas ou homogeneamente distribuída em toda a superfície celular, permitindo que a célula bacteriana se fixe a outras células, auxiliando na colonização do hospedeiro. Os pili, são estruturas que se unem às células de outras bactérias para transferência de DNA e normalmente são mais longos que as fímbrias, existindo apenas um ou dois por célula.

As técnicas para a caracterização das fímbrias ou adesinas baseiam-se na capacidade de aglutinar hemácias, podendo ser classificadas em fímbrias que têm sua aglutinação inibida pela D-manose (manose sensíveis, ou fímbria tipo I) e as que não têm a aglutinação inibida pela manose (manose resistentes) (LIOR, 1994).

A fímbria P, inicialmente encontrada em amostras de *E. coli* associadas a infecções do trato urinário de humanos (KALLENIOUS et al., 1980). Essa fímbria é codificada por um conjunto de 11 genes cromossômicos denominados "operon" *pap* (LATHAM; STAMM, 1984). O gene *papC* é uma subunidade do heteropolímero cromossomal que codificam a fímbria P, que é uma adesina D-manose resistente.

A função da fímbria P na virulência de amostras APEC ainda não está esclarecida. Em estirpes de *E. coli* isoladas de celulite Brito, Gaziri e Vidotto (2003) constataram a presença do gene *papC* em 19,6%, Gomis et al., (2001) em 37,1%, Ngeleka et al., (1996) em 51% e Ngeleka et al., (2002) em 25%. Em amostras isoladas de fezes Negeleka et al., (2002) encontraram o gene em 13% enquanto Brito, Gaziri e Vidotto (2003) caracterizaram ausência deste gene nas amostras por eles estudadas.

Uma variante sorológica da fímbria P (F11) é codificada pelo operon *felA* (DE REE; SCHWILLENS; VAN DEN BOSCH, 1985), que apresenta atividade hemaglutinante em eritrócitos de ovinos e humanos na presença de D-manose. Brito, Gaziri e Vidotto (2003) obtiveram 19% de amostras de celulite positivas para o *felA* enquanto em nenhuma das amostras de fezes o gene foi encontrado. Em amostras de colisepticemia Delicato et al., (2003) obtiveram 12%, enquanto Rodriguez-Siek et al (2005) encontraram 78% de positividade.

A adesina fimbrial curli está relacionada à adesão de linhagens de APEC. Embora a função dessas fímbrias ainda não esteja elucidada, acredita-se que possam estar relacionadas à adesão bacteriana e à colonização nos estágios iniciais da infecção (OLSEN; JONSSON; NORMARK, 1989).

A resistência sérica tem sido associada com a capacidade da *E. coli* resistir ao sistema imune do hospedeiro, produzindo infecções generalizadas em frangos e infecções extra-intestinais em outras espécies (ALLAN, 1997; NGELEKA et al., 1996).

A expressão de adesinas, a produção de sideróforos (aerobactina) e a capacidade de resistir à ação microbicida do soro têm sido consideradas fundamentais para a patogenia da colibacilose, por conferir resistência aos componentes do sistema complemento e a capacidade de seqüestrar íon ferro da corrente sanguínea e dos tecidos hospedeiros (FERREIRA; KNOBL, 2009).

A capacidade de um patógeno invadir e se multiplicar é influenciada pela disponibilidade de ferro, essencial para o crescimento de todas as células vivas. A *E. coli* utiliza o ferro no transporte de oxigênio, síntese de DNA, transporte de elétrons e no metabolismo do peróxido (NEILANDS; BINDERREIF; MONTGOMERIE, 1985) Apesar do ferro ser encontrado em abundância nos tecidos e fluidos corporais este metal permanece ligado a glicoproteínas ou na forma insolúvel. A bactéria, por sua vez, possui sistemas especiais os quais capta o ferro via sideróforos (Neilands, 1981).

Os genes *fyuA* (“ferric yersiniabactin uptake”) e *irp-2* (“iron repressible protein”) que codificam proteínas envolvidas na aquisição de ferro (KARCH et al., 1999; PELLUDAT et al., 1998) foram encontradas com alta frequência em linhagens de APEC (GOPHNA et al., 2001; JANBEN et al., 2001), assim como os genes *iucA* requerido na síntese e o gene *fepC* responsável pelo transporte de sideróforos (OKEKE et al., 2004).

A aerobactina é um sideróforo utilizado pela *E. coli* para captação e transporte de ferro (BRAUN, 2003; ROHRBACH; BRAUN; KOSTER, 1995), apresentando um significado importante na patogenicidade da *E. coli* para colonização do intestino e outros organismos tecidos (ALLAN, 1997) e no desenvolvimento da celulite, visto que o íon ferro é altamente restrito no tecido subcutâneo (PEIGHAMBARI et al., 1995a).

Os cinco genes da biossíntese da aerobactina são denominados *iucA*, *iucB*, *iucC* e *iucD* e estão arrançados em um único operon. Esses genes têm sido encontrados em plasmídios que também codificam a resistência a certos antimicrobianos como os plasmídios R e em plasmídios ColV (GOES; GAZIRI; VIDOTTO, 1993; VIDOTTO et al., 1991).

Peighambari et al., (1995a) encontraram aerobactina em 90% dos isolados de celulite e 16% dos isolados de fezes. Em estudos posteriores realizados para presença de aerobactina em estirpes de *E. coli* oriundas de celulite Ngeleka et al (1996) obtiveram 82% de positividade, Gomis et al (2001) 46,8%, Jeffrey et al (2002) 92%.

Proteínas de membranas externas reguladoras de ferro do inglês “Iron Regulated Outer Membrane Protein” (IROMPS) são estruturas expressas por algumas bactérias em condições de baixas concentrações de ferro, possibilitando a captura de ferro dos sideróforos de outras bactérias ou fungos (NORTON, 1997). Ngeleka et al (1996) reportaram que *E. coli* derivada de celulite apresentaram de duas a cinco IROMPS quando desafiadas em condições de concentração baixa de ferro.

As colicinas são substâncias relacionadas à resistência sérica, produzidas por linhagens de *E. coli* com a função de inibir o crescimento de outras linhagens da mesma espécie ou espécies relacionadas, sendo classificadas em tipo V, A, B, Ia, Ib, Ic, K, N, E1, E2, E3 e DF13 (LIOR, 1994). São encontradas principalmente em bactérias virulentas relacionadas a infecções extra-intestinais em humanos e animais (JEFFREY et al., 2002).

A expressão de colicina V foi demonstrada por Peighambari et al (1995a) em 85% dos isolados de celulite e em 40% isolados de fezes. Enquanto Brito, Gaziri e Vidotto (2003) verificaram a presença do gene responsável pela produção de colicina (*cvaC*) em 48% das amostras de celulite e em 33% das amostras de fezes. Em estudos posteriores realizados em estirpes de *E. coli* oriundas de celulite Ngeleka et al (1996) obtiveram 92% das amostras colicina positivas. Em estirpes aviárias patogênicas, Blanco et al (1997) detectaram a colicina em 73% dos isolados de *E. coli* e em 58% estirpes de origem fecal.

O gene *iss*, codificador da proteína Iss, confere à bactéria resistência ao soro do hospedeiro, através do bloqueio do sistema complemento que atua na membrana celular causando a lise da célula bacteriana (BINNS, MAYDEN, LEVINE, 1982).

Portanto, a presença do gene *iss* é um determinante genético capaz de intervir na resistência da bactéria aos efeitos bactericidas do soro do hospedeiro.

A expressão do gene foi observada aumentando em 20 vezes capacidade de resistência das células bacterianas aos efeitos do soro (CHUBA; PALCHAUDHURI; LEON, 1986), servindo como marcador de virulência de estirpes patogênicas, uma vez que a expressão desse gene frequentemente prediz seus efeitos patogênicos (GIBBS et al., 2003; NOLAN et al., 2002). Porém, a ausência do gene *iss* não assegura falta de virulência da *E. coli* (FOLEY et al., 2000; PFAFF-MCDONOUGH et al., 2000).

O gene *iss* foi identificado inicialmente em plasmídeos como CoIV-I-K94 (BINNS; DAVIES; HARDY, 1979). Posteriormente, Tivendale et al. (2004) descreveram a presença desse gene em um plasmídio denominado de pMV01 (160kb) e Johnson et al. (2006) em um plasmídio denominado de CoIV. Podem estar localizados, ainda, em outros plasmídeos como o plasmídio conjugativo R que carrega juntamente com o gene *iss*, outros genes de virulência e de resistência a antimicrobianos. Este plasmídio, por sua vez, pode ser transferido por conjugação para outras estirpes de *E. coli* ou outras bactérias, inclusive avirulentas (JOHNSON; SKYBERG; NOLAN, 2004; JOHNSON et al., 2002).

Em amostras isoladas de celulite Ngeleka et al. (1996) verificaram que 71% das cepas expressaram resistência ao complemento enquanto as amostras estudadas por Gomis et al. (2000) apresentaram positividade de 88%. Brito, Gaziri e Vidotto (2003) descreveram a presença do gene em 83% das *E. coli* isoladas de celulite em contraste com nenhuma positividade em isolados fecais.

A presença do gene *iss* em amostras isoladas de aves com colisepticemia ainda foi relatado por McPeake et al. (2005) 72,8%, Pfaff-McDonough et al. (2000) 77%, Rodriguez-Siek et al. (2005) 81,5% e Delicato et al. (2003) 38,5%.

A cápsula é uma estrutura formada por polissacarídeos, polipeptídeos ou ambas. Em sua maioria, essas estruturas são produzidas no interior da célula bacteriana e secretadas a superfície celular. A cápsula está fortemente aderida à parede celular bacteriana, protegendo as bactérias contra fagocitose, podendo ser encontrada em algumas linhagens de *E. coli*. (TORTORA; FUNKE; CASE, 2003).

A produção de hemolisina e a presença do gene "*hly*" não é um fator importante na determinação da colibacilose aviária, uma vez que essa característica não pode ser identificada em estirpes de *E. coli* isoladas de celulite (GOMIS et al.,

2001; NGELEKA et al., 1996) . McPeake, Smyth e Ball (2005) demonstraram que 46,7% das *E. coli* oriundas de aves saudáveis apresentaram o gene determinante de hemolisina em comparação a 6,1% das amostras septicêmicas.

O gene “temperature-sensitive haemagglutinin” (*tsh*) codifica uma proteína (Tsh) envolvida na proteólise de IgA humana e IgA de galinha (STATHOPOULOS et al., 1999). Delicato et al (2002) encontraram o gene em 39,5% das amostras isoladas de aves com colissepticemia, em 10% das amostras de aves com celulite e em apenas 3,8% de estirpes oriundas de amostras fecais. No entanto, McPeake, Smyth e Ball (2005) que identificaram o gen *tsh* em 97,4% das *E. coli* isoladas de aves com colissepticemia e em 95,6% das *E. coli* isoladas de fezes de aves saudáveis. Embora haja divergências sobre a importância da hemaglutinina temperatura-sensível (gene *tsh*), a identificação deste fator de virulência tem sido frequentemente descrita como importante no mecanismo de patogenicidade da colibacilose aviária (PROVENCE; CURTISS, 1994).

2.3.3 *E. coli* e celulite aviária

Vários sorogrupos estão envolvidos na determinação das lesões de celulite, porém o sorotipo mais frequentemente encontrado tem sido o O78 (ALLAN, 1997; GOMIS et al., 2000; 2001; MESSIER et al., 1993), embora outros sorogrupos como o O1, O2 (ALLAN, 1997; GOMIS et al., 1997b; 2000; 2001), O85, O88 (GOMIS et al., 2000) O115, O21, O83 (PEIGHAMBARI et al., 1995b) e O25 (NGELEKA et al., 1996) possam ser isolados, contudo a maior parte dos sorogrupos não possa ser tipificado (ALLAN, 1997; GOMIS et al., 2000, 2001; NGELEKA et al., 1996).

As aves condenadas por celulite apresentaram uma combinação com outras lesões em coração, sacos aéreos, ossos, articulações e/ou fígado, sendo a *E. coli* isolada em pelo menos um órgão com lesão grave além da celulite na maioria dos casos. Estirpes de *E. coli* seriam capazes de causar lesões múltiplas, comprovado pelo isolamento do mesmo sorogrupo em ambas as lesões (GOMIS et al., 1997b).

A *E. coli* pode ser isolada do pericárdio e dos sacos aéreos de aves sem lesões graves ou ainda não ser isolada de lesões macroscopicamente graves. No primeiro caso, é possível que *E. coli* esteja presente nestes locais com recentes estágios de infecção sem que tenham determinado a ocorrência de lesões macroscópicas. Por outro lado, a ausência de *E. coli* em lesões graves sugere a

capacidade que as aves têm de eliminar completamente a infecção (GOMIS et al., 1997b; 2000).

Diferentes sorogrupos podem ser isolados de lesões de celulite e de outro tecido o que propõe que as aves com celulite são mais susceptíveis ao desenvolvimento de colissepticemia devido ao estresse causado pela presença da enfermidade ou vice-versa (GOMIS et al., 1997b; 2000).

Aves com celulite e outras lesões sistêmicas decorrentes de *E. coli* são visualmente menores quando comparados com outras aves sem a lesão de celulite (GOMIS et al., 1997a; 1997b; 2001; ONDERKA et al., 1997; PEIGHAMBARI et al., 1995a).

Gomis et al. (1997a) reproduziram experimentalmente lesões de celulite em frangos através da inoculação de solução salina contendo sorogrupo O78. Os autores observaram que a maioria das aves (75%-77%) desenvolveu lesões de celulite associadas a outras infecções sistêmicas. Em 27% dos casos a *E. coli* pode ser novamente isolada de lesões de pericardite e aerossaculite. Resultados semelhantes foram obtidos por Jeffrey, Chin e Singer (1999). Estes autores demonstraram, ainda, que algumas estirpes de *E. coli* que provocaram o desenvolvimento de celulite em grau leve foram capazes provocar lesões internas severas, determinando inclusive a morte de algumas aves.

De acordo com Jeffrey, Chin e Singer (1999), Messier et al. (1993) e Peighambari et al. (1995b), o sorogrupo O78 é o mais patogênico, capaz de produzir lesões de celulite severas, acompanhadas ou não de lesões internas.

Quando desafiadas em infecções experimentais, estirpes de *E. coli* isoladas de celulite causam alta incidência de celulite associada à septicemia em comparação com estirpes obtidas de infecção do saco vitelínico, de infecção no pulmão e de origem entérica. E, apesar de estirpes de origem entérica levar ao desenvolvimento de lesões de celulite de origem entérica, estas desaparecem após uma semana (BRITO; GAZIRI; VIDOTTO, 2003; NORTHON; MACKLIN; MCMURTREY, 2000).

Clones virulentos de *E. coli* podem distribuírem-se de forma endêmica nas regiões avícolas, visto que grupos isolados de diferentes propriedades apresentaram alta homologia e similaridade de 100% (BRITO; GAZIRI; VIDOTTO, 2003).

Brito, Gaziri e Vidotto (2003), Gomis et al. (2001) e Jeffrey et al. (2002) não identificaram em seus estudos fatores de virulência específicos de *E. coli*

causadoras de celulite ou *E. coli* causadores de colissepticemia, sugerindo que essas estirpes possuem mecanismos de virulência similares.

A presença de *E. coli* nas lesões de celulite favorece a contaminação cruzada nas linhas de processamento de frangos quando estas são expostas (GOMIS et al., 2001). Além disso, estirpes que colonizam o trato intestinal de frangos podem ser transmitidas aos humanos, visto que estas já foram isoladas de amostras fecais de pessoas as quais mantêm contato direto com as cepas (OJENIYI, 1989).

Apesar de não existirem relatos de *E. coli* isoladas de lesões de celulite causando doenças em humanos, através da análise molecular das estirpes têm sido evidenciado que *E. coli* isoladas de lesões de celulite estão diretamente relacionadas com aquelas responsáveis por causar septicemia e meningite em humanos. Além disso, as habilidades em adquirir fatores de virulência por transferência genética devem ser consideradas (KUMOR et al., 1998; NGELEKA et al., 1996).

2.3.4 Genotipagem de *E. coli* pela RAPD

O uso da “Polymerase Chain Reaction” (PCR) na rotina de diagnósticos é uma ferramenta para detecção de organismos infecciosos através da amplificação de um segmento específico do genoma do agente. Essa técnica permite a identificação dos genes correspondentes aos fatores de virulência que auxiliam na compreensão dos mecanismos de patogenicidade da *E. coli* (EWERS et al., 2005), além de permitir a discriminação bacteriana através da análise molecular do polimorfismo microbiano. Baseado nos princípios da PCR, o avanço da tipagem molecular dos microrganismos foi facilitado, surgindo várias técnicas entre as quais podemos citar: “Restriction Fragment Length Polymorphism” (RFLP) (MAURER et al., 1998), ribotipagem (VOGEL et al., 2000), “Multilocus Sequence Typing” (MLST) (BANDO; TRABULSI; MOREIRA-FILHO, 2007), “Pulsed-field gel electrophoresis” (PFGE) (RADU et al., 2000), “Variable Number Tandem Repeat” (VNTR) (KEYS; KEMPER; KEIM, 2005; KAWAMORI et al., 2008) e “Random Amplified Polymorphic DNA” (RAPD-PCR). O princípio da técnica de RAPD baseia-se no fato de diferentes indivíduos produzirem diferentes perfis de fragmentos de amplificação. Apesar dessa técnica apresentar algumas limitações por serem influenciadas por exemplo pelos lotes dos reagentes usados, é considerada uma técnica relativamente mais fácil e

rápida de ser reproduzida. Além disso, os fragmentos produzidos pela amplificação do DNA genômico com *primers* aleatórios tem permitido a identificação de segmentos específicos do DNA, diferenciando assim os perfis genotípicos (BORÉM; dos SANTOS, 2002). Esta técnica tem sido considerada eficiente e adequada para a tipagem molecular de *E. coli* (SAHILAH et al., 2010), capaz de discriminar o perfil filogenético de estirpes de origem humana (VOGEL et al., 2000) e de animais (CHANSIRIPORCHAI et al., 2001; GOMES et al., 2005; SALEHI et al., 2008), também sendo de grande importância em estudos epidemiológicos e estudos de contaminação cruzada em alimentos (RADU et al., 2000; VOGEL et al., 2000; KANUNGO, 2009).

3 DESENVOLVIMENTO

3.1 ARTIGO 1 (A ser submetido à revista Brazilian Journal of Microbiology)

CARACTERÍSTICAS DE *Escherichia coli* PELA IDENTIFICAÇÃO DOS FATORES DE VIRULÊNCIA *iss e felA* EM CELULITE E MIÚDOS DE FRANGOS SOB INSPEÇÃO SANITÁRIA

THAÍS BADINI VIEIRA²; VIRGINIA LEO DE ALMEIDA PEREIRA²; ROBSON MAIA FRANCO³; ELMIRO ROSENDO DO NASCIMENTO²; RITA DE CASSIA FIGUEIRA SILVA¹; ROGÉRIO TORTELLY⁴

ABSTRACT - Brazil is the third largest chicken producer and first exporter of broiler meat. Skin lesions such as avian cellulitis are becoming increasingly frequent in large-scale production due to premises type and management of broilers, leading to total or partial condemnation at slaughter throughout the world. In this study, we used 51 carcass of broilers with typical lesions of cellulitis, diagnosed at Sanitary Inspection. Recovery of *Escherichia coli* strains from cellulitis lesions and offal (liver and heart) from studied broilers, established the septic characteristic of the isolates. These *E.coli* isolates were tested by Polymerase Chain Reaction (PCR) for

² Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária (doutorado), Área de Concentração: Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal da Faculdade de Veterinária Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, Brasil. Email: thais.badini@ig.com.br

² Departamento de Saúde Coletiva Veterinária e Saúde Pública da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, Brasil. E-mail: msv@vm.uff.br

³ Departamento de Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, Brasil. E-mail: mta@vm.uff.br

⁴ Departamento de Patologia e Clínica Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, Brasil. E-mail: mcv@vm.uff.br

the genes of virulence factors responsible for adhesion (F11 fimbria-*felA*) and serum resistance (*iss*). The cellulitis at inspection was characterized as skin ulcer, being eight with skin thickening, color changes tending to reddish-yellow, and irregular skin surface. At cutting, gelatinous fluid and yellowish patches were seen, in some cases, with involvement of the adjacent musculature. *E. coli* was isolated from 50 broilers, being 19, from cellulitis cases, 11 from cellulitis and liver, 5 from cellulitis and heart, 14, from cellulitis, liver and heart, and one only from liver and heart. *E. coli* isolates were recovered from 96% (48/50) of cellulitis, 52% (26/50) from liver and 40% (20/50) from the heart samples. There was no significant association between cellulitis lesion size and *E. coli* rate of recovery from cellulitis cases and offal (liver and heart) by chi-square test ($p > 0.05$). Of 190 *E. coli* isolates from the 51 studied broilers, 59.47% were positive for *iss* gene and 4.2% for the *felA* gene. The recovery of *E. coli* from cellulitis and offal strengthen the idea that the partial removal of cellulitis lesions at slaughter only minimizes the repulsive aspect of the carcass which turns out to be more aesthetic than hygienic, not contributing to poultry products safeness.

Keywords: colissepticemia; cellulitis; PCR; broiler.

RESUMO - O Brasil é o terceiro maior produtor mundial e o primeiro colocado nas exportações de carne de frango. As lesões cutâneas, como a celulite aviária, vêm se tornando cada vez mais freqüente em função da produção em larga escala, do tipo de criação e do manejo de frangos de corte e são consideradas como uma das maiores causas de condenações totais e parciais em todo o mundo. Para esta pesquisa, foram utilizados 51 carcaças de frangos de corte com lesões típicas de celulite identificadas pela Inspeção Sanitária. Foram isoladas estirpes de *Escherichia coli* das lesões de celulite e de miúdos (fígado e coração) dos frangos estudados, a fim de estabelecer o caráter séptico da lesão. Estas estirpes de *E. coli* foram testadas pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), para a presença de genes para fatores de virulência responsáveis pela capacidade de adesão (fimbria F11 - *felA*) e resistência sérica (*iss*). Na Inspeção, lesões de celulite caracterizaram-se por úlcera cutânea, sendo que oito delas havia espessamento de pele, alterações na coloração tendendo ao amarelo-avermelhado e irregularidade na superfície cutânea. Ao corte, notou-se presença de fluido gelatinoso e placas

amareladas destacáveis e em alguns casos foi visível o acometimento da musculatura adjacente. Foram recuperadas estirpes de *E. coli* em 96% (48/50) das lesões de celulite, em 52% (26/50) das amostras de fígado e em 40% (20/50) das de coração. *E. coli* foi isolada de 50 frangos. Em 19, a bactéria estava presente somente em lesões de celulite; em 11, nas lesões de celulite e no fígado; em 5, nas lesões de celulite e no coração; em 14, nas lesões de celulite, no fígado e no coração; e em uma, somente no fígado e no coração. Não houve significância pelo método de qui-quadrado ($p > 0,05$) ao correlacionar os tamanhos das lesões com o coeficiente de isolamento de *E. coli* em casos de celulite e celulite e miúdos (fígado e coração). Dos 190 isolados de *E. coli* provenientes dos 51 frangos estudados, 59,47% foram positivos para o gene *iss* e 4,2%, para o gene *felA*. O isolamento de *E. coli* de celulite e miúdos em frangos de corte fortalece a idéia de que a remoção parcial de lesões de celulite apenas minimiza o aspecto repugnante da carcaça, sendo mais estética do que higiênica, não contribuindo para eliminação da contaminação, que poderia se estender às linhas de produção.

Palavras-chave: colissepticemia; celulite; PCR; frango.

INTRODUÇÃO

A avicultura brasileira desenvolveu-se e modernizou-se rapidamente alcançando níveis elevados de produtividade nos últimos 30 anos e destacando-se por uma trajetória de incremento tecnológico expressivo, alavancada pela articulação entre os diferentes agentes que a compõe (Giroto & Miele, 2006). O Brasil é o terceiro maior produtor mundial e o primeiro colocado nas exportações de carne de frango (ABEF, 2009).

Em função da produção em larga escala, do tipo de criação e do manejo de frangos de corte, as lesões cutâneas, como a celulite, vêm se tornando cada vez mais frequentes, sendo uma das maiores causas de condenações totais e parciais em todo o mundo. De acordo com a Portaria nº 210 de 26/11/1998 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (Brasil,

1998) deverão sofrer condenação parcial, qualquer órgão ou partes de carcaça que estiverem afetados por um processo inflamatório, como a celulite, e condenação total de carcaça e vísceras quando houver a evidência de caráter sistêmico. A lesão de celulite é caracterizada pela formação de placas fibrinocaseosas no tecido subcutâneo profundo, oriundas de uma inflamação purulenta, aguda e difusa, localizando-se principalmente nas regiões de abdômen e sobrecoxa (Silva & Mota, 2003; Andrade, 2005; Vieira, 2006; Alves, 2007).

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

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

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

Não existem relatos de *E. coli* isoladas de lesões de celulite causando doenças em humanos, entretanto a análise genômica das estirpes tem mostrado que *E. coli* isoladas de

celulite estão geneticamente relacionadas às aquelas responsáveis por septicemia e meningite em humanos. Devem ser consideradas também as habilidades da *E. coli* em adquirir fatores de virulência por transferência, sugerindo a possibilidade de trocas genéticas entre elas e a probabilidade do surgimento de estirpes patogênicas emergentes (Ngeleka et al., 1996; Kumor et al., 1998; Kuhnert et al., 2000).

Avian Pathogenic Escherichia coli” (APEC) apresentam mecanismos de adaptação similares às “*Uropathogenic Escherichia coli* “ (UPEC), o que pode favorecer às APEC causarem doença extraintestinal em seres humanos (Rodriguez-Siek et al., 2005; Kariyawasam et al., 2007).

É possível que a infecção do trato urinário em humanos seja causada por cepas de UPEC resistentes a antimicrobianos, que tiveram sua origem a partir de estirpes de animais (Ramchandani et al., 2005; Hammerum & Heuer, 2009). Produtos derivados de frangos têm sido considerados potenciais fontes para contaminação de humanos por *E. coli* patogênica resistente a antimicrobianos (Jonhson et al., 2003) e, conforme Vicente et al. (2010), o principal reservatório de “*Extraintestinal Pathogenic Escherichia coli*” (ExPEC) causador de infecções extraintestinais em humanos. Adicionalmente, existem estudos que demonstraram que os métodos de limpeza empregados no ambiente doméstico frequentemente são ineficazes para eliminação de patógenos contaminantes de alimentos, aumentando a importância da contaminação cruzada (Cogan et al., 1999).

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

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

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

Objetivou-se neste objetivo isolar e identificar *E. coli* de lesões de celulite, coração e fígado de frangos de corte e identificar fatores de virulência de resistência sérica (*iss*) e fimbrial F11 (*fel A*), a fim de avaliar o potencial patogênico dos isolados e o caráter séptico da doença.

MATERIAL E MÉTODOS

Em matadouro de aves, 51 frangos de corte com idade entre 35 e 40 dias, apresentando lesões sugestivas de celulite, foram retirados da linha de abate após a depenagem durante a Inspeção Sanitária. A colheita de material foi realizada em cinco etapas durante cinco semanas seguidas, a partir da primeira semana de fevereiro de 2009. Em cada etapa amostra foram utilizadas dez aves, exceto na última na qual foi colhida amostras de onze aves. As aves utilizadas para a pesquisa foram encaminhadas ao Laboratório de Controle de Qualidade onde as lesões de celulite foram mensuradas, descritas macroscopicamente e registradas em fichas individuais. Foram colhidas amostras de pele e miúdos (coração e fígado) de cada frango de corte, com suabes estéreis para o exame microbiológico. O material foi acondicionado em tubo de ensaio contendo meio Cary e Blair, mantido refrigerado e transportado ao Laboratório de Controle Microbiológico de Produtos de Origem Animal – Universidade Federal Fluminense (UFF) para o isolamento e caracterização microbiana.

Os suabes foram retirados dos tubos com meio Cary e Blair e inoculados em tubos de ensaio esterilizados contendo 3,0 mL de caldo “Brain Heart Infusion” (BHI) e incubados a 37°C por 24 horas. Após esse período uma alíquota do caldo BHI foi semeada em ágar MacConkey e Agar Eosina Azul de Metileno (EMB) e as placas incubadas a 37°C por 24h, de acordo com a metodologia descrita por Quinn et al. (1994). Do crescimento no ágar MacConkey e no Agar EMB duas colônias foram selecionadas e inoculadas individualmente nos meios Sulfeto Indol Motilidade (SIM), Citrato (Difco), MILi (Motilidade Indol Lisina) (Toledo et al., 1982a) e meio de Rugai e Araújo modificado (EPM) (Toledo et al., 1982b). Os tubos foram incubados a 37°C por 24 horas para bioquímica presuntiva. Os cultivos considerados positivos no meio EPM foram inoculados em BHI contendo 20% de glicerol e estocados a -18°C para provas laboratoriais posteriores.

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

As amostras estocadas foram descongeladas e semeadas em caldo BHI e incubadas a 37°C durante 24 horas, para reativação. Foi utilizada como controle cultivo em caldo BHI de estirpe-padrão positiva para a presença do gene *iss* e uma estirpe-padrão positiva para o gene *felA* fornecidas pelo Dr. Sílvio Luís da Silveira Rocha do Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Foi utilizada a técnica de extração térmica do DNA (Rocha et al., 2008). Dos isolados de *Escherichia coli* semeados em caldo BHI foram retiradas alíquotas de 1,0 mL e acondicionadas em microtubos tipo “Eppendorf”, previamente esterilizados. Esse material foi centrifugado a 15000xg em centrífuga refrigerada (ALC-PK 121R-Annita IIR-Processing e Control Interface) a 10°C por dez minutos. O sobrenadante foi descartado e 0,8 mL de água deionizada adicionada ao tubo com a amostra. Esse material foi homogeneizado com pipeta e centrifugado novamente, utilizando-se o mesmo tempo e a mesma temperatura. Após essa etapa, foi descartado o sobrenadante e 80 µL de água deionizada, adicionados ao tubo. As amostras foram incubadas (Quimis-Q331) a 95°C durante 10 minutos e após esse período, o sobrenadante foi transferido para microtubos tipo eppendorf esterilizado e mantido congelado para análise posterior de amplificação do DNA.

Foram utilizados os seguintes pares de “primers”: *iss* 5`-GTG GCG AAA ACT AGT AAA ACA GC-3` e 5`- CGC CTC GGG GTG GAT AA-3`, amplificando 760pb; e *felA*, 5`-GGC AGT GGT GTC TTT TGG TG- 3` e 5`- GGC CCA GTA AAA GAT AAT TGA ACC-3`, que amplificam 270 pb. Para a amplificação dos genes *felA* e *iss* foram utilizados 12,75µl de água para PCR; 2,5µl de tampão PCR 10x, 2,5µl; 1,25µl dNTP com 2,5mM de cada

nucleotídeo, 1,25µl MgCl₂ 50mM, 100pM de cada “primer” (Prodimol), 1,25U de Taq DNA polimerase e 5µl do DNA extraído.

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

Os produtos amplificados foram submetidos a eletroforese a 55 V em gel de agarose a 1,5%, submersa em Tampão Tris-Borato- EDTA (TBE) 0,5X, durante aproximadamente duas horas. Após a corrida eletroforética, o gel de agarose foi corado com brometo de etídio e observado sob luz ultravioleta em transiluminador (EB-20E-ultra-Lum - Inc. Carson, Califórnia). Para estimar o peso molecular dos “amplicons” gerados pelos “primers” foi utilizado o marcador Ladder 100pb.

RESULTADOS

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

O tamanho das lesões variou de um a vinte centímetros e em nenhuma ave verificou-se alterações significantes em órgãos internos. A frequência relativa em porcentagem (%) nos locais de aparecimento das lesões está representada FIGURA 1 enquanto a frequência das alterações macroscópicas observadas pode ser visualizada na FIGURA 2.

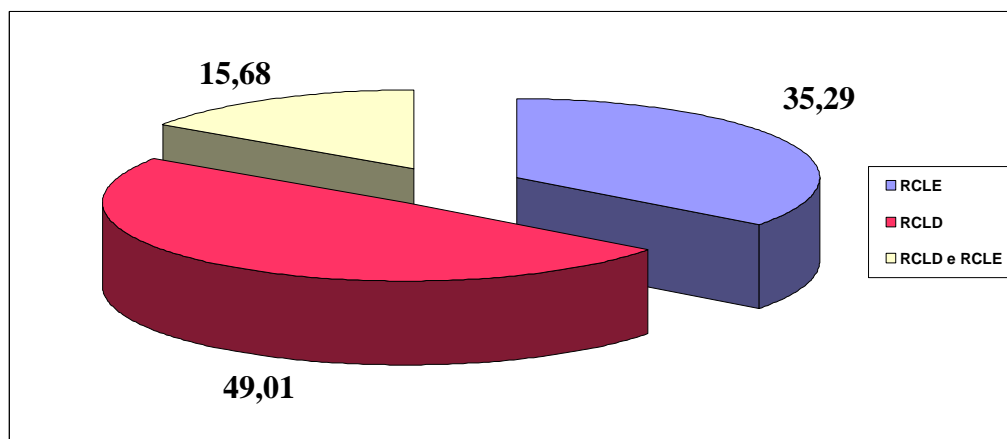


FIGURA 1. Frequência relativa (%) do local de aparecimento das lesões de celulite. RCLE: Região Caudo-Lateral Esquerda; RCLD: Região Caudo-Lateral Direita; RCLD e RCLE: Lesões em Região Caudo-Lateral Direita e Caudo Lateral Esquerda.

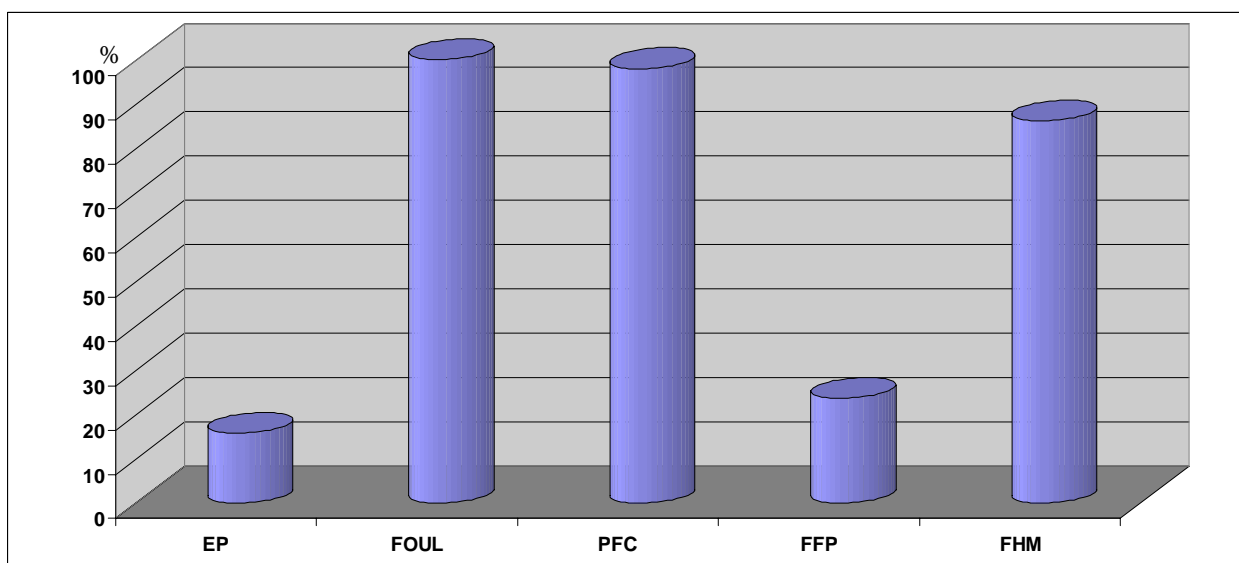


FIGURA 2. Frequência relativa (%) das principais alterações macroscópicas encontradas em tegumento de frangos de corte com celulite. EP: Espessamento de Pele; FOUL: Focos Ulcerativos; PFC: Placa Fibrinocaseosa em Subcutâneo; FFP: Fluido Amarelado Fibrinopurulento; FHM: Focos Hemorrágicos em Tecido Muscular.

Das 51 aves estudadas, foi isolada *E. coli* em 50. Em 19, a bactéria estava presente somente em lesões de celulite; em 30, houve isolamento em celulite em miúdos, sendo 11, nas lesões de celulite e no fígado; em cinco, nas lesões de celulite e no coração e 14, nas lesões de

celulite, no fígado e no coração. Em uma ave, foi detectada *E. coli* somente no fígado e no coração. Foram recuperadas estirpes de *E. coli* em 96% (48/50) das lesões de celulite, em 52% (26/50) das amostras de fígado e em 40% (20/50) das de coração.

Não houve significância na associação do tamanho da lesão com os isolamentos de *E.coli* em celulite e celulite e miúdos (fígado e coração), pelo método de qui-quadrado ($p>0,05$), conforme descrito na TABELA 1.

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

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

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

Foram obtidos 190 isolados de *E. coli*, sendo 98 a partir das lesões de celulite, 52 de fígado e 40 de coração. Destes 190 isolados, 113 (59,47%) foram positivos para o gene *iss*, sendo 59 (60,2%) das estirpes isoladas de celulite, 26 (50%) dos isolados de fígado e 28 (70%) dos isolados de coração (FIGURA 3).

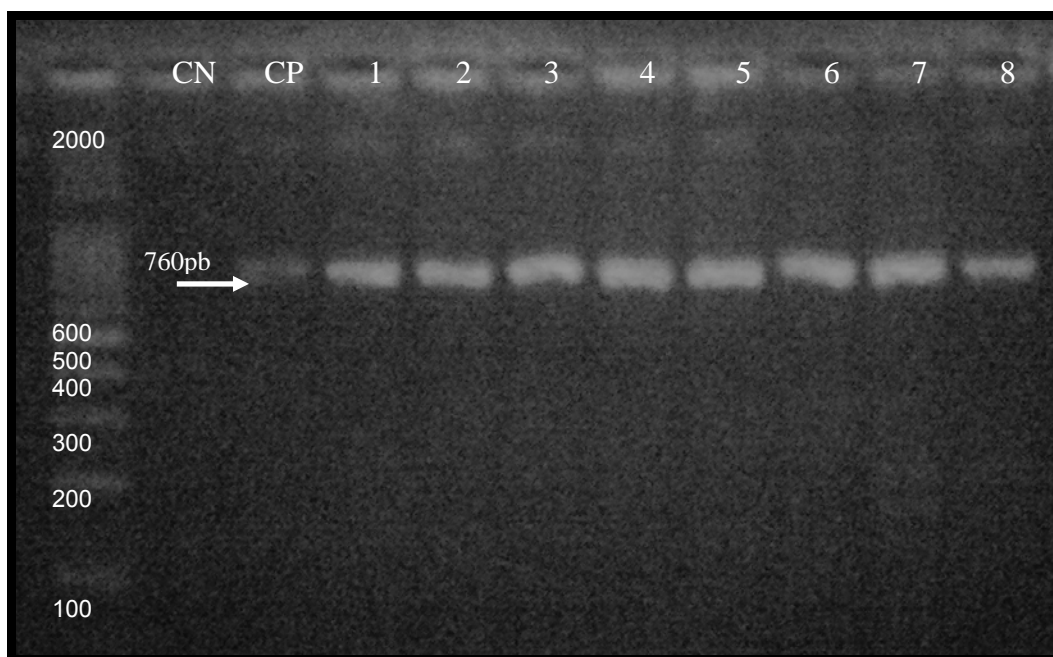


FIGURA 3. Marcador Molecular de DNA 100pb; CN: controle negativo; CP: controle positivo; 1 a 8: estirpes de *E. coli iss* positivas.

Do total de isolados, oito (4,2%) apresentaram positividade para o gene *felA*, sendo quatro de lesões de celulite, dois de fígado e dois de coração (FIGURA 4).

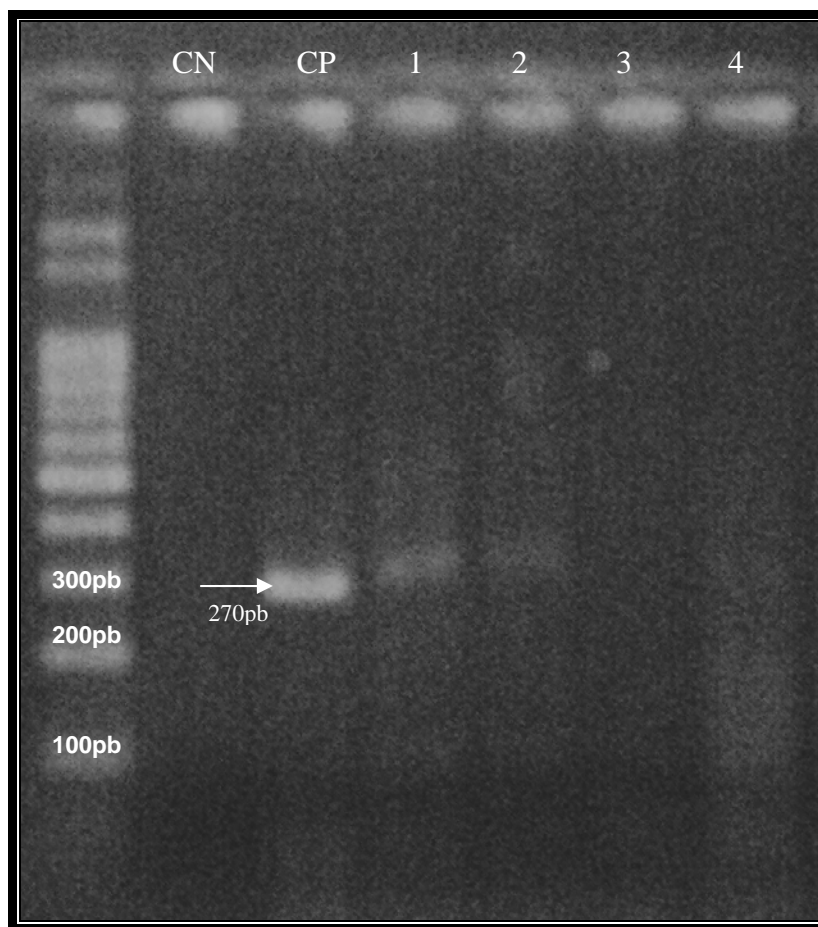


FIGURA 4: Marcador Molecular de DNA 100pb; CN: controle negativo; CP: controle positivo; 1 e 2: estirpes de *E. coli felA* positivas; 3 e 4: estirpes de *E. coli felA* negativa.

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

TABELA 2. Isolados de *E. coli iss* e *fel A* positivos em casos de celulite e miúdos (fígado e coração) de frangos de corte sob Inspeção Sanitária.

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

Dos 19 frangos em que *E. coli* foi isolada somente de casos de celulite, em 57,89% (11/19) foi possível a identificação de um ou mais isolados *iss* positivos. A presença do gene *iss* em *E.coli* de acordo com a origem dos isolados – celulite, celulite e miúdos (fígado e/ou coração) e somente miúdos (fígado e/ou coração) - pode ser visualizada na TABELA 3.

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

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

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

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

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

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

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

DISCUSSÃO

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

Estirpes de *E.coli* foram isoladas em 96% das lesões de celulite reforçando os achados de que a espécie bacteriana está frequentemente presente na lesão (Norton et al., 1999; Fallavena, 2000). Estas bactérias também foram isoladas em 50,98% das amostras de fígado e em 41,17% das amostras de coração. Embora *E.coli* tenha sido isolada dos miúdos, não foram observadas alterações macroscópicas. Estirpes de *E.coli* podem estar presentes em locais com estágios recentes de infecção sem determinar lesões macroscópicas, o que caracteriza a

importância da enfermidade e as implicações com a saúde pública (Gomis et al. 1997, 2000), visto que as condenações de carcaça e vísceras serão totais somente quando houver evidência do caráter sistêmico (Brasil, 1998).

A frequência de isolamento de *E. coli* foi maior em órgãos internos de aves que apresentaram lesões de celulite de tamanhos menores. Estes resultados reforçam os descritos por Jeffrey et al. (1999), em que algumas estirpes de *E. coli*, conquanto possam causar lesões leves, são capazes de penetrar na corrente sanguínea, podendo levar a morte dos animais. Além disso, Brito et al. (2003) demonstraram que estirpes isoladas de celulite desenvolvem mais frequentemente casos de septicemia, quando comparadas a outras, isoladas de outras manifestações clínicas de colibacilose.

Segundo Gomis et al. (1997, 2000), a *E. coli* foi isolada do pericárdio e dos sacos aéreos de aves sem lesões graves aparentes, mas em várias lesões macroscopicamente graves não houve isolamento, o que foi justificado pela existência de *E. coli* em estágios recentes de infecção sem que tenham determinado lesões macroscópicas nos órgãos analisados. Nos casos em que diferentes sorogrupos foram isolados de lesões de celulite e de outros tecidos, sugeriram que aves com celulite são mais susceptíveis ao desenvolvimento de colissepticemia devido ao estresse causado pela presença de celulite e vice-versa.

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

Segundo Fallavena (2000) a gravidade das lesões irá depender de fatores como a quantidade de bactéria, severidade e da presença de lesões cutâneas e estado imunológico do hospedeiro. Assim, mesmo que o gene de resistência sérica esteja presente ele sozinho não determinaria o potencial patogênico da estirpe, não obstante contribuisse para torná-la mais invasiva já que a sua presença prediz os efeitos patogênicos dos isolados (Nolan et al, 2002; Gibbs et al, 2003). Além disso, uma vez que esse gene foi localizado em plasmídeos capazes de carrear simultaneamente fatores de virulência e resistência a antimicrobianos, sua identificação torna-se importante, visto que estas cepas serviriam como reservatório de genes os quais poderiam ser transplantados por conjugação para outras estirpes da mesma espécie ou para espécies diferentes como descrito por Hammerum & Heuer (2009).

Nas aves estudadas, foram isoladas *E. coli* de celulite e miúdos, mas em algumas notou-se o gene *iss* somente nas estirpes de celulite, em outras em celulite e em pelo menos um dos órgãos internos e também, em pelo menos um órgão interno, sem a evidencia no isolado de celulite. Nestes casos, embora as estirpes bacterianas apresentassem características fenotípicas semelhantes, as genéticas foram diferentes, havendo a possibilidade das estirpes de *E. coli* da lesão de celulite terem alcançado os órgãos internos ou, que as lesões celulite tornaram as aves susceptíveis à colonização por outras estirpes de *E. coli* ou por outros micro-organismos, reforçando o proposto por Gomis et al. (1997; 2000).

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

A presença de gene *iss* em amostras de *E.coli* provenientes de miúdos detectada neste trabalho, em aves com lesões pequenas de celulite podem representar um risco à saúde dos consumidores. Estirpes reconhecidamente patogênicas para aves podem carrear genes de fatores de virulência e/ou genes resistentes que seriam transferidos a estirpes que colonizam a microbiota intestinal de humanos conforme preconizado por Ngeleka et al. (1996); Kumor et al. (1998); Kuhnert et al. (2000); Hammerum & Heuer, (2009). Algumas estirpes de *E.coli* provenientes de animais poderiam ainda se instalar e colonizar o trato intestinal humano (Ojenini, 1989). Embora não seja um risco direto para a saúde humana, tais estirpes poderiam originar uma infecção bacteriana com opções limitadas de tratamento, uma vez que produtos de frango são constantemente incriminados como as principais fontes de contaminação em humanos por *E. coli* resistente a antimicrobianos (Johnson et al., 2003; Hammerum & Heuer, 2009). Além disso, de acordo com Rodriguez-Siek et al. (2005) e Kariyawasam et al. (2007) algumas estirpes de APEC são capazes de causar doenças extaintestinais em humanos.

CONCLUSÃO

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

O gene *felA*, codificador da fímbria F11, não está amplamente difundida entre as *E. coli* isoladas em casos de celulite aviária, não sendo de suma importância para a patogenicidade dessas estirpes.

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

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

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

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq , à Faperj pelo apoio financeiro

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Allan, B. Cellulitis: Its Microbiology. In: 22nd ANNULA POULTRY SERVICE INDUSTRY WORKSHOP, 1997, Alberta. Anais Eletrônicos... Alberta, Canadá, 1997. Disponível em: <<http://www.agric.goc.ab.ca/>>. Acesso em: 28 de março de 2004

Alves, F. M. X. ; Pereira, V. L. A.; Nascimento, E. R. do; Guimarães, A. M. P.; Almeida, D. O. & Tortelly, R. 2007. Celulite associada às lesões na bolsa de Fabrício de frangos de corte ao abate, sob inspeção sanitária. Revista Brasileira de Ciência Veterinária. 14(1): 23-27.

Andrade, C. L. *Histopatologia a Identificação da Escherichia coli como agente causal da celulite aviária em frangos de corte*. Niterói, 2005. Dissertação (Mestrado em Higiene veterinária e processamento Tecnológico de produtos de Origem Animal) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Niterói. 2005.

Associação Brasileira dos Produtores e Exportadores de Frangos - ABEF. Relatório anual 2008-2009. Disponível em: <http://www.abef.com.br/portal/_clientes/abef/cat/Abef%20RA_4021.pdf> Acesso em: 17 de jun. de 2010.

Brasil, Portaria nº 210, de 26 de novembro de 1998. Aprova o Regulamento Técnico da Inspeção Tecnológica e Higienico Sanitária da Carne de Aves. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 1998.

Brito, B. G.; Gaziri, L. C. J. & Vidotto, M. C. 2003. Virulence Factors and Clonal Relationships among *Escherichia coli* strains Isolated from Broiler Chickens with Cellulitis. *Infection and Immunity*. 71 (7): 4175-4177.

Chuba, P.J.; Palchaudhuri, S. & Leon, M.A. 1986. Contributions of traT and iss genes to the serum resistance phenotype of plasmid ColV2-K94. *FEMS Microbiology Letters*. 37: 135-140.

Cogan, T. A.; Bloomfield, S. F. & Humphrey. 1999. The effectiveness of hygiene procedures for prevention of cross-contamination from chicken carcasses in the domestic kitchen. *Letters in Applied Microbiology*. 29: 354-358.

De Ree, J. M.; Schwillens, P. & Van Den Bosch, J. F. 1985. Monoclonal antibodies that recognize the P fimbriae F71, F72, F9, and F11 from uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 50(3): 900-904.

Delicato, E.R.; Brito, B.G.; Gaziri, L.C.J. & Vidotto, M.C. 2003. Virulence associated genes in *Escherichia coli* isolates from poultry with colibacillosis. *Veterinary Microbiology.* 94: 97-103.

Ewers C., Janssen T., Kiessling S., Philipp H.C. & Wieler L.H.. 2004. Molecular epidemiology of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from colisepticemia in poultry. *Veterinary Microbiology.* 104: 91-101.

Fallavena, L. C. B. *Enfermidades da Pele e das Penas*. In: BERCHIERI JR, A.; MACARI, M. *Doença das Aves*. Campinas: FACTA, 2000. 205p. cap. 2, p.37-47.

Foley, S.L.; Horne, S.M.; Giddings, C.W.; Robinson, M. & Nolan, L.K. 2000. *Iss* from a virulent *Escherichia coli*. *Avian Diseases.* 44: 185-191.

Gibbs, P.S.; Maurer, J.J.; Nolan, L.K. & Wooley, E. 2003. Prediction of chicken embryo lethality with the avian *Escherichia coli* traits complement resistance, colicin V production, and presence of increased serum survival gene cluster (*iss*). *Avian Diseases.* 47(2): 370-379.

Gomis, S.M.; Goodhope, R.; Kumor, L.; Caddy, N.; Riddell, C.; Potter, A.A. & Allan, B.J. 1997. Isolation of *Escherichia coli* from cellulitis and other lesions of the same bird in broiler at slaughter. *Can. Vet. Journal.* 38: 159-162.

Gomis, S. M. ; Gomis, A.I.U.; Horadagoda, N. U.; Wijewardene, T. G. ; Allan, B. J. & Potter, A.A. 2000. Studies on cellulitis and other disease síndromes caused by *Escherichia coli* in broilers in Sri Lanka. Tropical Animal Health and Production. 32: 341-351.

Giroto, A. F. & Miele, M. Estudos da EMBRAPA – Situação atual e tendências para a avicultura de corte nos próximos anos. Disponível em: <http://www.aviculturaindustrial.com.br/site/dinamica.asp?id=12024&tipo_tabela=produtos&categoria=frango_de_corte> Acesso em: 20 de julho de 2006.

Hammerum, A. M. & Heuer, O. E. 2009. Human health hazards from antimicrobial-resistant *Escherichia coli* of animal origin. Clinical Infectious Diseases. 48: 916-921.

Jeffrey, J. S.; Chin, R. P. & Singer, R. S. 1999. Assessing cellulitis pathogenicity of *Escherichia coli* isolates in broiler chickens assessed by an in vivo inoculation model. Avian Disease. 43: 491-496.

Johnson, J. R., Murray, A. C., Gajewski, A.; Sullivan, M.; Snippes, P.; Kuskowski, M. A.; Smith, K. E. 2003. Isolation and Molecular Characterization of nalidixic acid-resistant extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* from retail chicken products. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 47(7): 2161-2168.

Johnson, T.J.; Giddings, C.W.; Horne, S.M.; Gibbs, P.S.; Wooley, R.E.; Skyberg, J.; Olah, P.; Kercher, R.; Sherwood, J.S.; Foley, S.L. & Nolan, L.K. 2002. Location of increased

serum survival gene and selected virulence traits on a conjugative R plasmid in an avian *Escherichia coli* isolate. *Avian Diseases*. 46: 342-352.

Kariyawasam, S.; Scaccianoce, J. A. & Nolan, L. K. 2007. Common and specific genomic sequences of avian and human extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* as determined by genomic subtractive hybridization. *BMC Microbiology*. 7: 81-88.

Kuhnert, P.; Boerlin, P. & Frey, J. 2000. Target genes for virulence assessment of *Escherichia coli* isolates from water, food and the environment. *FEMS Microbiology Reviews*. 24(1): 107-117.

Kumor, L. W.; Olkowski, A. A.; Gomis, S. M. & Allan, B. J. 1998. Cellulitis in broiler chickens: epidemiological trends, meat hygiene, and possible human health implications. *Avian Diseases*. 42(2): 285-291.

La Ragione, R. M. & Woodward, M. J. 2002. Virulence factors of *Escherichia coli* serotypes associated with avian colisepticemia. *Research in Veterinary Science*. 73: 27-35.

Ngeleka, M.; Kwaga, J. K.; White, D. G.; Whittam, T. S.; Riddell, C.; Goodhope, R.; Potter, A. A & Allan, B. 1996. *Escherichia coli* cellulitis in broiler chickens: clonal relationship among strains and analysis of virulence-associated factors of isolates from disease birds. *Infect. Immun*. 64: 3118-3126.

Nolan L.K. , Giddings, C.W.; Horne, S.M.; Doetkott, C.; Gibbs, P.S.; Wooley, R.E. & Foley, S.L. 2002. Complement resistance, as determined by viable count and flow cytometric

methods, and its association with the presence of iss and the virulence of avian *Escherichia coli*. *Avian Diseases*. 46(2): 386-392.

Norton, R. A.; Macklin, K. S. & McMurtrey, B. L. 1999. Evaluation of scratches as an essential element in the development of avian cellulitis in broiler chickens. *Avian Disease*. 43: 320-325.

Ojeniyi, A. A. 1989. Direct transmission of *Escherichia coli* from poultry to humans. *Epidemiology and Infection*. 103:513-522.

Onderka, D. K.; Hanson, J. A.; McMillan, K. R. & Allan, B. 1997. *Escherichia coli* Associated Cellulitis in Broilers: Correlation with Systematic Infection and Microscopic Visceral Lesions, and Evaluation for Skin Trimming. *Avian Disease*. 41:935-940.

Pfaff-McDonough, S. J.; Horne, S. M.; Giddings, C. W.; Ebert, J. O.; Doetkott, C.; Smith, M. H.; Nolan, L. K. 2000. Complement resistance-related traits among *Escherichia coli* isolates from apparently healthy birds and birds with colibacillosis. *Avian Disease*. 44: 23-33.

Quinn, P.S.; Carter, M.E.; Marvey, B. & Carter, G.R. 1998. *Clinical Veterinary Microbiology*. London: Wolfe Publishing, 648 p.

Ramchandani, M.; Manges, A. R.; DeBroy, C.; Smith, S. P.; Johnson, J. R. & Riley, L. W. 2005. Possible Animal Origin of human-associated. Multidrug-resistant, uropathogenic *Escherichia coli*. *Clinical Infectious Diseases*. 40: 251-257.

Rocha, A.C.G.P.; Silva, A.B.; Brito, B.G.; Moraes, H.L.S.; Pontes, A.P.; Cé, M.C.; Nascimento, V.P. & Salle, C.T.P. 2002. Virulence factors of avian pathogenic *Escherichia coli* isolated from broilers from the south of Brazil. *Avian Diseases*. 46(3): 749-753.

Rocha, A. C. G. P.; Rocha; S. L. S; Lima-Rosa, C. A.V.; Souza, G. F., Moraes, H. L. S.; Salle, F. O.; Moraes, L. B. & Salle, C.T.P. 2008. Genes associated with pathogenicity of avian *Escherichia coli* (APEC) isolated from respiratory cases of poultry. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 28(3): 183-186.

Rodriguez-Siek, K. E.; Giddings, C. W.; Doetkott, C.; Johnson, T. J.; Fakhr, M. K. & Nolan, L. K. 2005. Comparison of *Escherichia coli* isolates implicated in human urinary tract infection and avian colibacillosis. *Microbiology*. 151: 2097-2110.

Silva, E. N. & Mota, M. P. Celulite em Frangos de Corte. Disponível em: <http://www.fatec.com.br/trabtec/celulite_em_frangos_de_corte.htm > Acesso em: 27 de novembro de 2003.

Toledo, M.R.F.; Fontes, C.F. & Trabulsi, L.R. 1982a. MILi – Um meio para a realização dos testes de motilidade, indol e lisina descarboxilase. *Revista Microbiológica*. 13(3): 230-235.

Toledo, M.R.F.; Fontes, C.F. & Trabulsi, L.R. 1982b. EPM – Modificação do meio de Rugai e Araújo para a realização simultânea dos testes de produção de gás a partir da glicose, H₂S, urease e triptofano desaminase. *Revista Microbiológica*. 13(4): 309-315.

Vincent, C.; Boerlin, P.; Daignault, D.; Dozois, C. M.; Dutil, L.; Galanakis, C.; Reid-Smith, R. J.; Tellier, P.; Tellis, P. A.; Ziebell, K.; Manges, A. R. 2010 Food reservoir for *Escherichia coli* causing urinary tract infections. *Emerging Infectious Diseases*. 16(1): 88-95.

Vieira, T. B.; Franco, R. M.; Magalhães, H.; Praxedes, C. I. S.; Tortelly. 2006. Celulite em frangos de corte abatidos sob inspeção sanitária: aspectos anatomopatológicos associados ao isolamento de *Escherichia coli*. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*. 13(3): 174-177.

3.2 ARTIGO 2 (A ser submetido à Revista de Saúde Pública - USP)

FILOGENIA POR RAPD-PCR DE *Escherichia coli* ISOLADAS DE CASOS CELULITE E DE MIÚDOS (FÍGADO E CORAÇÃO) DE FRANGOS SOB INSPEÇÃO SANITÁRIA

Thaís Badini Vieira³; Virginia Leo de Almeida Pereira⁴; Robson Maia Franco⁵; Elmiro Rosendo do Nascimento^{II}; Marcia Quinhones Pires Lopes^{IV}; Harrison Magdinier Gomes^{IV}; Marcelo Emanuel Ivens de Araújo^{IV}; Phillip Noel Suffys^{IV}; Rogério Tortelly^V

Em função da produção industrial de frangos de corte, lesões cutâneas, como a celulite, vêm se tornando uma das maiores causas de condenações de carcaças em todo o mundo. O objetivo deste estudo foi isolar *E. coli* em celulite e miúdos (fígado e coração) de frangos de corte, identificar os isolados pela RAPD-PCR e correlacioná-los pela análise molecular para comprovar o caráter séptico da infecção. Durante a inspeção sanitária, 51 frangos de corte apresentando celulite foram retirados da linha de abate. Estas aves foram encaminhadas para o Laboratório de Controle de Qualidade onde as lesões de celulite foram mensuradas e descritas macroscopicamente. Foram colhidas amostras de pele e miúdos (coração e fígado) de cada frango de corte para o exame microbiológico.

Os isolados de *Escherichia coli* foram analisados pela técnica de RAPD-PCR e tiveram o perfil filogenético comparados através do software BIONUMERICS 5.1. Todas as lesões de celulite foram visualizadas como úlcera cutânea e oito apresentaram espessamento de pele,

³ Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária (doutorado), Área de Concentração: Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal da Faculdade de Veterinária Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, Brasil. E-mail: thais.badini@ig.com.br

⁴ Departamento de Saúde Coletiva Veterinária e Saúde Pública da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, Brasil. E-mail: msv@vm.uff.br

⁵ Departamento de Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, Brasil. E-mail: mta@vm.uff.br

^{IV} Laboratório de Biologia Molecular Aplicada a Micobactérias - Instituto Oswaldo Cruz - Fundação Oswaldo Cruz. E-mail: harrison@ioc.fiocruz.br

^V Departamento de Patologia e Clínica Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, Brasil. E-mail: mcv@vm.uff.br

alterações na coloração (amarelo-avermelhado) e irregularidade na pele. Ao corte, foi observado fluido gelatinoso e placas amarelas destacáveis e em alguns casos, o acometimento da musculatura adjacente. Foram obtidos 190 isolados, sendo 98 em celulite, 52, em fígado e 40, em coração. Os resultados da RAPD-PCR, comparados pelo software BIONUMERICS, foram agrupados em 46 “clusters” com 80% ou mais de similaridade, sendo o menor composto por duas estirpes e o maior por doze. Dos 30 frangos em que foi isolada *E. coli* em lesões de celulite associadas aos miúdos (fígado e/ou coração), em 10, foram obtidas estirpes com mais de 85% de similaridade entre os isolados de celulite e miúdos, em nove, houve 85% de similaridade entre isolados de fígado e de coração sem similaridade entre os isolados de celulite, e em 11, não houve correlação entre os isolados de celulite e miúdos. A detecção de estirpes de *E. coli* com alta similaridade genética em celulite e em miúdos pode significar que a remoção parcial das lesões não minimiza o risco à saúde coletiva.

Palavras-chave: colissepticemia; celulite; frango; RAPD-PCR

Abstract

Due to the large scale production, the skin lesions such as avian cellulitis, are becoming increasingly the major cause of sentences throughout the world. This study aimed at isolating *E. coli* from lesions of cellulitis and offal (heart and liver) from broilers to identify the isolates by RAPD-PCR and correlate them by molecular analysis to establish the septic characteristic of the disease. During the sanitary inspection, 51 broilers presenting cellulitis were removed from the slaughter line. These birds were sent to the Laboratory of Quality Control where the cellulitis lesions were measured and described macroscopically. We collected samples of skin and offal (heart and liver) from each broiler for microbiological examination. Isolates of *Escherichia coli* were analyzed by RAPD-PCR and had compared the phylogenetic profile using the software BIONUMERICS 5.1. All lesions was characterized as skin ulcer, and eight presented skin thickening, changes in color (reddish-yellow) and

irregular skin surface. At cutting, it was seen gelatinous fluid and yellowish patches, in some cases, with involvement of the adjacent musculature. It was obtained 190 isolates, 98 in cellulite, 52, and 40 in liver, heart. The results of RAPD-PCR, compared by software BIONUMERCS, were grouped into 46 clusters with 80% or more similarity, the lowest consisting of two strains and increased by twelve. Of the 30 broilers which were isolated *E. coli*, from lesions of cellulitis associated with offal (liver and / or heart), 10, were obtained strains with more than 85% similarity between isolated from cellulitis and offal; in nine samples, there was 85% similarity between isolated from liver and heart with no similarity between the isolated from cellulitis; and 11, there was no correlation between the isolates. The detection of strains of *E. coli* with high genetic similarity in cellulite and offal may mean that the partial removal of the lesions does not minimize the risk to public health.

Keywords: colissepticemia; cellulitis; broiler; RAPD-PCR

Introdução

A avicultura brasileira desenvolveu-se e modernizou-se rapidamente alcançando níveis elevados de produtividade nos últimos 30 anos. A cadeia avícola tem se destacado por uma trajetória de incremento tecnológico expressivo, alavancada pela articulação entre os diferentes agentes que a compõe.¹² O Brasil é o terceiro maior produtor mundial e o primeiro colocado nas exportações de carne de frango.³

Apesar de todo esse avanço, as lesões cutâneas, como a celulite, vêm se tornando cada vez mais frequentes em frangos de corte como consequência da produção em larga escala, do tipo de criação e do manejo, sendo uma das maiores causas de condenações totais e parciais em todo o mundo.

Conforme a Portaria nº 210 de 26/11/1998 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento,⁵ qualquer órgão ou partes de carcaça que estiverem afetados por um processo

inflamatório, como a celulite, deverá sofrer condenação parcial ou condenação total, quando houver a evidência de caráter sistêmico. A lesão de celulite é caracterizada pela formação de placas fibrinocaseosas no tecido subcutâneo profundo, oriundas de uma inflamação purulenta, aguda e difusa, localizando-se principalmente nas regiões de abdômen e sobrecoxa.^{1;24}

A celulite apresenta etiologia multifatorial, porém a *Escherichia coli* tem sido um dos agentes mais frequentemente isolado. É indispensável que a pele esteja lesada para que as bactérias invadam e se multipliquem no hospedeiro, embora este fator não seja isoladamente suficiente para a ocorrência da enfermidade.^{8; 18}

A presença de *E. coli* nas lesões de celulite favorece a contaminação cruzada nas linhas de processamento de frangos. Além disso, o descarte parcial de algumas lesões difusas pode favorecer ao aumento da quantidade inicial de bactérias no interior da carcaça uma vez que aves condenadas por celulite podem apresentar uma combinação com outras lesões em coração, sacos aéreos, ossos, articulações e/ou fígado, mesmo que em alguns casos não seja possível o isolamento do mesmo sorogrupo nas lesões de celulite e nos outros tecidos.^{10;11}

Não existem relatos de *E. coli* isoladas de lesões de celulite causando doenças em humanos. A análise molecular das estirpes tem mostrado que *E. coli* isoladas de lesões de celulite estão geneticamente relacionadas àquelas responsáveis por septicemia e meningite em humanos. Devem ser considerado também que estirpes de *E. coli* podem adquirir fatores de virulência por trocas genéticas entre elas, havendo a possibilidade do surgimento de estirpes patogênicas emergentes.^{14; 15; 17}

O uso da reação em cadeia da polimerase (PCR) na rotina de diagnósticos é uma ferramenta de rápida detecção de organismos infecciosos. Várias técnicas para estudo dos diferentes perfis de DNA têm sido desenvolvidas e aplicadas a diversos gêneros bacterianos com base na PCR. Nesse contexto, a técnica de Análise da Amplificação Randômica do DNA Polimórfico (RAPD-PCR) tem sido considerada eficiente e adequada para a tipagem molecular de *E. coli*,

capaz de discriminar o perfil filogenético de estirpes de origem humana²⁵ e de animais,^{7; 9; 21}, também sendo de grande importância em estudos epidemiológicos e estudos de contaminação cruzada em alimentos.^{13; 20; 25} Além disso, é considerada uma técnica relativamente mais fácil e rápida de ser reproduzida, quando comparada a outras técnicas moleculares como “Restriction Fragment Length Polymorphism” (RFLP),¹⁶ robotipagem,²⁵ “MultiLocus Sequence Typing” (MLST)³ e “Pulsed-Field Gel Electrophoresis” (PFGE).²⁰ O objetivo deste estudo foi isolar *E. coli* em celulite e miúdos (fígado e coração) de frangos de corte, identificar os isolados pela RAPD-PCR e correlacioná-los a fim de comprovar o caráter séptico da infecção.

MATERIAL E METODOS

Em matadouro de aves, 51 frangos de corte com idade entre 35 e 40 dias, apresentando lesões sugestivas de celulite foram retirados da linha de abate após a depenagem, durante a inspeção sanitária estadual. Esses frangos foram encaminhados para o Laboratório de Controle de Qualidade do matadouro, onde foram colhidas amostras de pele, coração e fígado, com suabes estéreis, para o exame bacteriológico. O material colhido foi acondicionado em tubo de ensaio contendo meio Cary e Blair (DIFCO), mantido refrigerado e transportado ao Laboratório de Controle Microbiológico de Produtos de Origem Animal da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense, para o isolamento e identificação bacteriológica. As lesões de celulite foram descritas macroscopicamente e registradas em fichas individuais.

Isolamento de *Escherichia coli*

Os suabes foram retirados dos tubos do meio Cary Blair e inoculados em tubos de ensaio esterilizados contendo 3,0 mL de caldo “Brain Heart Infusion” (BHI) e incubados a

37°C por 24 horas. Após esse período, uma alíquota do caldo BHI foi semeada em ágar MacConkey e Agar “Eosyn Methylen Blue” (EMB) e as placas foram incubadas a 37°C por 24h, conforme a metodologia descrita por Quinn et al.¹⁹ Do crescimento no ágar MacConkey e no Agar EMB, duas colônias foram selecionadas e inoculadas individualmente nos meios Sulfeto Indol Motilidade (SIM), Citrato (Difco), MILi (Motilidade Indol Lisina)²² e meio de Rugai e Araújo modificado (EPM)²³. Os tubos foram incubados à 37°C por 24 horas para bioquímica presuntiva. Os cultivos considerados positivos no meio EPM foram inoculados em BHI contendo 20% de glicerol e estocados a -18° C para provas laboratoriais posteriores.

RAPD- PCR

A RAPD-PCR foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular Aplicada a Micobactérias - Instituto Oswaldo Cruz - Fundação Oswaldo Cruz.

Extração do DNA

O DNA foi extraído com FTA® cards (Whatman Inc.) a partir do cultivo bacteriano em BHI, utilizando-se uma alíquota de 100 µL do cultivo homogeneizado. Após a aplicação, o FTA foi mantido em temperatura ambiente para secagem por no mínimo de uma hora. Foram utilizados seis pedaços do papel retirados com instrumento de punção 1,2mm e colocados em microtubos de 0,5 mL. Para a lavagem dos fragmentos 100 µL do Reagente FTA de purificação foram adicionados, homogeneizando cada amostra por 5 minutos, repetindo o procedimento de lavagem por três vezes. Para retirada do reagente foram realizadas duas lavagens posteriores com Tampão Tris-Borato- EDTA (TBE) 1X. Os microtubos foram mantidos abertos e colocados em bloco térmico a 53°C até que estivessem secos para serem utilizados na reação de PCR.

RAPD

Foi utilizado o “primer” ECOL-1 (5'-AAG AGC CCG T-3')^{6; 21}. A reação para a amplificação dos fragmentos do genoma foi composta por 17,75µl de água esterilizada; 2.5µl de tampão PCR 10x, 2,5µl de dNTP mix com 2,5mM de cada nucleotídeo, 1.25µl de 50mM MgCl₂, 1µl de 100pmol do “primer” (Prodimol), 0,25µl de 5U Taq DNA polymerase (Fermentas Inc.) e um fragmento de FTA cards.

Foi utilizado o “primer” ECOL-1 (5'-AAG AGC CCG T-3'), descrito por Chansiripornchai et al (8) e Salehi et al (23). A PCR foi composta por 2,5mM dNTP, 1,25mM MgCl₂, 100pmol do “primer” (Prodimol), 1,25U Taq DNA polymerase (Fermentas Inc.) e um fragmento de FTA cards.

As condições de amplificação foram dois ciclos a 94 °C por 30 segundos, 43°C por sete segundos e 72°C por 70 segundos; seguidos por 38 ciclos a 94°C por um segundo, 43°C por sete segundos e 72°C por 70 segundos, seguido por uma extensão final 72°C por cinco minutos.

A análise dos produtos amplificados foi realizada por eletroforese em gel de agarose a 3% (Invitrogen), em tampão Tris- acetato (TAE) 1X, a 80 V durante aproximadamente cinco horas, por uma distância de 12 centímetros. Após a eletroforese, o gel de agarose foi corado com brometo de etídio (0,5µg/mL). Para auxiliar a visualização dos “amplicons”, gerados pelos “primers”, foi utilizado o marcador molecular de DNA 100pb (Fermentas Inc.). O resultado foi observado e fotografado sob luz ultravioleta utilizando-se o transiluminador MiniBIS Pro (DNR Bio-Imaging Systems, Jerusalém - Israel).

A análise molecular dos resultados foi realizada com o software BIONUMERICS versão 5.1 (Applied-Maths) utilizando o teste de correlação de Pearson. Para avaliação das estirpes de *E.coli* estudadas, foram agrupadas aquelas com 80% ou mais de similaridade.²

RESULTADOS

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

Das 51 aves estudadas, estirpes de *E. coli* foram isoladas em 50. Em 19 a bactéria estava presente somente em lesões de celulite; em 11, nas lesões de celulite e nos fígados; em cinco, nas lesões de celulite e no coração; em 14, nas lesões de celulite, no fígado e no coração; e em uma, somente no fígado e no coração.

Foram obtidos 190 isolados, sendo 98 a partir das lesões de celulite, 52 a partir de fígado e 40 a partir de coração.

Foi possível diferenciar os isolados de *E. coli* a partir da técnica de RAPD-PCR (APÊNDICE 6.1 a 6.7). Os resultados analisados pelo software BIONUMERICS permitiu agrupar os 190 isolados em 46 “clusters” com 80% ou mais de similaridade, sendo o menor deles composto por duas estirpes e o maior, por 12.

Das 30 aves em que foi isolada *E. coli* em lesões de celulite associada a miúdos (fígado e/ou coração), em dez foi possível obter estirpes com mais de 85% de similaridade entre os isolados de miúdos, em nove, houve 85% de similaridade entre isolados de fígado e coração com ausência de similaridade com os isolados de celulite e em 11, não houve correlação entre os isolados de celulite e miúdos, embora em 10 desses frangos tenha havido similaridade genética maior que 85% entre as estirpes isoladas do mesmo miúdo (fígado ou coração) (Tabela 1).

Tabela 1. Similaridade entre os isolados de *E. coli* de celulite *versus* os isolados de miúdos (fígado e/ou coração) pertencentes ao mesmo “cluster”

Celulite	Miúdos
Com similaridade genética de 85% ou mais	10
Sem similaridade genética, mas com similaridade entre miúdos	9
Sem similaridade genética	11
Total	30

DISCUSSÃO

Os achados macroscópicos demonstraram que lesões de celulite podem ser visualizadas no abate após a depenagem. Nem sempre ocorre o espessamento da pele e em 43 das 51 aves estudadas, a celulite foi identificada apenas como uma ulceração cutânea. Os demais aspectos observados na Inspeção Sanitária estavam conforme a literatura que descreve a lesão de celulite como um processo inflamatório no tecido subcutâneo caracterizado pela descoloração e engrossamento da pele, detectado no abate. Em alguns casos notaram-se pontos hemorrágicos em musculatura, assim como relatado por outros autores.^{3, 4, 10, 24} Achados macroscópicos da celulite permitem à equipe de inspeção identificar a enfermidade, realizar o julgamento e destino das carcaças segundo a legislação brasileira que determina que “qualquer órgão ou parte da carcaça que estiver afetado por um processo inflamatório deverá ser condenado e, se existir evidência de caráter sistêmico do problema, a carcaça e as vísceras na sua totalidade deverão ser condenadas.”⁵

Foram isoladas 190 estirpes de *E.coli* de celulite reforçando os achados de que a espécie bacteriana está freqüentemente presente nesta lesão.^{8; 18} Estas bactérias também foram isoladas em amostras de miúdos (fígado e de coração), embora não tenham sido observadas alterações macroscópicas. Estirpes de *E.coli* podem estar presentes em locais com estágios recentes de infecção sem determinar lesões macroscópicas,^{10;11} o que caracteriza a

importância da enfermidade e as implicações com a saúde coletiva, visto que as condenações de carcaça e vísceras serão totais somente quando houver evidência do caráter sistêmico.⁵

Os meios utilizados para caracterização bioquímica das *E. coli*, EPM e Milli, mostraram-se eficientes permitindo que através do fenótipo fossem selecionadas estirpes típicas de *E. coli*. Este método bioquímico, portanto, é eficiente para a identificação de *E. coli*, embora se limite à comparação do comportamento bioquímico da espécie, não sendo eficiente para a diferenciação do conteúdo genético das estirpes.

O *primer* utilizado para a técnica de RAPD-PCR permitiu uma eficiente discriminação genética das estirpes, conforme descritos por outros autores.^{7; 21}

A análise molecular das estirpes, a partir dos dendogramas obtidos, possibilitou identificar que em 32,25 % dos frangos estavam presentes estirpes com similaridade genética maior ou igual a 85% provenientes de lesões de celulite e de pelo menos um miúdo (fígado ou coração), o que pode ser considerado como uma comprovação do caráter séptico da infecção. Estirpes isoladas de celulite desenvolvem mais frequentemente casos de septicemia, quando comparadas a outras, isoladas de outras manifestações clínicas de colibacilose.⁶ Além disso, a gravidade das lesões irá depender de fatores como a quantidade de bactéria, severidade e quantidade das lesões cutâneas e estado imunológico do hospedeiro.⁸

Em 29% das amostras não houve similaridade entre os isolados de celulite e de miúdos, apesar da existência de similaridade entre os isolados de fígado e os de coração.

Em 36,66% dos frangos, não foi encontrada similaridade genética igual ou maior que 85% entre a celulite e os miúdos, embora em 90,9% desses frangos tenha sido evidenciada similaridade genética em estirpes do mesmo miúdo (fígado ou coração). Neste caso, sugere-se que a presença da lesão de celulite poderia tornar aves susceptíveis à colonização por outras cepas de *E. coli* ou por outros micro-organismos.^{10; 11} Estirpes de *E. coli* seriam capazes de penetrar através da lesão de celulite em função do enfraquecimento da resposta do

hospedeiro à colonização bacteriana. Essas estirpes poderiam, por sua vez, alcançar órgãos internos, migrando através da corrente sanguínea, fixando-se e multiplicando-se.

Assim sendo, o fato de estirpes de *E. coli* com alta similaridade genética estarem presentes em celulite e em miúdos pode significar que a remoção parcial das lesões não minimiza o risco à saúde coletiva. Além disso, a presença da lesão de celulite poderia tornar aves susceptíveis à colonização por outras estirpes de *E. coli* ou por outros micro-organismos. Desta forma, os produtos derivados de frangos seriam fontes importantes de enfermidades transmitidas por alimentos. Pelos riscos relativos à saúde coletiva, torna-se necessária a reavaliação dos critérios de condenação determinados na legislação em casos de celulite aviária.⁵

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq , à Faperj pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alves, F. M. X. ; Pereira, V. L. A.; Nascimento, E. R. do; Guimarães, A. M. P.; Almeida, D. O.; Tortelly, R.. Celulite associada às lesões na bolsa de Fabrício de frangos de corte ao abate, sob inspeção sanitária. *Rev. Bras. de Ciência Vet.* 2007; 14(1): 23-27.
2. Aslam, M.; Nattress, F.; Greer, G.; Yost, C.; Gill, C.; McMullen, L. Origin of Contamination and Genetic Diversity of *Escherichia coli* in Beef Cattle *Appl Environ Microbiol.* 2003; 69(5): 2794–2799. DOI: 10.1128/AEM.69.5.2794.

3. Associação Brasileira dos Produtores e Exportadores de Frangos - ABEF. Relatório anual 2008-2009 [internet]. 2009 [acesso em 17 de jun. de 2010]. Disponível em: http://www.abef.com.br/portal/_clientes/abef/cat/Abef%20RA_4021.pdf.
4. Bando, S. Y.; Trabulsi, L. R.; Moreira-Filho, C. A.. Genetic relationship of diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes among the enteropathogenic *Escherichia coli* O serogroup. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2007; 102 (2):169-74. DOI: 10.1590/S0074-02762007005000018
5. Brasil, Portaria nº 210, de 26 de novembro de 1998. Aprova o Regulamento Técnico da Inspeção Tecnológica e Higiênico Sanitária da Carne de Aves. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 1998.
6. Brito, B. G.; Gaziri, L. C. J.; Vidotto, M. C.. Virulence Factors and Clonal Relationships among *Escherichia coli* strains Isolated from Broiler Chickens with Cellulitis. *Infect Immun.* 2003; 71(7): 4175-77. DOI: 10.1128.
7. Chansiriporchai, N.; Ramasoota, P.; Sasipreeyajan, J; Svenson, S. B.. Differentiation of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) strains by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Vet. Microbiol.* 2001; 80(3): 75-83. DOI:10.1016/S0378-1135(00)00380-1.
8. Fallavena, L. C. B.. Enfermidades da Pele e das Penas. *In: Berchieri JR, A.; Macari, M. Doença das Aves.* Campinas: FACTA; 2000, p.37-47.

9. Gomes, A. R.; Muniyappa, L.; Krishnappa, G.; Suryanarayana, V. V. S.; Isloor, S.; Hugar, P. G.. Genotypic characterization of Avian *Escherichia coli* by random Amplification of Polymorphic DNA. *Int. J. of Poultry Sci.* 2005; 4(6): 378-81. ISSN16828356.
10. Gomis, S.M.; Goodhope, R.; Kumor, L.; Caddy, N.; Riddell, C.; Potter, A.A.; Allan, B.J.. Isolation of *Escherichia coli* from cellulitis and other lesions of the same bird in broiler at slaughter. *Can. Vet. Journal.* 1997; 38: 159-162.
11. Gomis, S. M. ; Gomis, A.I.U.; Horadagoda, N. U.; Wijewardene, T. G. ; Allan, B. J.; POTTER, A.A.. Studies on cellulitis and other disease síndromes caused by *Escherichia coli* in broilers in Sri Lanka. *Trop. Animal Health and Prod.* 2000; 32: 341-31.
12. Giroto, A. F.; Miele, M. (2006). Estudos da EMBRAPA – Situação atual e tendências para a avicultura de corte nos próximos anos [internet]. 2006 [acesso em 20 de julho de 2006] Disponível em: http://www.aviculturaindustrial.com.br/site/dinamica.asp?id=12024&tipo_tabela=produtos&categoria=frango_de_corte
13. Kanungo, S.. A simplified analysis different *Escherichia coli* strains by using RAPD technique. *Not. Bot. Hort. Agrobot. Clu.* 2009; 37(2): 257-60. ISSN 0255-965X
14. Kuhnert, P.; Boerlin, P.; Frey, J.. Target genes for virulence assessment of *Escherichia coli* isolates from water, food and the environment. *FEMS Microbiol Rev.* 2000; 24(1): 107-117.

15. Kumor, L. W.; Olkowski, A. A.; Gomis, S. M.; ALLAN, B. J. Cellulitis in broiler chickens: epidemiological trends, meat hygiene, and possible human health implications. *Avian Dis.* 1998; 42(2): 285-91.
16. Maurer, J. J., Lee, M. D.; Lobsinger, C.; Brown, T. P.; Maier, M.; Thayer, S. G. Molecular typing of avian *Escherichia coli* isolates by random amplification of polymorphic DNA. *Avian Dis.* 1998; 42: 431-51.
17. Ngeleka, M.; Kwaga, J. K.; White, D. G.; Whittam, T. S.; Riddell, C.; Goodhope, R.; Potter, A. A.; Allan, B. *Escherichia coli* cellulitis in broiler chickens: clonal relationship among strains and analysis of virulence-associated factors of isolates from disease birds. *Infect. Immun.* 1996; 64: 3118-26.
18. Norton, R. A.; Macklin, K. S.; McMurtrey, B. L.. Evaluation of scratches as an essential element in the development of avian cellulitis in broiler chickens. *Avian Dis.* 1999; 43: 320-325.
19. Quinn, P.S.; Carter, M.E.; Marvey, B.; Carter, G.R. *Clinical Veterinary Microbiology.* London; Wolfe Publishing; 1998.
20. Radu, S.; Alias, R.; Rusul, G.; Lihan, S.; Ling, O. W.. Analysis of *Escherichia coli* O157:H7 isolates from beef by RAPD-PCR and Plasmid profiles. *Pakistan J. of Biol. Sci.* 2000; 3(4): 558-61. DOI:10.1016/S0167-7012(01)00269-X

21. Salehi, T. Z.; Madani, S.A.; Karimi, V.; Khazaeli, F. A.. Molecular genetic differentiation of avian *Escherichia coli* by RAPD-PCR. *Braz. J. of Microbiol.* 2008; 39: 494-97. DOI: 10.1590/S1517-83822008000300015

22. Toledo, M.R.F.; Fontes, C.F.; Trabulsi, L.R.. MILi – Um meio para a realização dos testes de motilidade, indol e lisina descarboxilase. *Rev. Microbiol.* 1982a; 13(3): 230-35.

23. Toledo, M.R.F.; Fontes, C.F.; Trabulsi, L.R.. EPM – Modificação do meio de Rugai e Araújo para a realização simultânea dos testes de produção de gás a partir da glicose, H₂S, urease e triptofano desaminase. *Rev. Microbiol.* 1982b; 13(4): 309-15.

24. Vieira, T. B.; Franco, R. M.; Magalhães, H.; Praxedes, C. I. S.; Tortelly.. Celulite em frangos de corte abatidos sob inspeção sanitária: aspectos anatomopatológicos associados ao isolamento de *Escherichia coli*. *Rev. Bras. de Ciência Veterinária.* 2006; 13(3): 174-77.

25. Vogel, L.; Oorschot, E. van; Maas, H. M. E.; Minderhoud, B.; Dijkshoorn, L.. Epidemiologic typing of *Escherichia coli* using RAPD analysis, robotyping and serotyping. *Clin Microbiol Infect.* 2000; 6: 82-87.DOI: 10.1046/j.1469-0691.2000.00013.x

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

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

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

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

O *primer* utilizado para a técnica de RAPD permitiu uma eficiente discriminação das estirpes.

O fato de estirpes de *E. coli* com alta similaridade genética estar presente em celulite e em miúdos pode ser considerado como uma comprovação do caráter séptico da infecção.

Em alguns casos houve similaridade somente entre os isolados de *E. coli* de miúdos o que sugere que a celulite pode tornar as aves suscetíveis a infecção por outras estirpes deste microrganismo.

Os resultados obtidos neste estudo fortalecem a ideia de que a remoção parcial das lesões de celulite apenas minimiza o aspecto repugnante da carcaça, sendo mais estética do que higiênica, não contribuindo para eliminação da contaminação, que poderia se estender às linhas de produção. A detecção de *E. coli* patogênica em miúdos representa uma fonte importante de agentes etiológicos de doenças alimentares e riscos relativos à Saúde Coletiva, tornando-se necessária a

reavaliação dos critérios determinados pela Portaria nº 210 de 26/11/1998 para condenação em casos de celulite aviária, a fim de garantir a segurança no consumo de produtos derivados de frangos de corte.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AJIBOYE, R. M.; SOLBERG, O. D., LEE, B. M., RAPHAEL, E.; DeBROY, C.; RILEY, L. W. Global spread of mobile antimicrobial drug resistance determinants in human and animal *Escherichia coli* and *Salmonella* strains causing community-acquired infections. *Clinical Infectious Diseases*, v. 49, p. 365-371, ago., 2009.

ALLAN, B. Cellulitis: Its Microbiology. In: 22nd ANNUAL POULTRY SERVICE INDUSTRY WORKSHOP, 1997, Alberta. Anais Eletrônicos... Alberta, Canadá, 1997. Disponível em: <<http://www.agric.goc.ab.ca/>>. Acesso em: 28 de março de 2004

ALVES, F. M. X. ; PEREIRA, V. L. A.; NASCIMENTO, E. R. do; GUIMARÃES, A. M. P.; ALMEIDA, D. O.; TORTELLY, R. Celulite associada às lesões na bolsa de Fabricio de frangos de corte ao abate, sob inspeção sanitária. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, v. 14, n.1, p. 23-27, 2007.

ALVES, F. M. X. *Celulite Associada às Lesões na Bolsa de Fabricio de Frangos de Corte sob Inspeção Sanitária*. Niterói, 2005. Dissertação (Mestrado em Higiene veterinária e processamento Tecnológico de produtos de Origem Animal) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Niterói. 2005.

ANDRADE, C. L. *Histopatologia a Identificação da Escherichia coli como agente causal da celulite aviária em frangos de corte*. Niterói, 2005. Dissertação (Mestrado em Higiene veterinária e processamento Tecnológico de produtos de Origem Animal) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Niterói. 2005.

ANTUNES, R. *Anuário – Novo Recorde*. Disponível em: <
http://www.aviculturaindustrial.com.br/site/dinamica.asp?id=18406&tipo_tabela=produto&categoria=frango_de_corte > Acesso em: 20 de julho de 2006.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS PRODUTORES E EXPORTADORES DE FRANGOS - ABEF. Relatório anual 2008-2009. Disponível em: <http://www.abef.com.br/portal/_clientes/abef/cat/Abef%20RA_4021.pdf> Acesso em: 17 de jun. de 2010.

BANDO, S. Y.; TRABULSI, L. R.; MOREIRA-FILHO, C. A. Genetic relationship of diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes among the enteropathogenic *Escherichia coli* O serogroup. *Memorial do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 102, n.2, p. 169-174, 2007.

BARNES, H. J.; VAILLANCOUT, J. P.; GROSS, W. B. *Colibacillosis*. In: BARNES, H. J. et al. *Disease of Poultry*. Iowa: Iowa State Press-A Blackwell Publishing Company, 2003. 1231p. cap.18, p.631-656.

BERCHIERI, A. J.; MACARI, M. *Doença das Aves*. Campinas: FACTA, 2000. 205p.

BINNS, M. M.; DAVIES, D. L.; HARDY, K. G. Cloned fragments of the plasmid ColV,I-K94 specifying virulence and serum resistance. *Nature*. 279:778-781, 1979.

BINNS, M.M.; MAYDEN, J.; LEVINE, R.P. Further Characterization of complement resistance conferred by *Escherichia coli* by the plasmid genes *traT* of R100 and *iss* of Col V, I - K94. *Infection and Immunity*, v. 35, n. 2, p. 654-659, 1982.

BLANCO, J.E.; BLANCO, M.; MORA, A. & BLANCO, J.. 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*. v.35, p. 2953-2957, 1997.

BORÉM, A.; dos SANTOS, F. R. *Marcadores Moleculares*. In: *Biotechnologia Simplificada*. Editora Suprema: Viçosa-MG, 249p., 2002.

BOULIANNE, M. Cellulitis in broiler chickens. *Missed World Poultry*, v.15, p.56-59, 1999.

BRASIL, Portaria nº 210, de 26 de novembro de 1998. Aprova o Regulamento Técnico da Inspeção Tecnológica e Higiênico Sanitária da Carne de Aves. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 1998.

BRAUN, V. Iron uptake by *Escherichia coli*. *Frontiers on Bioscience*, v.8, p.1409-1421, 2003.

BRITO, B. G. Celulite em frangos de corte causada por *Escherichia coli*. *Semina, Ciências Agrárias*, v. 23, n. 1, p.81-84, jan./jun., 2002.

BRITO, B. G.; GAZIRI, L. C. J.; VIDOTTO, M. C. Virulence Factors and Clonal Relationships among *Escherichia coli* strains Isolated from Broiler Chickens with Cellulitis. *Infection and Immunity*, v. 71, n.7, p.4175-4177, jun., 2003.

BURNS, K.E.; OTAL. ORA, R.; GLISSON, J.R.; HOFACRE, L. Cellulitis in japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Avian Diseases*, v.47, n.1, p.211-214, 2003.

CARR, D., SHAW D, HALVORSON DA, RINGS B, ROEPKE D. Excessive mortality in Market-age turkeys associated with cellulitis. *Avian Disease*, v.40, p.736-741, 1996.

CHANSIRIPORNCHAI, N; RAMASOOTA, P.; SASIPREEYAJAN, J.; SVENSON, S. B. Differentiation of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) strains by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Veterinary Microbiology*, v.80, n.1, maio, p. 75-83, 2001.

CHUBA, P.J.; PALCHAUDHURI, S.; LEON, M.A. Contributions of traT and iss genes to the serum resistance phenotype of plasmid ColV2-K94. *FEMS Microbiology Letters*, v. 37, p. 135-140, 1986.

DAM, T; DAS, P. Plasmids - Potencial tool for the investigation of the gene transfer in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Medical Microbiology*, v.55, n.4, p. 479-480, 2006.

DE REE, J. M.; SCHWILLENS, P.; VAN DEN BOSCH, J. F. Monoclonal antibodies that recognize the P fimbriae F71, F72, F9, and F11 from uropathogenic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*. v.50, n.3, p.900-904, 1985.

DELICATO, E. R. Occurrence of the Temperatura-sensitive hemagglutinin Among *Avian Escherichia coli*. *Avian Disease*, v. 46, p.713-716, 2002.

DELICATO, E.R.; BRITO, B.G.; GAZIRI, L.C.J.; VIDOTTO, M.C. Virulence associated genes in *Escherichia coli* isolates from poultry with colibacillosis. *Veterinary Microbiology*, v. 94, p. 97-103, 2003.

DHO-MOULIN, M.; FAIRBROTHER, J. M. Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Veterinary Research*, v. 30, n.2-3, p.299-316, mar./jun., 1999.

DOETKOTT, D.M.; NOLAN, L.K.; GIDDINGS, C.W.; BERRYHILL, D.L. Large plasmids of avian *Escherichia coli* isolates. *Avian Diseases*, v.40, n.4, p.927-930, 1996.

DOYLE, M. P.; SCHOENI, J. L. Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from retail fresh meats and poultry. *Applied Environmental Microbiology*, v. 53, n. 10, p. 2394-2396, oct., 1987.

EISENSTEIN, B.I. Fimbriae *Escherichia coli* and *Salmonella* Typhimurium: celular and molecular Biology. Edited by: Neidhardt, F.C., Washington, D.C., v. 1, p. 84-90, 1987.

ELFADIL A.A., VAILLANCOURT J.P., MEEK AH, GYLES C.L. A prospective study of cellulites in broiler chickens in Southern Ontario. *Avian Disease*, v.40, p.677-689, 1996a.

ELFADIL A.A., VAILLANCOURT J.P., MEEK A.H., JULIAN R.J., GYLES C.L. Description of cellulites lesions and Associations between cellulites and other categories of condensation. *Avian Disease*, v.40, p.690-698, 1996b.

ELFADIL, A. A.; VAILLANCOURT, J. P.; MEEK, A. H. Impact of stocking density, breed, and feathering on the prevalence of abdominal skin scratches in broiler chickens. *Avian Disease*, v.40, p. 546-552, 1996a.

ELFADIL, A. A.; VAILLANCOURT, J. P.; MEEK, A. H. Farm Management risk factors associated with cellulites in broiler chickens in Southern Ontario. *Avian Disease*, v. 40, p.699-706, 1996b.

EWERS C., JANSSEN T., KIESSLING S., PHILIPP H.C., WIELER L.H.. Molecular epidemiology of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from colisepticemia in poultry. *Veterinary Microbiology*, v.104, p.91-101, 2004.

EWERS, C.; JANBEN, T.; KIEBLING, S.; PHILIPP, H.; WIELER, L.H. Rapid detection of virulence-associated genes in avian pathogenic *Escherichia coli* by Multiplex Polymerase Chain Reaction. *Avian Diseases*, v.49, n.2, p.269-273, 2005.

FALLAVENA, L. C. B. *Enfermidades da Pele e das Penas*. In: BERCHIERI JR, A.; MACARI, M. Doença das Aves. Campinas: FACTA, 2000. 205p. cap. 2, p.37-47.

FALLAVENA, L. C. B. Lesões cutâneas em frangos de corte. Disponível em: < <http://www.fortdodge.com.br/fd/aves/banner-revista/Revista%20Aves%202/lesões.html>. > Acesso em: 5 de agosto de 2006.

FERNANDEZ-BERO, M.E.; KISSEL, V.; LION, H.; CABELLO, F.C. Virulence-related genes in ColV plasmids of *Escherichia coli* isolated from human blood and intestines. *Journal of Clinical Microbiology*, v.28, n.4, p.742-746, 1990.

FERREIRA; A. J. P.; KNOBL, T. *Colibacilose*. In: BERCHIERI JR, A.; SILVA, E. N.; FÁBIO, J. di; SESTI, L.; ZUANAZE, M. A. Z. Doença das Aves. Campinas: FACTA, 2009. 1104p. cap. 4.2, sec. 4, p.457-482.

FOLEY, S.L.; HORNE, S.M.; GIDDINGS, C.W.; ROBINSON, M.; NOLAN, L.K. Iss from a virulent *Escherichia coli*. *Avian Diseases*, v. 44, p. 185-191, 2000.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. *Microorganismos Patogênicos de Importancia em Alimentos*. In:_____. Microbiologia dos Alimentos. São Paulo: Atheneu, 1996. 182p. p.51-55.

GIBBS, P.S.; MAURER, J.J.; NOLAN, L.K.; WOOLEY, E. Prediction of chicken embryo lethality with the avian *Escherichia coli* traits complement resistance, colicin V production, and presence of increased serum survival. gene cluster (iss). *Avian Diseases*, v.47, n.2, p.370-379, 2003.

GIROTTO, A. F.; MIELE, M. Estudos da EMBRAPA – Situação atual e tendências para a avicultura de corte nos próximos anos. Disponível em: <http://www.aviculturaindustrial.com.br/site/dinamica.asp?id=12024&tipo_tabela=produtos&categoria=frango_de_corte> Acesso em: 20 de julho de 2006.

GOES, C. R.; GAZIRI, L. C.; VIDOTTO, M. C. Cloned genes of the aerobactin system of virulent avian *Escherichia coli* do not confer virulence to recombinant strains. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. v.26, n.3, p.261-275, 1993.

GOMES, A. R.; MUNIYAPPA, L.; KRISHNAPPA, G.; SURYANARAYANA, V. V. S.; ISLOOR, S.; HUGAR, P. G.. Genotypic characterization of Avian *Escherichia coli* by random Amplification of Polymorphic DNA. *International Journal of Poultry Science*, v. 4, n.6, p. 378-381, 2005.

GOMIS S.; AMOAKO K. ; NGELEKA M. ; BELANGER L. ; ALTHOUSE B. ; KUMOR L. ; WATERS E. ; STEPHENS S. ; RIDDELL C. ; POTTER A. ; ALLAN B..

Histopathologic and Bacteriologic evaluations of cellulitis detected in legs and caudal abdominal regions of turkeys. *Avian Disease*, v.46, p.192-197, 2002.

GOMIS, S. M.; WATTS, T.; RIDDELL, C.; POTTER, A. A.; ALLAN, B. J. Experimental reproduction of *Escherichia coli* cellulitis and septicemia in broiler chickens. *Avian Disease*, v.41, p.234-240, 1997a.

GOMIS, S.M.; GOODHOPE, R.; KUMOR, L.; CADDY, N.; RIDDELL, C.; POTTER, A.A.; ALLAN, B.J. Isolation of *Escherichia coli* from cellulitis and other lesions of the same bird in broiler at slaughter. *Canadian Veterinary Journal*, v.38, p.159-162, 1997b.

GOMIS, S.M.; RIDDELL, C.; POTTER, A. A.; ALLAN, B. J. Phenotypic and genotypic characterization of virulence factors of *Escherichia coli* isolated from broiler chickens with simultaneous occurrence of cellulitis and other colibacillosis lesions. *The Canadian Journal of Veterinary Research*, v.65, p.1-6, 2001.

GOMIS, S. M. ; GOMIS, A.I.U.; HORADAGODA, N. U.; WIJEWARDENE, T. G. ; ALLAN, B. J.; POTTER, A.A. Studies on cellulitis and other disease syndromes caused by *Escherichia coli* in broilers in Sri Lanka. *Tropical Animal Health and Production*, v.32, p.341-31, 2000.

GOPHNA, U.; OELSCHLAEGER, T.A.; HACKER, J. & RON, E.Z. Yersinia HPI in septicemic *Escherichia coli* strains isolated from diverse hosts. *FEMS Microbiology Letter*, v.196, p.57-60; 2001.

HAMMERUM, A. M., HEUER, O. E. Human health hazards from antimicrobial-resistant *Escherichia coli* of animal origin. *Clinical Infectious Diseases*, v. 48, p. 916-921, abr., 2009.

HIM-ATHONGKHAM, S; RIEMANN, H; BAHARI, S; NUANUALSUWAN, S; KASS, P; CLIVER, D O. Survival of Salmonella Typhimurium and *Escherichia coli* O157:H7 in

poultry manure slurry at sublethal temperatures. *Avian Disease*, v. 52, p.67-75, 2000.

HOLT, J. G.; KRIEG, N. R., SNEATH, P. H., STALEY, J. T. & WILLIAMS, S. T. *Facultatively Anaerobic Gram-Negative Rods*. In:_____. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1994. 787p. cap.5, p.175-255.

JANBEN, T.; SCHWARZ, C.; PREIKSCHAT, P.; VOSS, M.; PHILIPP, H. C.; WIELER, L. H. Virulence-associated genes in avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from internal organs of poultry having died from colibacillosis. *International Journal of Medical Microbiology*, v.291, n.5, p.371-378, 2001.

JEFFREY, J.S; SHIVAPRASAD, H. L; DURAN, L; CARDONA, C.J; CHARLTON, B.R. Facial cellulitis Associated with fowl cholera in comercial turkeys. *Avian Disease*, v.37, p.1121-1129, 1993.

JEFFREY J. S.; NOLAN L. K. ; TONOOKA K. H; WOLFE S.; GIDDINGS C. W. ; HORNE S. M.; FOLEY S. L.; LYNNE A. M.; EBERT J. O. ; ELIJAH L. M.; BJORKLUND G.; PFAFF-MCDONOUGH S. J. ; SINGER R. S.; DOETKOTT C. Virulence factors of *Escherichia coli* from Cellulitis or Colisepticemia Lesions in Chickens. *Avian Disease*, v.46, p. 48-52, 2002.

JEFFREY, J. S.; CHIN, R. P.; SINGER, R. S. Assessing cellulitis pathogenicity of *Escherichia coli* isolates in broiler chickens assessed by an in vivo inoculation model. *Avian Disease*, v.43, p.491-496, 1999.

JOHNSON, J. R. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Clinical Microbiology Reviews*, v.4, n.1, p.80-128, 1991.

JOHNSON, J. R., MURRAY, A. C., GAJEWSKI, A.; SULLIVAN, M.; SNIPPES, P.; KUSKOWSKI, M. A.; SMITH, K. E. Isolation and Molecular Characterization of nalidixic acid-resistant extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* from retail chicken

products. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.47, n.7, p. 2161-2168, julho, 2003.

JOHNSON, J. R.; JOHNSTON, B.; KUSKOWSKI, M. A.; COLODNER, R.; RAZ, R. Spontaneous conversion to quinolone and fluoroquinolone resistance among wild-type *Escherichia coli* isolates in relation to phylogenetic background and virulence genotype. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 49, n. 11, p. 4739-4744, nov., 2005a.

JOHNSON, J. R.; KUSKOWSKI, M. A.; SMITH, K.; O'BRYAN, T. T.; TATINI, S. Antimicrobial-resistant and extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in retail foods. *The Journal of Infectious Diseases*, v.191, p. 1040-1049, 2005b.

JOHNSON, T.J.; GIDDINGS, C.W.; HORNE, S.M.; GIBBS, P.S.; WOOLEY, R.E.; SKYBERG, J.; OLAH, P.; KERCHER, R.; SHERWOOD, J.S.; FOLEY, S.L.; NOLAN, L.K. Location of increased serum survival gene and selected virulence traits on a conjugative R plasmid in an avian *Escherichia coli* isolate. *Avian Diseases*, v. 46, p. 342-352, 2002.

JOHNSON, T. J.; KARIYAWASAM, S.; WANNEMUEHLER, Y.; MANGIAMELE, P.; JOHNSON, S. J.; DOETKOTT, C.; SKYBERG, J. A., LYNNE, A. M., JOHNSON, J. R., NOLAN, L. K. The genome sequence of avian pathogenic *Escherichia coli* strains O1:K1:H7 shares strong similarities with human extraintestinal pathogenic *E. coli* genomes. *Journal of Bacteriology*, v. 189, n. 8, p. 3228-3236, abr., 2007a.

JOHNSON, J. R.; SANNES, M. R.; CROY, C.; JOHNSTON, B.; CLABOTS, C.; KUSKOWSKI, M. A.; BENDER, J.; SMITH, K. E.; WINOKUR, P. L.; BELONGIA, E. A. Antimicrobial drug-resistant *Escherichia coli* from humans and poultry products, Minnesota and Wisconsin, 2002-2004. *Emerging Infectious Diseases*, v.13, n.6, p. 838-846, jun., 2007b.

JOHNSON, J. R.; KUSKOWSKI, M. A.; MENARD, M.; GAJEWSKI, A.; XERCAVINS, M.; GARAU, J. Similarity between human and chicken *Escherichia coli* isolates in

relation to ciprofloxacin resistance status. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 194, p. 71-78, julho, 2006.

JOHNSON, T.J.; SKYBERG, J.; NOLAN, L.K. Multiple antimicrobial resistance region of a putative virulence plasmid from *Escherichia coli* isolate incriminated in avian colibacillosis. *Avian Diseases*, v. 48, p. 351-360, 2004.

KALLENIOUS, G.; MOLLBY, R.; SVENSON, S.B.; WINBERG, J. & HULTBERG, H. . Identification of a carbohydrate receptor recognized by uropathogenic *Escherichia coli*. *Infection* v.8, p.288-293, 1980.

KANUNGO, S.. A simplified analysis different *Escherichia coli* strains by using RAPD technique. *Notulae Botanicae Hort Agrobotanic Cluj*, v. 37, n.2, p. 257-260, 2009.

KAPER, J.B.; NATARO, J.P.; MOBLEY, H.L. Patogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, v.2, n.2, p.123-40, 2004.

KARCH, H.; SCHUBERT, S.; ZHANG, D.; ZHANG, W.; SCHMIDT, H.; OLSCHLAGER, T.; HACKER, J.. A genomic island, termed high pathogenicity island, is present in certain non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* clonal lineages. *Infection and Immunity*, v.67, p. 5994-6001, 1999.

KARIUKI, S.; GILKS, C.; KIMARI, J.; MUYODI, J.; GETTY, B. HART, C.A. Carriage of potentially pathogenic *Escherichia coli* in chickens. *Avian Diseases*, v.46, n.3, p.721-724, 2002.

KARIYAWASAM, S.; SCACCIANOCE, J. A.; NOLAN, L. K. Common and specific genomic sequences of avian and human extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* as determined by genomic subtractive hybridization. *BMC Microbiology*, 2007.

KAWAMORI, F; HIROI, M.; HARADA, T.; OHATA, K.; SUGIYAMA, K.; MASUDA, T.; OHASHI, N. Molecular typing of Japanese *Escherichia coli* O157 :H7 isolates from

clinical specimens by multilocus variable-number tandem repeat analysis and PFGE. *Journal of Medical Microbiology*, v. 57, p. 58-63, 2008.

KEYS, C.; KEMPER, S.; KEIM, P. Highly diverse variable number tandem repeat loci in the *E. coli* O157:H7 and O55:H7 genomes for high-resolution molecular typing. *Journal of Applied Microbiology*, v. 98, p.928–940, 2005.

KILIÇ, A.; MUZ, A.; ERTAS, H. B.; OZBEY, G. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) analysis of *Escherichia coli* isolated from chickens. *F. U. Sag. Bil. Vet Derg.* v. 23, n. 1, p. 1-4, 2009. Disponível em: http://www.fusabil.org/pdf/pdf_FUSABIL_626.pdf. Acesso em 26 de julho de 2010.

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

KUMOR, L. W.; OLKOWSKI, A. A.; GOMIS, S. M.; ALLAN, B. J. Cellulitis in broiler chickens: epidemiological trends, meat hygiene, and possible human health implications. *Avian Diseases*, v.42, n.2, p.285-291, 1998.

LA RAGIONE, R. M.; BEST, A.; SPRIGINGS, K.; LIEBANA, E.; WOODWARD, G. R. Variable and strain dependent colonization of chickens by *Escherichia coli* O157. *Veterinary Microbiology*, v.107, p. 103-113, 2005.

LA RAGIONE, R. M.; WOODWARD, M. J. Virulence factors of *Escherichia coli* serotypes associated with avian colissepticemia. *Research in Veterinary Science*, v.73, p.27-35, 2002.

LATHAM, R.H.; STAMM, W.E. Role of fimbriated *Escherichia coli* in urinary tract infections in adult women: correlation with localization studies. *Journal and Infection Disease*, v. 149, p. 835-840, 1984.

LIOR, H. *Classification of Escherichia coli*. In: GYLES, C.L. *Escherichia coli* in Domestic Animals and Humans, Cab International, UK, p. 31-72, 1994.

MAURER, J. J., LEE, M. D.; LOBSINGER, C.; BROWN, T. P.; MAIER, M.; THAYER, S. G. Molecular typing of avian *Escherichia coli* isolates by random amplification of polymorphic DNA. *Avian Disease*, v. 42, p. 431-451, 1998.

MAYNARD, C.; BEKAL, S.; SANSCHAGRIN, F.; LEVESQUE, R. C.; BROUSSEAU, R.; MASSON, L.; LARIVIÈRE, S.; HAREL, J. Heterogeneity among virulence and antimicrobial resistance gene profiles of extraintestinal *Escherichia coli* isolates from animal and human origin. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 42, n. 12, p. 5444-5452, dez., 2004.

McPEAKE, S. J. W.; SMYTH, J. A.; BALL, H. J. Characterisation of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) associated with colisepticemia compared to faecal isolates from healthy birds. *Veterinary Microbiology*, v.110, p.245-253, 2005.

MENG, J.; FENG, P.; DOYLE, M.P. *Pathogenic Escherichia coli*. In: DOWNES, F.P.; ITO, K. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. 4. ed. Washington, DC: American Public Health Association (APHA), 2001, 676p, Cap.35, p.331-341.

MERCK. *Manual de medios de cultivo*. Darmstadt, Alemanha: MERCK, 1994. 364p.

MESSIER, S.; QUÉSSY, S.; ROBINSON, Y.; DEVRIESE, L. A.; HOMMEZ, J.; FAIRBROTHER, J. M. Focal Dermatitis and Cellulitis in Broiler Chickens: Bacteriological and Pathological Findings. *Avian Disease*, v.37, p.839-844, 1993.

MOKADY, D.; URI-GOPHNA; RON, E. Z. Extensive gene diversity in septicemia *Escherichia coli* strains. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 43, n.1, p.66-73, jan, 2005.

MOULIN-SCHOULEUR, M.; SCHOULER, C.; TAILLIEZ, P.; KAO, M.; BRÉE, A.; GERMON, P.; OSWALD, E.; MAINIL, J.; BLANCO, M.; BLANCO, J. Common

virulence factors and genetic relationships between O18:K1:H7 *Escherichia coli* isolates of human and avian origin. *Journal of Clinical Microbiology*, v.44, n. 10, p. 3484-3492, out., 2006.

NATARO, J.P.; STEINER, T.; GUERRANT, R.L. Enteroaggregative *Escherichia coli*. *Emerging Infection Disease Journal*, n.4, p.251-261, 1998

NEILANDS, J. B. Iron absorption and transport in microorganisms. *Annu. Rev. Nutr.* v.1, p.27-46, 1981.

NEILANDS, J. B.; BINDEREIF, A.; MONTGOMERIE, J. Z. Genetic basis of iron assimilation in pathogenic *Escherichia coli*. *Curr. Topics in Microbiology and Immunology*, v. 118, p.179-195, 1985.

NGELEKA, M.; KWAGA, J. K; WHITE, D. G; WHITTAM, T. S; RIDDELL, C; GOODHOPE, R; POTTER, A. A; ALLAN, B. *Escherichia coli* cellulitis in broiler chickens: clonal relationship among strains and analysis of virulence-associated factors of isolates from disease birds. *Infection and. Immunology*, v.64, p. 3118-3126, 1996.

NGELEKA, M.; BRERETON, L.; BROWN, G.; FAIRBROTHER, J. M. Pathotypes of avian *Escherichia coli* as related to tsh-, pap-, pil-, and iuc-DNA sequences, and antibiotic sensitivity of isolates from internal tissues and the cloacae of broilers. *Avian Disease*, v.46, n.1, p.143-152, 2002.

NOLAN L.K. , GIDDINGS, C.W.; HORNE, S.M.; DOETKOTT, C.; GIBBS, P.S.; WOOLEY, R.E.; FOLEY, S.L. Complement resistance, as determined by viable count and flow cytometric methods, and its association with the presence of iss and the virulence of avian *Escherichia coli*. *Avian Diseases*, v.46, n.2, p.386–392, 2002.

NORTON, R. A. Avian Cellulitis. *Word's Poultry Science Journal*, v. 53, p.338-349, dez., 1997.

NORTON, R. A.; MACKLIN, K. S.; McMURTRY, B. L. Evaluation of scratches as an essential element in the development of avian cellulitis in broiler chickens. *Avian Disease*, v.43, p.320-325, 1999.

NORTON, R. A.; MACKLIN, K. S.; McMURTRY, B. L. The association of various isolates of *Escherichia coli* from the United States with induced cellulitis and colibacillosis in young broiler chickens. *Avian Pathology*, v.29, p.571-574, 2000.

OJENIYI, A.A. Direct transmission of *Escherichia coli* from poultry to humans. *Epidemiology and Infection*, v.103, p.513-522, 1989.

OKEKE, I.N.; SCALETSKY, I.C.A.; SOARS, E.H.; MACFARLANE, L.R. & TORRES, A.G. Molecular epidemiology of the iron utilization genes of enteroaggregative *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Microbiology*, v.42, p. 36-44, 2004.

OLKOWSKI, A.A; KUMOR, L; JOHNSON, D; BIELBY, M; CHIRINO-TREJO, M; CLASSEN, H. L. Cellulitis lesions in commercial turkeys identified during processing. *The Veterinary Record*, v.145, p.228-229, ago., 1999.

OLSEN, A.; JONSSON, A.; NORMARK, S. Fibronectin binding mediated by a novel class of surface organelles on *Escherichia coli*. *Nature*, v. 338, p. 652-655, 1989.

ONDERKA, D. K.; HANSON, J. A.; McMILLAN, K. R. ; ALLAN, B. *Escherichia coli* Associated Cellulitis in Broilers: Correlation with Systemic Infection and Microscopic Visceral Lesions, and Evaluation for Skin Trimming. *Avian Disease*, v.41, p.935-940, 1997.

PARREIRA, V. R.; GYLES, C. L. Shiga toxin genes in avian *Escherichia coli*. *Veterinary Microbiology*, v.87, p.341-352, 2002.

PEIGHAMBARI, S. M. ;VAILLANCOURT, J. P; WILSON R. A; GYLES, C. L .
Characteristics of *Escherichia coli* Isolates from Avian Cellulitis. *Avian Disease*, v.
39, p. 116-124, 1995a.

PEIGHAMBARI, S. M.; JULIAN, R. J; VAILLANCOURT, J. P; GYLES, C. L.
Escherichia coli cellulitis: Experimental infections in broiler chickens. *Avian Disease*,
v.39, p.125-134, 1995b.

PELLUDAT, C.; RAKIN, A.; JACOBI, C.A.; SCHUBERT, S.;HEESEMAN, J. .The
yersiniabactin biosynthetic gene cluster of *Yersinia enterocolitica* organization and
siderophore dependent regulation. *The Journal of Bacteriology*, v.180, p. 539-546,
1998.

PFAFF-MCDONOUGH, S. J.; HORNE, S. M.; GIDDINGS, C. W.; EBERT, J. O.;
DOETKOTT, C.; SMITH, M. H.; NOLAN, L. K. Complement resistance-related traits
among *Escherichia coli* isolates from apparently healthy birds and birds with
colibacillosis. *Avian Disease*. v.44, p.23-33, 2000.

PROVENCE, D. L.; CURTISS, R. Isolation and characterization of a gene involved in
hemagglutination by an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. *Infection and
Immunity*. v.62, n.4, p.1369-1380, 1994.

RADU, S.; ALIAS, R.; RUSUL, G.; LIHAN, S.; LING, O. W.. Analysis of *Escherichia
coli* O157:H7 isolates from beef by RAPD-PCR and Plasmid profiles. *Pakistan
Journal of Biology Science*, v. 3, n. 4, p. 558-561, 2000.

RAMCHANDANI, M.; MANGES, A. R.; DeBROY, C.; SMITH, S. P.; JOHNSON, J.
R.; RILEY, L. W. Possible Animal Origin of human-associated. Multidrug-resistant,
uropathogenic *Escherichia coli*. *Clinical Infectious Diseases*, v. 40, p.251-257, jan.,
2005.

RANDALL, C. J., MEAKINS, P. A.; HARRIS, M. P.; WATT, D.J. A new skin disease in broilers? *The Veterinary Record*, v.114, p.246, mar., 1984.

ROCHA, A.C.G.P.; SILVA, A.B.; BRITO, B.G.; MORAES, H.L.S.; PONTES, A.P.; CÉ, M.C.; NASCIMENTO, V.P.; SALLE, C.T.P. Virulence factors of avian pathogenic *Escherichia coli* isolated from broilers from the south of Brazil. *Avian Disease*, v.46, n.3, p.749-753, 2002.

RODRIGUEZ-SIEK, K. E.; GIDDINGS, C. W.; DOETKOTT, C.; JOHNSON, T. J.; FAKHR, M. K.; NOLAN, L. K. Comparison of *Escherichia coli* isolates implicated in human urinary tract infection and avian colibacillosis. *Microbiology*. v.151, p.2097-2110, 2005.

ROHRBACH, M. R.; BRAUN, V.; KOSTER, W. Ferrichrome transport in *Escherichia coli* K-12: altered substrate specificity of mutated periplasmic FhuD and interaction of FhuD with the integral membrane protein FhuB. *The Journal of Bacteriology*, v.177, p.7186-7193, 1995.

RADU, S.; ALIAS, R.; RUSUL, G.; LIHAN, S.; LING, O. W.. Analysis of *Escherichia coli* O157:H7 isolates from beef by RAPD-PCR and Plasmid profiles. *Pakistan Journal of Biology Science*, v. 3, n. 4, p. 558-561, 2000.

SAHILA, A. M.; AUDREY, L. Y. Y.; ONG, S. L.; WAN SAKEENAH, W. N.; SAFIYYAH, S.; NORRAKIAH, A. S.; AMINAH, A.; AHMAD AZUHAIRI, A. DNA profiling among egg and beef meat isolates of *Escherichia coli* by enterobacterial repetitive intergenic consensus-PCR (ERIC-PCR) and random amplified polymorphic DNA-PCR (RAPD-PCR). *International Food Research Journal*, v. 17, p. 853-866, 2010.

SALEHI, T. Z.; MADANI, S.A.; KARIMI, V.; KHAZAELI, F. A.. Molecular genetic differentiation of avian *Escherichia coli* by RAPD-PCR. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 39, p. 494-497, 2008.

SAMADPOUR, M.; ONGERTH, J. E.; LISTON, J.; TRAN, N.; NGUYEN, D.; WHITTAM, T. S.; WILSON, R.; TARR, P. I. Occurrence of shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* in retail fresh seafood, beef, lamb, pork, and poultry from Grocery Stores in Seattle, Washington. *Applied and Environmental Microbiology*, v.60, n.3, p.1038-1040, mar., 1994.

SCHRADER, J. S.; SINGER, R. S.; ATWILL, E. R. A prospective study of management and litter variables associated with cellulitis in California broiler flocks. *Avian Disease*, v. 48, p.522-530, 2004.

SILVA, E. N.; MOTA, M. P. Celulite em Frangos de Corte. Disponível em: <http://www.fatec.com.br/trabtec/celulite_em_frangos_de_corte.htm > Acesso em: 27 de novembro de 2003.

SKYBERG, J.A.; HORNE, S.M.; GIDDINGS, C.W.; WOOLEY, R.E.; GIBBS, P.S.; NOLAN, L. Characterizing avian *Escherichia coli* isolates with multiplex polymerase chain reaction. *Avian Disease*, v.47, n.4, p.1441-1447, 2003.

SKYBERG, J. A.; JOHNSON, J. T.; JOHNSON, J. R.; CLABOTS, C.; LOGUE, C. M.; NOLAN, L. K. Acquisition of avian pathogenic *Escherichia coli* plasmids by a commensal *E. coli* enhances its abilities to kill chicken embryos, grow in human urine, and colonize the murine kidney. *Infection and Immunity*, v. 74, n. 11, p. 6287-6292, nov., 2006.

STATHOPOULOS, C.; PROVENCE, D.L.; CURTISS, R. Characterization of the avian pathogenic hemagglutinin Tsh, a member of the immunoglobulin A protease type family of autotransports. *Infection and Immunity*, v.67, p.772-781, 1999.

STAVRIC, S.; BUCHANAN, B.; GLEESON, T. M. Intestinal colonization of young chicks with *Escherichia coli* O157:H7 and other verotoxin-producing serotypes. *Journal of Applied Bacteriology*, v. 74, n.5, p.557-563, maio, 1993.

STEHLING, E.G.; TOMOMASA, Y.; BROCCHI, M.; SILVEIRA, W.D. Characterization of a plasmid-encoded adhesin of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) strain isolated from a case of Swollen Head Syndrome (SHS). *Veterinary Microbiology*, v.95, n.2, p.111-120, 2003.

St-HILAIRE, S.; ARELLANO, S.; RIBBLE, C. Association between cellulitis (Enlarged Ecternal Bursa) and focal ulcerative dermatitis in Notario turkeys at the time of processing. *Avian Disease*, v.47, p.531-536, 2003.

TIVENDALE, K.A.; ALLEN, J.L.; GINNS, C.A.; CRABB, B.S.; BROWNING, G.F. Association of *iss* and *iucA*, but not *tsh*, with plasmid-mediated virulence of avian pathogenic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, v.72, n.11, p.6554-6560, 2004.

TORTORA, G. J., FUNKE, B. R.; CASE, C. L.. *Anatomia funcional das células procarióticas e eucarióticas*. In:_____.Microbiologia. Porto Alegre: Artmed, 2003. 6 ed. 822p. cap 4 p. 76-110.

TRABULSI, L.R.; TOLEDO, M.R.F. *Microbiologia*. Rio de Janeiro: Atheneu, 1991, p.386.

VARNAN, A. H.; EVANS, M. G. *Foodborn Pathogens. An Illustrated Text*. London: Marison Publishing, 1996. 557p

VIDOTTO, M. C.; CACAO; J. M.; GOES, C. R.; SANTOS, D. S. Plasmid coding for aerobactin production and drug resistance is involved in virulence of *Escherichia coli* avian strains. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v.24, n.7, p.649-675, 1991.

VIEIRA, T. B. *Celulite em frangos de corte sob inspeção sanitária – aspectos anatomo-patológicos e bacteriológicos*. Niterói, 2006. Dissertação (Mestrado em Higiene veterinária e processamento Tecnológico de produtos de Origem Animal) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Niterói. 2006.

VINCENT, C.; BOERLIN, P.; DAIGNAULT, D.; DOZOIS, C. M.; DUTIL, L.; GALANAKIS, C.; REID-SMITH, R. J.; TELLIER, P.; TELLIS, P. A.; ZIEBELL, K.; MANGES, A. R. Food reservoir for *Escherichia coli* causing urinary tract infections. *Emerging Infectious Diseases*, v. 16, n. 1, p. 88-95, jan., 2010.

VOGEL, L.; OORSCHOT, E. VAN; MAAS, H. M. E.; MINDERHOUD, B.; DIJKSHOORN, L. Epidemiologic typing of *Escherichia coli* using RAPD analysis, robotyping and serotyping. *Clinical Microbiology Infection*, v. 6, p. 82-87, 2000.

WARREN, R. E.; ENSOR, V. M.; O'NEIL, P.; BUTLER, V., TAYLOR, J.; NYE, K.; HARVEY, M.; LIVERMORE, D. M.; WOODFORD, N.; HAWKEY, P. M. Imported chicken meat as a potential source of quinolone-resistant *Escherichia coli* producing extended-spectrum β -lactamases in the UK. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 61, p. 504-508, 2008.

6 APÉNDICES

APÊNDICE 6.1 Dendograma das estirpes de *E. coli* diferenciadas pelo RAPD - amostras de celulite e miúdos de sete frangos numerados de 1 a 7.

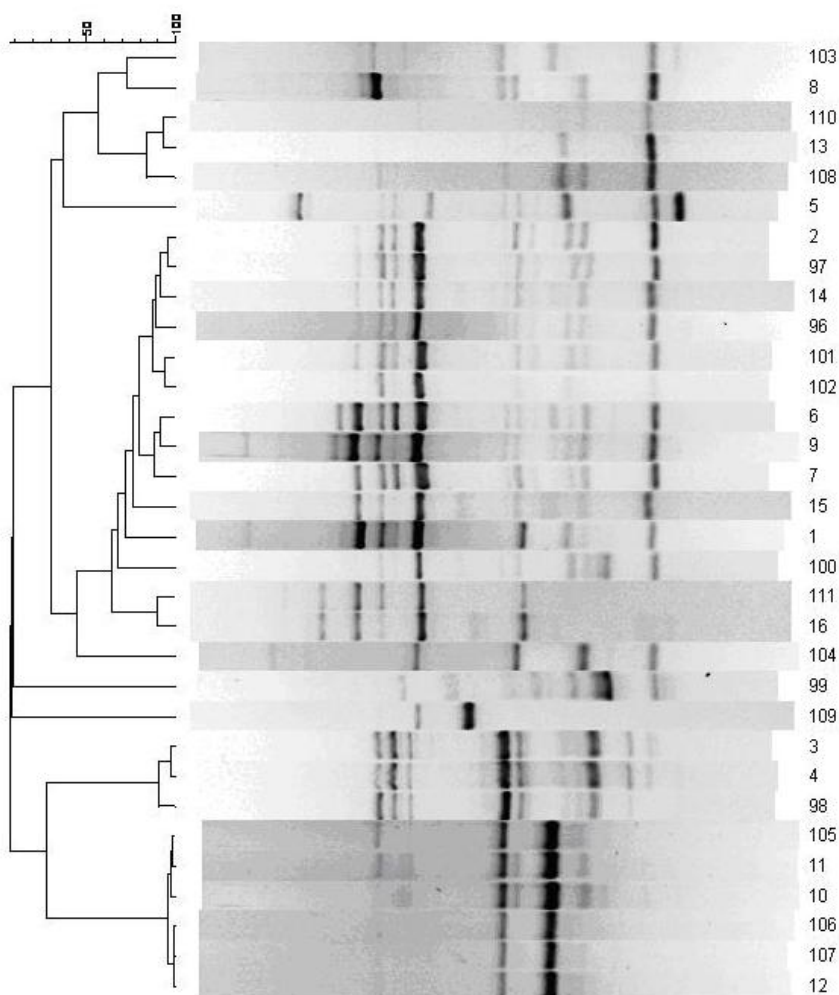


Tabela: Identificação das estirpes de *E. coli* isoladas em duplicata (A; B) de celulite e miúdos (fígado e/ou coração) a partir de sete frangos numerados de 1 a 7.

FRANGOS	LOCALIZAÇÃO DOS ISOLADOS - ESTIRPES (A; B) EM CELULITE E MIÚDOS (FÍGADO E/OU CORAÇÃO)
FRANGO n.1	CEL (1; 96)
FRANGO n.2	CEL (2; 97) + FIG (3; 98) + COR (4; 99)
FRANGO n.3	CEL (5; 100) + FIG (6; 101) + COR (7;102)
FRANGO n.4	CEL (8; 103) + FIG (9; 104)
FRANGO n. 5	CEL (10; 105) + FIG (11; 106) + COR (12; 107)
FRANGO n.6	CEL (13; 108)
FRANGO n.7	CEL (14; 109) + FIG (15; 110) + COR (16; 111)

Legenda: CEL (isolamento de *E.coli* em lesão de celulite – número dado à estirpe “A”; número dado à estirpe “B”); FIG (isolamento de *E.coli* em fígado de frango com lesão de celulite – numeração dada à estirpe “A” isolada do fígado; numeração dada à estirpe “B” isolada do fígado); COR (isolamento de *E.coli* em coração de frango com lesão de celulite – numeração dada à estirpe “A” isolada do coração; numeração dada à estirpe “B” isolada do coração).

APÊNDICE 6.2 Dendograma das estirpes de *E. coli* diferenciadas pelo RAPD - amostras de celulite e miúdos de oito frangos numerados de 8 a 15.

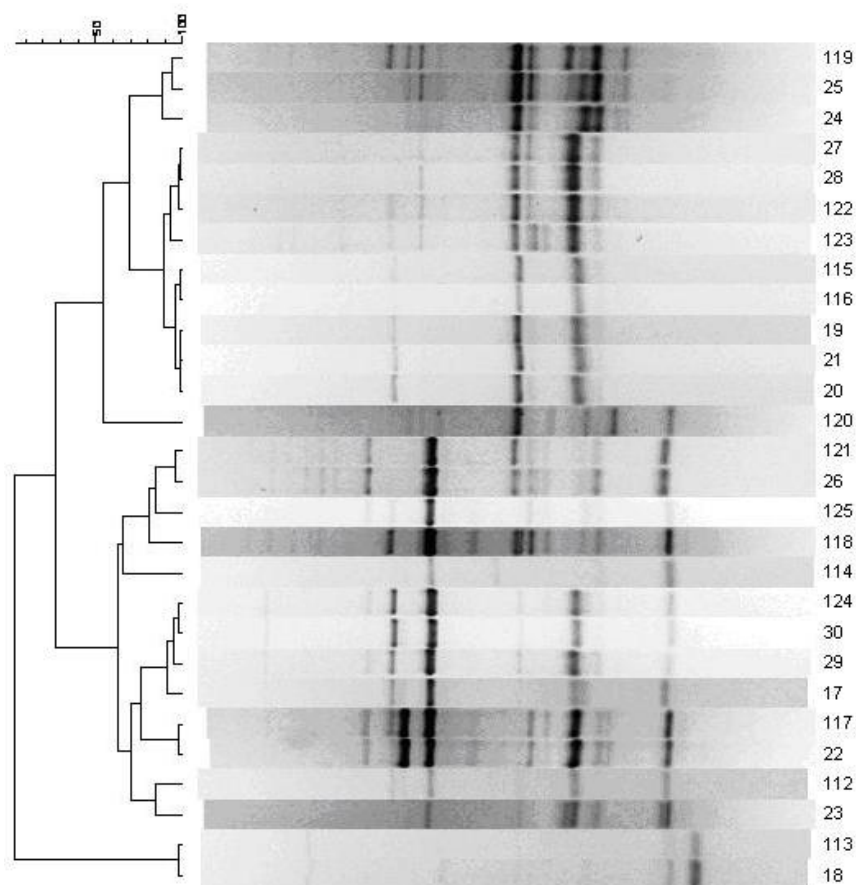


Tabela: Identificação das estirpes de *E. coli* isoladas em duplicata (A; B) de celulite e miúdos (fígado e/ou coração) a partir de oito frangos numerados de 8 a 15.

FRANGOS	LOCALIZAÇÃO DOS ISOLADOS - ESTIRPES (A; B) EM CELULITE E MIÚDOS (FÍGADO E/OU CORAÇÃO)
FRANGO n.8	CEL (17; 112) + COR (18; 113)
FRANGO n.9	CEL (19; 114) + FIG (20; 115) + COR (21; 116)
FRANGO n.10	CEL (22; 117)
FRANGO n.11	CEL (23; 118)
FRANGO n.12	CEL (24; 119) + FIG (25; 120)
FRANGO n.13	CEL (26; 121) + FIG (27; 122) + COR (28; 123)
FRANGO n.14	CEL (29; 124)
FRANGO n.15	CEL (30; 125)

Legenda: CEL (isolamento de *E.coli* em lesão de celulite – número dado à estirpe “A”; número dado à estirpe “B”); FIG (isolamento de *E.coli* em fígado de frango com lesão de celulite – numeração dada à estirpe “A” isolada do fígado; numeração dada à estirpe “B” isolada do fígado); COR (isolamento de *E.coli* em coração de frango com lesão de celulite – numeração dada à estirpe “A” isolada do coração; numeração dada à estirpe “B” isolada do coração).

APÊNDICE 6.3 Dendograma das estirpes de *E. coli* diferenciadas pelo RAPD - amostras de celulite e miúdos de oito frangos numerados de 16 a 23.

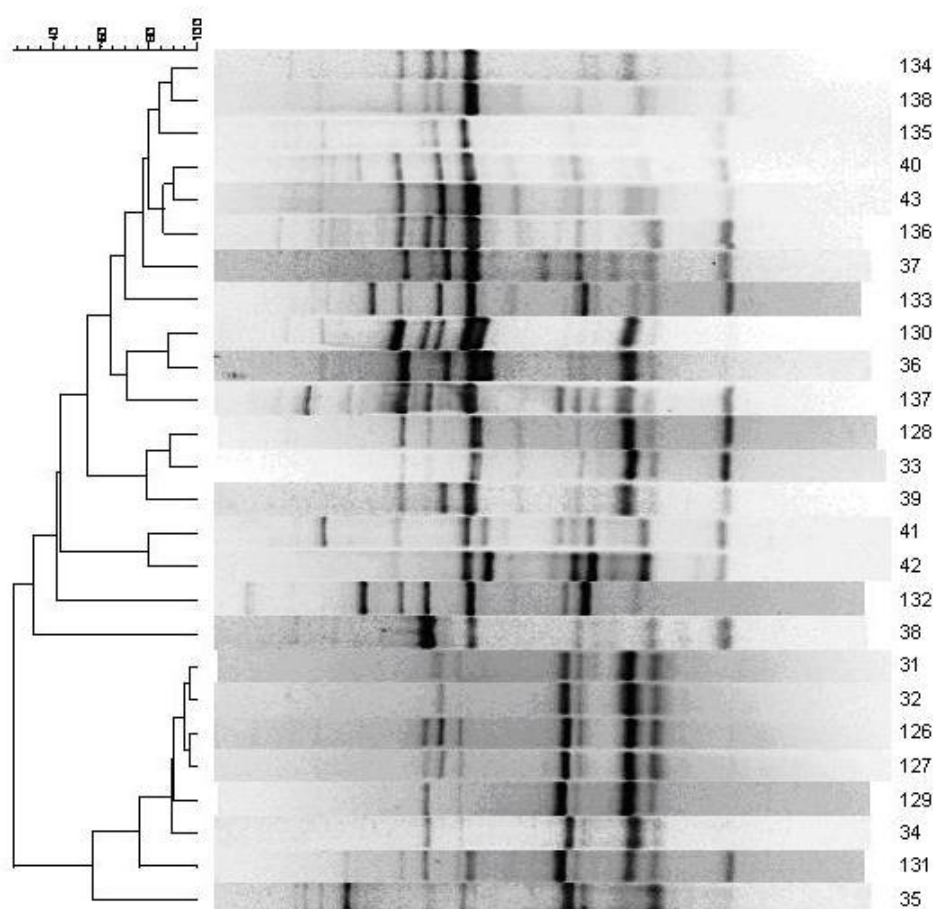


Tabela: Identificação das estirpes de *E. coli* isoladas em duplicata (A; B) de celulite e miúdos (fígado e/ou coração) a partir de oito frangos numerados de 16 a 23.

FRANGOS	LOCALIZAÇÃO DOS ISOLADOS - ESTIRPES (A; B) EM CELULITE E MIÚDOS (FÍGADO E/OU CORAÇÃO)
FRANGO n.16	CEL (31; 126) + FIG (32; 127)
FRANGO n.17	CEL (33; 128) + COR (34; 129)
FRANGO n.18	FIG (35; 131) + COR (36; 130)
FRANGO n.19	CEL (37; 132)
FRANGO n.20	CEL (38; 133) + FIG (39, 134)
FRANGO n.21	CEL (40; 135)
FRANGO n.22	CEL (41; 136)
FRANGO n.23	CEL (42; 137) + COR (43; 138)

Legenda: CEL (isolamento de *E.coli* em lesão de celulite – número dado à estirpe “A”; número dado à estirpe “B”); FIG (isolamento de *E.coli* em fígado de frango com lesão de celulite – numeração dada à estirpe “A” isolada do fígado; numeração dada à estirpe “B” isolada do fígado); COR (isolamento de *E.coli* em coração de frango com lesão de celulite – numeração dada à estirpe “A” isolada do coração; numeração dada à estirpe “B” isolada do coração).

APÊNDICE 6.4 Dendograma das estirpes de *E. coli* diferenciadas pelo RAPD - amostras de celulite e miúdos de nove frangos numerados de 24 a 32.

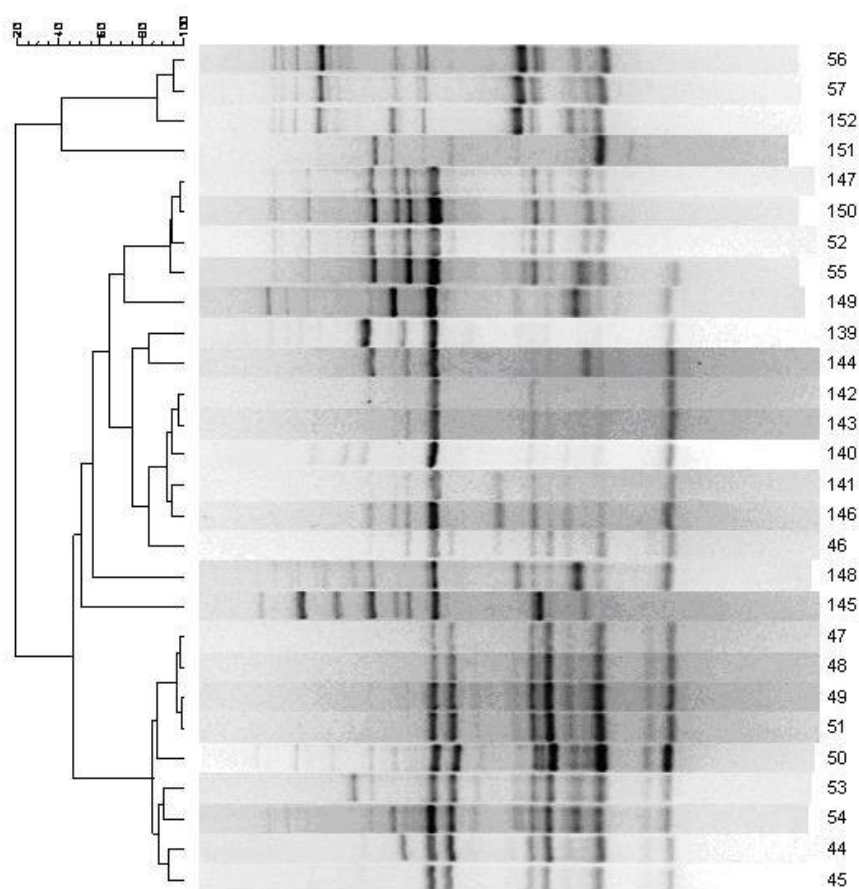


Tabela: Identificação das estirpes de *E. coli* isoladas em duplicata (A; B) de celulite e miúdos (fígado e/ou coração) a partir de nove frangos numerados de 24 a 32.

FRANGOS	LOCALIZAÇÃO DOS ISOLADOS - ESTIRPES (A; B) EM CELULITE E MIÚDOS (FÍGADO E/OU CORAÇÃO)
FRANGO n.24	CEL (44; 139) + FIG (45; 140)
FRANGO n.25	CEL (46; 141)
FRANGO n.26	CEL (47; 142) + FIG (48; 143)
FRANGO n.27	CEL (49; 144) + COR (50; 145)
FRANGO n.28	CEL (51; 146)
FRANGO n.29	CEL (52; 147)
FRANGO n.30	CEL (53; 148) + FIG (54; 149)
FRANGO n.31	CEL (55; 150) + FIG (56; 151) + COR (57; 152)
FRANGO n.32	CEL (44; 139) + FIG (45; 140)

Legenda: CEL (isolamento de *E.coli* em lesão de celulite – número dado à estirpe “A”; número dado à estirpe “B”); FIG (isolamento de *E.coli* em fígado de frango com lesão de celulite – numeração dada à estirpe “A” isolada do fígado; numeração dada à estirpe “B” isolada do fígado); COR (isolamento de *E.coli* em coração de frango com lesão de celulite – numeração dada à estirpe “A” isolada do coração; numeração dada à estirpe “B” isolada do coração).

APÊNDICE 6.5 Dendograma das estirpes de *E. coli* diferenciadas pelo RAPD - amostras de celulite e miúdos de oito frangos numerados de 33 a 40.

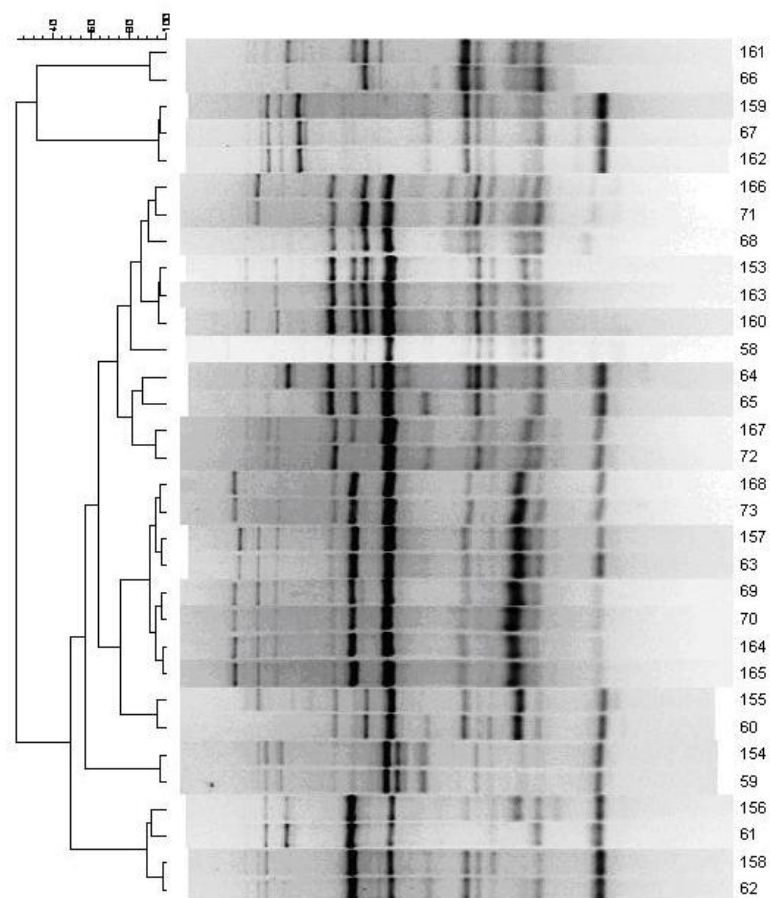


Tabela: Identificação das estirpes de *E. coli* isoladas em duplicata (A; B) de celulite e miúdos (fígado e/ou coração) a partir de oito frangos numerados de 33 a 40.

FRANGOS	LOCALIZAÇÃO DOS ISOLADOS - ESTIRPES (A; B) EM CELULITE E MIÚDOS (FÍGADO E/OU CORAÇÃO)
FRANGO n.33	CEL (58; 153)
FRANGO n.34	CEL (59; 154) + FIG (60; 155)
FRANGO n.35	CEL (61; 156) + FIG (62; 158) + COR (63; 157)
FRANGO n.36	CEL (64; 159)
FRANGO n.37	CEL (65; 160) + FIG (66; 161) + COR (67; 162)
FRANGO n.38	CEL (68; 163) + FIG (69; 164) + COR (70; 165)
FRANGO n.39	CEL (71; 166)
FRANGO n.40	CEL (72; 167) + COR (73; 168)

Legenda: CEL (isolamento de *E.coli* em lesão de celulite – número dado à estirpe “A”; número dado à estirpe “B”); FIG (isolamento de *E.coli* em fígado de frango com lesão de celulite – numeração dada à estirpe “A” isolada do fígado; numeração dada à estirpe “B” isolada do fígado); COR (isolamento de *E.coli* em coração de frango com lesão de celulite – numeração dada à estirpe “A” isolada do coração; numeração dada à estirpe “B” isolada do coração).

APÊNDICE 6.6 Dendograma das estirpes de *E. coli* diferenciadas pelo RAPD - amostras de celulite e miúdos de sete frangos numerados de 41 a 47.

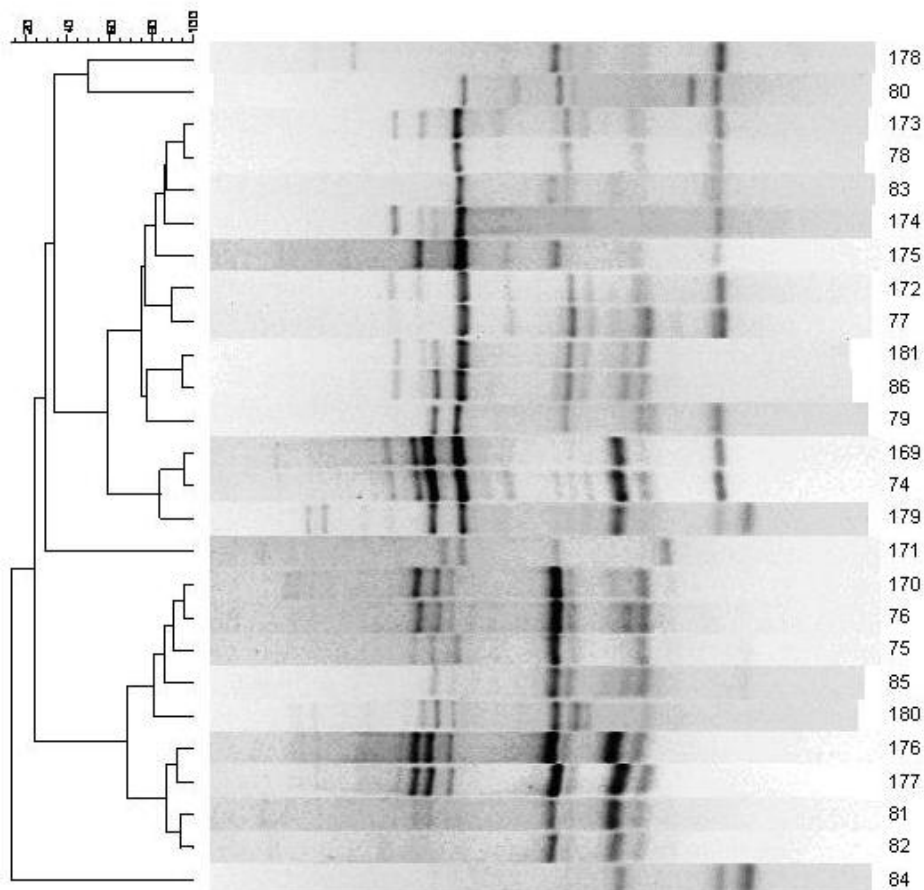


Tabela: Identificação das estirpes de *E. coli* isoladas em duplicata (A; B) de celulite e miúdos (fígado e/ou coração) a partir de sete frangos numerados de 41 a 47.

FRANGOS	LOCALIZAÇÃO DOS ISOLADOS - ESTIRPES (A; B) EM CELULITE E MIÚDOS (FÍGADO E/OU CORAÇÃO)
FRANGO n.41	CEL (74; 169) + FIG (75; 170) + COR (76; 171)
FRANGO n.42	CEL (77; 172)
FRANGO n.43	CEL (78; 173)
FRANGO n.44	CEL (79; 174)
FRANGO n.45	CEL (80; 175) + FIG (81; 176) + COR (82; 177)
FRANGO n.46	CEL (83; 178)
FRANGO n.47	CEL (84; 179) + FIG (85; 180) + COR (86; 181)

Legenda: CEL (isolamento de *E.coli* em lesão de celulite – número dado à estirpe “A”; número dado à estirpe “B”); FIG (isolamento de *E.coli* em fígado de frango com lesão de celulite – numeração dada à estirpe “A” isolada do fígado; numeração dada à estirpe “B” isolada do fígado); COR (isolamento de *E.coli* em coração de frango com lesão de celulite – numeração dada à estirpe “A” isolada do coração; numeração dada à estirpe “B” isolada do coração).

APÊNDICE 6.7 Dendograma das estirpes de *E. coli* diferenciadas pelo RAPD - amostras de celulite e miúdos de quatro frangos numerados de 48 a 51.

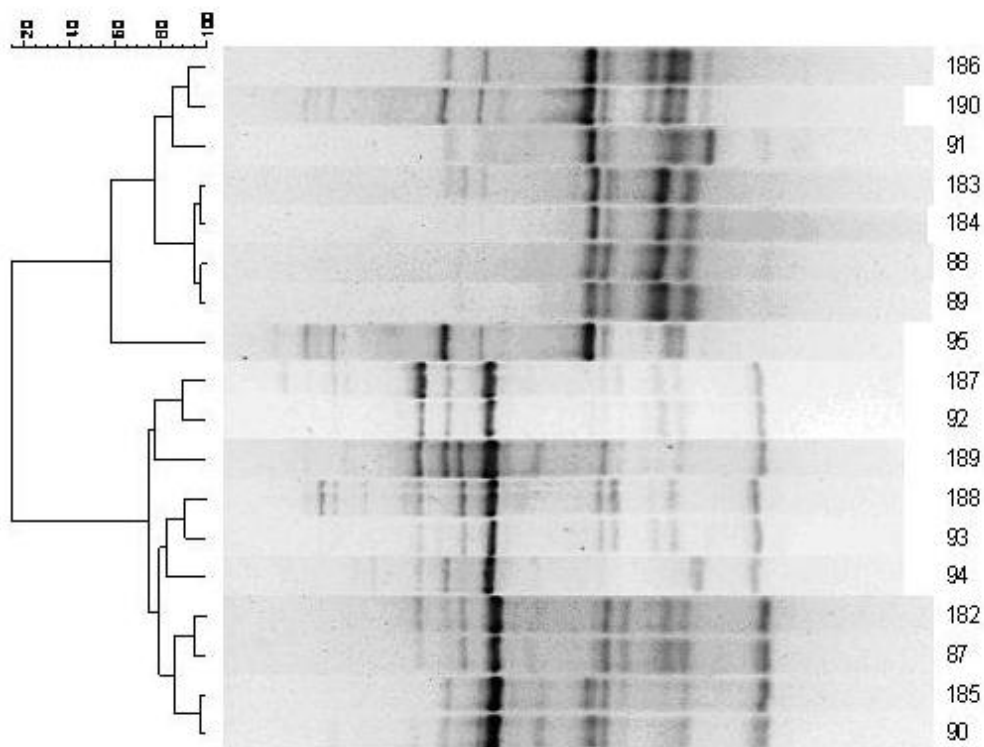


Tabela: Identificação das estirpes de *E. coli* isoladas em duplicata (A; B) de celulite e miúdos (fígado e/ou coração) a partir de quatro frangos numerados de 48 a 51.

FRANGOS	LOCALIZAÇÃO DOS ISOLADOS - ESTIRPES (A; B) EM CELULITE E MIÚDOS (FÍGADO E/OU CORAÇÃO)
FRANGO n.48	CEL (87; 182) + FIG (88; 183) + COR (89; 184)
FRANGO n.49	CEL (90; 185) + FIG (91; 186)
FRANGO n.50	CEL (92; 187) + FIG (93; 188)
FRANGO n.51	CEL (94; 189) + FIG (95; 190)

Legenda: CEL (isolamento de *E.coli* em lesão de celulite – número dado à estirpe “A”; número dado à estirpe “B”); FIG (isolamento de *E.coli* em fígado de frango com lesão de celulite – numeração dada à estirpe “A” isolada do fígado; numeração dada à estirpe “B” isolada do fígado); COR (isolamento de *E.coli* em coração de frango com lesão de celulite – numeração dada à estirpe “A” isolada do coração; numeração dada à estirpe “B” isolada do coração).