

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**ESTABELECIMENTO DE UMA NOVA METODOLOGIA PARA O CÁLCULO  
DO ÍNDICE DE PATOGENICIDADE EM AMOSTRAS DE *ESCHERICHIA  
COLI* PROVENIENTES DA PRODUÇÃO DE FRANGO DE CORTE.**

**Dissertação de Mestrado**

**Guilherme Fonseca de Souza**

Porto Alegre

2006

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE VETERINÁRIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**ESTABELECIMENTO DE UMA NOVA METODOLOGIA PARA O CÁLCULO  
DO ÍNDICE DE PATOGENICIDADE EM AMOSTRAS DE *ESCHERICHIA  
COLI* PROVENIENTES DA PRODUÇÃO DE FRANGO DE CORTE**

AUTOR: Guilherme Fonseca de Souza  
Dissertação apresentada como requisito  
parcial para a obtenção do grau de  
Mestre em Ciência Veterinárias na  
Área de Sanidade Avícola do programa  
de Pós-graduação em Ciências  
Veterinárias da UFRGS.  
Orientador: Prof. Dr. Carlos Tadeu  
Pippi Salle

Porto Alegre  
2006

GUILHERME FONSECA DE SOUZA

Estabelecimento de uma nova metodologia para o cálculo do índice de patogenicidade em amostras de *Escherichia coli* provenientes da produção de frango de corte

Aprovada em 21 de FEV de 2006

Aprovado por:

---

Prof. Dr. Carlos Tadeu Pippi Salle

Orientador e Presidente da Comissão

---

Prof. Dr. Benito Guimarães Brito

---

Prof. Dr. Sérgio José de Oliveira

---

Prof. Dr. Hamilton Luiz de Souza Moraes

“A meus pais e irmã , minha idéia  
de "família" : fortaleza e fé.”

## AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Carlos Tadeu Pippi Salle, pela orientação e amizade nos melhores – e piores momentos, de todo o tempo que aqui passei.

Ao Dr. Hamilton Luiz de Souza Moraes, pelas proveitosas conversas, além da atenção a mim dispensada.

Aos colegas de laboratório: Sílvio Luís Rocha, Ana Cristina da Rocha, Priscila Pinto, Jaqueline Ouriques, Flávia Fortes, Felipe Salle, Luciane Camargo e Anderlise Borsoi, pela boa convivência e ajuda em meu experimento.

Aos estagiários Tatiane Lima, Fabrício Imperatore, Gabriela Bettiol, Rafael Peruzzolo, José Roberto Bastos, Vanessa de Ávila, Débora Leal, Thiago Kirst, Caroline Hiller, Daniela Pinheiro, Gabriel Lima, que, das mais variadas formas, contribuíram para a realização de meu trabalho.

Aos meus novos irmãos Lucas Brunelli de Moraes e Jairo Ramos de Jesus, que entraram em minha vida no início dessa nova fase e sem os quais, hoje, não imagino minha caminhada.

Aos Funcionários Omar de Oliveira, Luiz Henrique Ribas e Felipe Ribas pelo apoio e amizade.

## RESUMO

Essa dissertação possui como objetivo traçar, uma nova metodologia de classificação de patogenicidade da *Escherichia.coli*, através de um índice no qual, além do número de animais mortos, também foi considerado o tempo de morte e a capacidade da cepa causar lesão compatível à colibacilose em pintos de 1 dia. Para gerar esse critério, foram utilizadas 300 amostras de *E.coli* oriundas de lotes com lesão de celulite, cama desses mesmos aviários e amostras de quadros respiratórios. Através desse experimento foi possível observar que as amostras de *E.coli* originadas das camas dos aviários, apresentavam índice de patogenicidade significativamente menor do que aquelas isoladas das lesões cutâneas e de quadros respiratórios. Também foi associado às cepas de *E.coli* a capacidade de causar lesões de: pericardite, perihepatite, aerossaculite, peritonite e celulite. Dentre as lesões citadas somente a celulite foi considerada de apresentação significativamente mais freqüente em comparação às outras.

## ABSTRACT

That dissertation possesses as objective to trace, a new methodology for the classification of patogenicity of *Escherichia coli* through an index in which, besides the number of dead animals, it was also considered the time of death and the capacity of the isolate to cause compatible lesion to the colibacillosis in day old chicken To generate that approach, 300 samples of E.coli were used originating from flocks with cellulitis lesions, litter of and samples of respiratoru symptions. Through of that experiment it was possible to observe that the samples, originated from litter of the presented patogenicity index significantly smaller than those isolated of cutaneous lesions and of respiratory signs. It was also associated to the isolates of *E. coli* the capacity to cause lesions of pericarditis, perihepatitis, aerossaculitis, peritonitis and cellulite. Among the lesions mentioned only the cellulite were considered significantly of more frequent in comparison the other ones.

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1</b>	Distribuição das amostras de <i>Escherichia coli</i> conforme o grupo do Índice de Patogenicidade e desconsiderando a origem das amostras.	32
<b>FIGURA 2</b>	Retirada do tecido subcutâneo com exposição da musculatura peitoral	33
<b>FIGURA 3</b>	Abertura da cavidade celomática em uma ave sadia	33
<b>FIGURA 4</b>	Retirada do tecido subcutâneo com exposição da musculatura peitoral com lesão de celulite	33
<b>FIGURA 5</b>	Abertura da cavidade celomática com lesão de perihepatite e pericardite.	33

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Exemplo do estabelecimento do índice de patogenicidade de uma amostra de <i>E. coli</i> utilizada no experimento .....	30
<b>Tabela 2</b> – Distribuição das amostras de <i>Escherichia coli</i> conforme o grupo do Índice de Patogenicidade considerando a origem das amostras e a estação.....	33
<b>Tabela 3</b> - Média dos Índices de Patogenicidade de <i>Escherichia coli</i> , conforme a origem das amostras .....	34
<b>Tabela 4</b> - Índice de Patogenicidade de <i>E. coli</i> isoladas de lesões cutâneas e de camas em duas estações do ano.....	34
<b>Tabela 5</b> - Índice de Patogenicidade de acordo com a estação do ano e da origem do isolamento da <i>Escherichia coli</i> .....	35
<b>Tabela 6</b> - Agrupamento de patogenicidade (Brito,2001) <i>versus</i> Índice de Patogenicidade, desconsiderando a origem das amostras.....	35
<b>Tabela 7</b> - Índices de patogenicidade de amostras de <i>E.coli</i> presentes em três diferentes granjas de uma integração avícola.....	36
<b>Tabela 8</b> - Comparação entre as lesões apresentadas no traçado do Índice de Patogenicidade, desconsiderando a fonte da amostra.....	36
<b>Tabela 9</b> - Presença de aerossaculite induzida pelas amostras de <i>E. coli</i> de acordo com a origem do isolamento.....	37
<b>Tabela 10</b> - Presença de peritonite induzida pelas amostras de <i>E. coli</i> de acordo com a origem do isolamento.....	37
<b>Tabela 11</b> - Presença de perihepatite induzida pelas amostras de <i>E. coli</i> de acordo com a origem do isolamento.....	38
<b>Tabela 12</b> - Presença de pericardite induzida pelas amostras de <i>E. coli</i> de acordo com a origem do isolamento.....	39
<b>Tabela 13</b> - Presença de celulite induzida pelas amostras de <i>E. coli</i> de acordo com a origem do isolamento.....	39
<b>Tabela 14</b> – Dia de morte dos animais de acordo com a estação do ano e da origem do isolamento da <i>Escherichia coli</i> .....	40

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	11
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	14
2.1 A <i>Escherichia coli</i> .....	14
2.2 A colibacilose aviária.....	15
2.3 A celulite aviária.....	15
2.3.1 Caracterização das lesões de celulite.....	16
2.3.2 A etiologia da celulite aviária .....	17
2.3.3 Lesões de celulite concorrente com outras causas de condenação por colibacilose .....	18
2.3.4 A celulite aviária e os riscos a saúde pública .....	19
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
3.1 Amostra bacteriana.....	27
3.2 Inoculo.....	27
3.3 Animais.....	27
3.4 Via de inoculação.....	28
3.5 Observação dos animais.....	28
3.6 Estabelecimento de critérios para a determinação do índice de patogenicidade.....	28
3.7 Análise estatística.....	28
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
5 CONCLUSÃO.....	41
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42

## 1 INTRODUÇÃO

No ano de 2005, a receita com as exportações atingiu cerca de US\$ 3,5 bilhões referente a 2,8 milhões de toneladas de carne de frango. Este número correspondeu a um aumento de, aproximadamente, 35% em relação ao ano anterior, e com isso posicionou o Brasil como primeiro exportador mundial, com isso ampliando a nossa lista de parceiros econômicos de 100 para 122 países.

Nossas vendas ainda foram prejudicadas pelo aumento das taxas protecionistas da União Européia, por exemplo, o aumento de 15% para 79% da sobretaxa do corte de peito de frango salgado e o sistema de cotas da Rússia.

Apesar desses fatores negativos, fomos beneficiados pelo surgimento de problemas sanitários em alguns países, tais como a Alemanha, a Bélgica, a Holanda e a China, acarretando um acréscimo significativo nas atividades de exportação. No entanto, vale a pena lembrar, que 75% da produção de carne de frango é destinada ao mercado interno.

O sucesso dessa atividade é garantido principalmente pelo sistema de integração, que possibilita que milhares de pequenos produtores tenham acesso à moderna tecnologia de produção, ao processamento e à comercialização do produto final pelas grandes indústrias. O produto avícola de qualidade e competitivo e as rigorosas políticas de controle sanitário, adotadas pelo Brasil, permitem ao País garantir seu *status* de país livre das doenças listadas pelo Escritório Internacional de Epizootias (O.I.E), estas impeditivas ao comércio internacional.

Por outro lado, nos atuais modelos de produção têm-se observado o aumento da ocorrência de várias doenças que prejudicam a qualidade final do produto, entre estas, destacam-se as colibaciloses e, entre elas as lesões cutâneas, tais como a celulite aviária.

A avicultura é o ramo do agronegócio que mais utiliza tecnologias modernas de produção e de gerenciamento. Dentro deste espírito empreendedor, as empresas têm

montado laboratórios próprios ou contratado serviço de terceiros, para a verificação do controle de qualidade dos seus produtos. Portanto, é comum entre o pessoal da indústria avícola o uso de termos que seriam mais comumente usados entre aqueles que pertencem à comunidade acadêmica. Fala-se, com naturalidade, de testes sorológicos, como ensaio imuno-enzimático (ELISA) ou de procedimentos de biologia molecular, como a reação em cadeia da polimerase (PCR). Estas técnicas modernas já são rotineiramente utilizadas nos diagnósticos das enfermidades avícolas e/ou na monitorização do controle de qualidade dos plantéis ou produtos.

Entre os exames mais realizados para o diagnóstico das enfermidades avícolas está o tradicional exame bacteriológico. Este, no caso das colibaciloses, retorna ao médico veterinário no campo um laudo onde diz somente “isolado *Escherichia coli* da amostra enviada”. Ora, esta informação parcimoniosa reflete a pouca utilização que é dada a outras tecnologias que buscam informar adequadamente o médico veterinário clínico e, assim, oferecer-lhe uma melhor orientação de como proceder. É freqüente, quando se consulta a literatura sobre colibacilose aviária que se encontre um bom número de trabalhos que relatam diferentes formas para conhecer a patogenicidade das amostras isoladas, enquanto outros publicam trabalhos científicos sobre testes laboratoriais que dão a conhecer os fatores de virulência presentes nas amostras estudadas e quais os genes que os controlam. Estranhamente, nada muda no laudo final e ele continua engessado na mesma informação oferecida há muitos anos que é: “isolado *Escherichia coli* da amostra enviada”.

As universidades e a indústria avícola brasileira estão atentas a uma tendência que cresce no mundo todo, o bem estar animal. Para atender esta expectativa a avicultura terá que ajustar alguns procedimentos do processo de produção. Os laboratórios de diagnóstico e de pesquisa, por uma questão ética, deverão adaptar-se às novas limitações na experimentação que utiliza animais. Desta forma, o desenvolvimento de alternativas que possibilitem reduzir significativamente o sacrifício de animais na busca do crescimento científico, sempre será positiva.

A presente dissertação objetiva realizar o traçado da patogenicidade de um grande número de amostras de *E. coli* isolados da cama dos aviários, de quadros respiratórios e de

lesões cutâneas de frangos de corte em uma mesma região do sul do Brasil. Pretende, também, que trabalhos futuros a serem realizados no Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária (CDPA) possam utilizar o banco de dados aqui gerados para simular, e prever, a patogenicidade de novas amostras da bactéria sem a necessidade de recorrer ao sacrifício de outros animais.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 A *Escherichia coli*

A *Escherichia coli* é uma bactéria pertencente a família das Enterobacteriaceae, possui morfologia de bacilo curto, gram negativo, não esporulado e mede de 2 a 3µm de comprimento por 0,6 µm de largura. Em sua maioria, são móveis e o fazem através de flagelos peritríquios (BEER,1988).

Possui metabolismo aeróbico e anaeróbio facultativo, cresce em temperaturas de 18 a 44° C, porém sua temperatura ideal de crescimento é de 37° C. Nas provas bioquímicas é positiva para vermelho de metila (VM) e catalase e negativo para Vogues Proskauer (VP) e oxidase. Não é capaz de utilizar a uréia como única fonte de nitrogênio, descarboxila os aminoácidos arginina, lisina e ornitina e possui, como principal característica, fermentar glicose produzindo ácido e gás (GYLES, 1994).

No ano de 1947, Kauffman propôs um esquema de classificação baseado no perfil de três antígenos bacterianos, através de provas sucessivas de soroglutinação. O antígeno flagelar “H” pode ser identificado pela seqüência de aminoácidos que compõe a unidade fundamental do flagelo, a flagelina. Essa, não resiste ao tratamento térmico de 100° C, tornando-se instável. Já o antígeno somático “O” compõe o corpo da bactéria e possui estabilidade após tratamento térmico. Por outro lado, o antígeno “K” que faz parte da cápsula bacteriana quando presente em quantidade suficiente possui função antifagocitária. Inicialmente, se conhecia 25 antígenos “O”, 55 antígenos “K” e 20 antígenos “H”. Atualmente, são conhecidos 173 antígenos “O”, 103 antígenos “K” e 56 antígenos “H” (Bettelheim & Thomas,2006) e, freqüentemente, se desenvolvem pesquisas em que se associa uma doença a um certo sorogrupo de *E.coli*.

Sua distribuição é cosmopolita e esta bactéria é o principal habitante do trato gastrointestinal de mamíferos e de aves. Nos aviários é possível encontrar 10<sup>9</sup> UFC/grama de fezes e 10<sup>6</sup>UFC/grama estarão presentes na poeira, tornando praticamente impossível a eliminação deste agente no ambiente (HARRY & HEMSLEY, 1965).

## 2.2 A colibacilose aviária

A Colibacilose é a denominação comum a diferentes grupos de lesões causadas pela bactéria *E.coli* com propriedades patogênicas, presentes no meio ambiente e/ ou em animais doentes. São lesões comuns entre as aves domésticas: aerossaculite, pericardite, peritonite, onfalite, salpingite, sinovite e celulite. São duas as formas de entrada na qual a *E.coli* pode chegar às vias respiratórias do animal: danificando o trato respiratório superior, ou associando-se a algum fator que o tenha produzido, e ou através de imunodepressão anterior (NAKAMURA *et al.*, 1992). Exceto no caso da infecção via saco da gema a *E.coli* necessita de um fator que a torne potencialmente patogênica (BARNES & GROSS, 1997).

A síndrome respiratória acomete freqüentemente aves de 2 a 12 semanas de idade. Normalmente, o lote apresenta alta morbidade e baixa letalidade, porém existem casos nos quais a doença se complica e pode se observar uma alta letalidade. As aves doentes apresentam estertores respiratórios, secreção nasal de composição variável, retardo no crescimento e diminuição nos índices de conversão alimentar. (FERREIRA & KNÖBL, 2000).

Uma vez inalada, a bactéria necessita aderir ao epitélio traqueal e esse momento é fundamental para que se desenvolva a doença. A partir daí, ocorre a colonização e a invasão de outros órgãos, provocando quadros de septicemia e de lesões como a pericardite e perihepatite. Portanto, a ciliostase causada por um agente primário como o pneumovírus aviário, o vírus da bronquite infecciosa, a Doença de Newcastle, entre outros, favorece a instalação da colibacilose. A associação entre a *E.coli* e um, ou mais, agentes infecciosos gera um quadro respiratório denominado doença crônica respiratória. Outro quadro que pode ser observado é a Síndrome da Cabeça Inchada. Nela, ocorrem edema de face, celulite facial e secreção óculo-nasal. A bactéria pode aproveitar-se de quadros provocados por agentes não infecciosos, como excesso de amônia no ambiente e falta de ventilação e aumentar o dano aos animais. (BARNES & GROSS, 1997).

### 2.3.1 A celulite aviária

A celulite é uma inflamação purulenta e difusa que acomete o tecido subcutâneo, embora se manifeste em vários planos teciduais. Na superfície da pele, pode ser observado um espessamento de coloração acastanhada, ou vermelha amarronzada, o que torna a lesão fácil de ser visualizada na linha de abate. A celulite pode vir acompanhada de crostas, de hiperemia e de uma lesão semelhante a um “favo de mel”. Quando a pele é removida, nota-se um variado grau de edema subcutâneo e de exsudato, podendo aprofundar-se até a musculatura. Neste local, causará hemorragias em forma de petéquias. A principal característica da celulite, é a presença de uma placa fibrinopurulenta de consistência sólida (MESSIER *et al.*, 1993; ELFADIL *et al.*, 1996; FALLAVENA *et al.*, 2000)

Na microscopia óptica, a celulite é caracterizada por hiperqueratose moderada e hiperplasia de epiderme. A derme apresenta espessamento fibroso e neovascularização, além de infiltração difusa de heterófilos e de linfócitos. Alguns animais ainda apresentam granulomas e invasão de células inflamatórias no tecido subcutâneo. Também, podem ser observados os capilares da musculatura congestos. Observam-se grumos bacterianos com células inflamatórias próximas às camadas de fibrina. Esse conteúdo fica circundado por uma cápsula de tecido conectivo contendo heterófilos, linfócitos e macrófagos (MESSIER *et al.*, 1993; PEIGHAMBARI *et al.*, 1995; ONDERKA *et al.*, 1997).

### **2.3.1 Caracterização das lesões de celulite**

Lesões de celulite em abatedouros são descritas da seguinte forma: possuem área de 1 x 2 cm<sup>2</sup> a 4 x 10 cm<sup>2</sup> e com espessura de 3-5 mm, porém, em alguns casos, pode ser observada uma massa semi-sólida com superfície de 1x2 cm. (GOMIS *et al.*, 1997). Em experimentos que visam induzir a lesão em aves com mais de 20 dias de idade as características das lesões são as mesmas das observadas em abatedouros; (JEFFREY *et al.*, 1999).

Observando a localização de lesões ao abate Elfadil *et al.*, (1996) e Fallavena *et al.*, (2000), estes últimos trabalhando com dados brasileiros, obtiveram resultados semelhantes, quanto à localização destas mesmas lesões nos animais. Os primeiros autores ao observarem 295 carcaças com celulite, encontraram a seguinte distribuição de lesões: abdome (89,7%), coxa (5,8%) e dorso (1,0%). Fallavena *et al.*, (2000) também verificaram resultados semelhantes encontrando em 340 amostras de celulite a seguinte distribuição: abdome (80,66%), coxa (9,6%) e dorso (2,2%). Depois de analisar 340 carcaças de frango condenadas por celulite, Fallavena *et al.*, (2000) notaram que algumas lesões freqüentemente acompanhavam a lesão principal, tais como espessamento de pele (86,18%), coloração amarelo-acastanhada de pele (61,05%), aparência do tipo “waffle” da derme, erosão e úlcera (25%), arranhões (72,09%) e crostas (18,5%) na epiderme.

### 2.3.2 Etiologia da celulite aviária

A celulite aviária é uma doença de etiologia multifatorial, pois são necessários, pelo menos, dois fatores para a sua ocorrência. Em primeiro, está a necessidade de um trauma qualquer resulte em ferimento na pele, independente da razão, em segundo a presença maciça de contaminação bacteriana por *E.coli* (NORTON *et al.*, 1997). Os fatores de risco que levam ao trauma são diversos e resultam no aparecimento da celulite. A densidade, porque, quanto mais agrupados estiverem os animais, maior será o contato e a competição entre eles. A proporção entre machos e fêmeas, já que machos são mais agressivos e possuem um tempo de empenamento mais tardio em comparação com as fêmeas. Assim sendo, ficam mais vulneráveis, pois as áreas cobertas por penas são mais protegidas. A cama dependendo do material que seja composta. A palha, por exemplo, pode possuir extremidades pontiagudas que, por sua vez levariam ao trauma e, acrescente-se, camas mal manejadas são verdadeiros sítios de crescimento bacteriano, inclusive para a *E. coli* (ELFADIL *et al.*, 1996).

Também são fatores relacionados à celulite o diâmetro de superfície do peito, a velocidade em ganho de peso, o uso de probióticos que ao inibirem as bactérias gram

positivas, podem favorecer a propagação da *E.coli* e o manejo alimentar. Algumas patologias podem aumentar a incidência de celulite em um lote, entre elas estão a ascite e as deformidades valgus e valrus, doenças que dificultam a mobilidade do animal (ELFADIL *et al.*, 1996).

### **2.3.3 Lesões de celulite concorrentes com outras causas de condenação por colibacilose**

Ordenka *et al.*, (1997) analisaram a prevalência de lesões de celulite e de outras lesões sistêmicas associadas em uma mesma carcaça. Constataram que 12,5% dessas carcaças possuíam ao menos uma lesão, além da celulite. Os mesmos autores, ainda citam que os 30,5% de prevalência de lesões de colibacilose encontrados por GOMIS *et al.*, (1997), provavelmente, estariam ligados ao baixo número de lotes observados.

Esses resultados levam a questionar se a *E.coli* que gera celulite é a mesma que origina outras formas de colibacilose. Dois estudos transversais, um com 118 e outro com 236 carcaças condenadas por celulite, chegaram aos seguintes resultados: 36% das carcaças do primeiro estudo apresentavam outras lesões de colibacilose concomitante com a de celulite. No segundo experimento, o mesmo autor constatou que em 34,6% das carcaças havia, ao menos, mais uma lesão de colibacilose, além da lesão de celulite. Essas lesões eram pericardite (19/237), aerossaculite (21/237), osteomielite (26/237), polisserosite(4/237) e perihepatite(4/237). Essas últimas amostras de *E.coli* foram testadas verificando-se o perfil genotípico e fenotípico e se mostraram diferentes quanto aos fatores de virulência, indicando que a celulite não leva à manifestação de outras colibaciloses e nem as colibaciloses levam à celulite. O que existe, na verdade, são fatores de risco em comum entre a celulite e as outras formas de colibacilose (GOMIS *et al.*, 1997; GOMIS *et al.*, 2000).

É possível se isolar *E.coli* da maioria das lesões de celulite. Em um estudo que utilizou 115 carcaças, o índice foi de 97,5% e foram associados os sorogrupos O<sub>78</sub>, O<sub>2</sub>, O<sub>1</sub> e O<sub>85</sub> ao aparecimento da celulite. Nesse mesmo trabalho, 60% das amostras isoladas pertenciam aos três primeiros sorogrupos. Entretanto, outros agentes foram, eventualmente,

isolados das lesões e houve o registro da presença de *Pasteurella multocida*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter agglomerans*, *Proteus vulgaris* e *Streptococcus dysgalactiae* (PEIGHAMBARI *et al.*, 1995).

#### 2.3.4 A celulite aviária e os riscos à saúde pública

É importante ressaltar que nunca houve associação entre um caso de intoxicação alimentar no homem e a presença de celulite aviária. Entretanto, existe semelhança entre o perfil genético da *E.coli* proveniente de celulite e a mesma bactéria causadora de septicemia e meningite em humanos. Existe o risco da *E.coli* de origem aviária servir de banco de genes de resistência para os patógenos presentes em humanos (KUMOR *et al.*, 1998). Ao se compararem bactérias provenientes de amostras de celulite e de aerossaculite com amostras de pacientes doentes de uma mesma região geográfica, concluiu-se que as *E.coli* aviárias diferiam, fenotípica e genotipicamente, das que causavam doenças nos humanos (CAYA *et al.*, 1999).

A *E.coli* também desempenha papel fundamental para que ocorra a celulite. Admitindo-se que somente 10 a 15% das *E.coli* presentes nas fezes causam algum tipo de doença, esse grupo de bactérias patogênicas, provavelmente, possui fatores de virulência que as diferenciam das não patogênicas. Esse conjunto de bactérias capazes de produzir dano aos animais recebeu a denominação de *E.coli* Patogênicas às Aves (HARRY & HEMSLEY, 1965; GYLE, 1994).

A realização de testes fenotípicos e genotípicos propicia o conhecimento dos principais fatores de virulência da *E.coli*. Entretanto, as publicações científicas atuais tendem a associar a presença de genes de eleição com um teste *in vivo* para que essa bactéria seja considerada patogênica. Os testes em animais proporcionam um conhecimento da real capacidade da bactéria invadir, colonizar e se replicar em seu hospedeiro. Não se pode afirmar somente através do perfil genético que os genes contidos na bactéria venham a se expressar e causar alguma doença. Deve ser acrescentado que interação entre a presença de dois, ou mais, genes não pode ser visualizada em provas *in vitro* (MOURA *et al.*, 2001).

Os fatores de virulência, frequentemente associados à patogenicidade em amostras de lesão de celulite, são a resistência sérica, a produção de colicina e areobactina, o flagelo, a fimbria P, produção do antígeno K<sub>1</sub> e a fimbria F (VIDOTTO *et al.*, 1990 ;POURBAKSH *et al.*, 1997;NOLAN *et al.*, 2003; DELICATO *et al.*, 2003).

Com relação ao perfil de patogenicidade de amostras de *E.coli* de origem respiratória Rocha *et al.*, (2002) constataram que nas 63 amostras investigadas eram frequentemente expressos os seguintes fatores de virulência: produção de colicina, resistência sérica, a presença do operon *pap* e capacidade de hemaglutinar hemácias de galinha. Embora quando esses fatores de virulência foram analisados em conjunto a variação de combinações foi muito diversa, caracterizando assim que, no campo, as amostras possuem perfis muito diversos para obedecerem a um padrão.

Normalmente, os testes de patogenicidade se dividem em quatro categorias: o teste em animais com mais de 15 dias de vida, os ensaios em pintos de um dia, o teste de LD<sub>50</sub> e a inoculação em ovos embrionados.

O teste em animais com mais de 15 dias de vida tem por objetivo reproduzir a lesão de celulite já os ensaios em pintos de um dia, ou com idade próxima a esta, levam os pintinhos à morte e a uma série de lesões sistêmicas. Essa última alternativa é mais utilizada quando associada a experimentos envolvendo o estudo do perfil genético. A inoculação em pintos também é utilizada para estabelecer a concentração em unidades formadoras de colônia suficientes para matar 50 % dos animais inoculados (DOZOIS *et al.*, 1992; NGELEKA *et al.*, 2002; DELICATO *et al.*, 2003).

A inoculação em ovos embrionados surge como uma nova alternativa para modelos de patogenicidade *in vivo*. Ao relacionarem essa nova modalidade de inoculação com métodos já empregados, através das vias endovenosa, subcutânea e intratraqueal, foi possível observar uma forte correlação entre o desafio em ovos embrionados e a alta mortalidade quando se empregavam as vias subcutânea e intravenosa. A via intratraqueal

mostrou baixa letalidade em relação a outras vias de inoculação, embora entre as amostras utilizadas na via intratraqueal tenham ocorrido diferenças nos quadros de mortalidade e morbidade. Esses achados estariam relacionados com o potencial individual de cada amostra em causar doença (GIBBS *et al*, 2004).

Dentre os autores que trabalham com testes de patogenicidade em animais jovens é comum o uso do conceito de dosagem letal a 50% (LD50), que significa a dose necessária para que morram 50% dos animais inoculados. Para mensurar a patogenicidade de lesões de celulite é comum o uso da via subcutânea (SC).(DOZOIS *et al.*, 1992; NGELEKA *et al.*, 2002). Já para testes usando cepas de lesões respiratórias, ou de colisepticemia, a via mais comum é através dos sacos aéreos (POURBAKHSI *et al.*, 1997;DOZOIS *et al.*, 2000; ASSIS, 2001).

O que caracteriza os testes de patogenicidade de *E.coli* em pintos de um dia de idade com amostras provenientes de lesões de celulite é que, embora se consiga reproduzir as lesões de celulite, o que, freqüentemente, se observa é a alta mortalidade nos primeiros dias após a inoculação da bactéria e a presença de lesões septicêmicas no pintinho (NORTON,2000). A septicemia aguda por *E.coli* mata as aves em bom estado corporal e, normalmente, sem lesões macroscópicas, o que indica a natureza aguda da infecção. Quando encontradas, as lesões observadas são o fígado esverdeado e pontos necróticos, a musculatura peitoral congesta (GROSS,1997).

Johnson *et al.*, (2001) ao inocularem aves com diferentes idades (4, 7, 10, 16, 28 e 52 dias) observaram que esses animais apresentaram celulite em todas as idades, porém as aves entre 4 e 16 dias apresentaram lesões características de outras formas de colibacilose e alta mortalidade até 2 dias após a inoculação.

Um dos primeiros experimentos realizados para comparar amostras patogênicas e apatogênicas de *E. coli* foi executado por Dho & Lafont., (1982). O trabalho tinha como objetivo relacionar índice de letalidade em pintos de 1 dia, capacidade de adesão e resistência sérica. Esses mesmos autores utilizaram 5 pintos de 1 dia e inocularam 0,1 ml de

solução de BHI contendo  $10^9$  UFC/ml *E.coli* , através da via subcutânea. A partir daí, os animais foram observados por 4 dias e registrado o índice de morte a cada 24 horas.

Animais que recebem *E.coli* patogênica provenientes de lesão de celulite podem desenvolver a lesão em menos de 18 horas após a inoculação. Porém, após 6 horas do período pós-inoculação, já se pode observar uma lesão amarelo rosada de característica sero-sanguinolenta que, provavelmente, resultará na lesão de celulite, quando a infecção for resolvida. No experimento em questão, a persistência da lesão de celulite se manteve por um período de 3 semanas (NORTON *et al.*, 1997).

Gomis *et al.* , (1997) verificaram que ao inocular aves de 25 dias de idade com doses variando entre  $10^9$ UFC/ml a  $10^5$  UFC/ml por via (SC), em 6 horas após inoculação os animais exibiam sintomas respiratórios suaves. Neste período de tempo, foi encontrado no sangue contagens bacterianas oscilando entre  $4 \times 10^2$  a  $1 \times 10^4$  UFC/ml e foi registrado que o número de bactérias foi decrescendo com o passar do tempo, mas ainda se manteve contável por até 3 dias.

O isolamento da bactéria após inoculação é dependente do local de inoculação. Ou seja, é possível isolar *E.coli* de lesões de celulite até 14 dias após a indução da lesão. O tempo máximo para se isolar a bactéria do fígado, do sangue e do coração foi de 7 dias (POURBAKHSH *et al.*, 1997). Embora a bactéria seja eliminada em poucos dias do organismo a infecção, quando resolvida, resulta em grande quantidade de fibrina nos órgãos acometidos. Devido ao curto período do ciclo de produção de frango de corte essas lesões provavelmente acompanharão o animal até o momento do abate (GOMIS *et al.*, 1997).

Cepas bacterianas oriundas de quadros respiratórios, inoculadas em aves com 12 dias de idade, na dose de 0,1 ml  $10^8$ UFC/ml, induziram o surgimento de sinais respiratórios sutis algumas horas pós-inoculação. Na necropsia destes animais, já era possível visualizar edema nos sacos aéreos. Após 24 horas da inoculação, os animais já se mostravam moribundos ou morreram, apresentando lesões de aerossaculite com intensidade de moderada a severa e exsudato fibrino purulento (POURBAKHSH *et al.*, 1997).

Na tentativa de explicar melhor a patogenicidade das amostras em estudo, os autores se valem de diversas formas de avaliação. Em razão disto, a literatura oferece uma grande variedade de métodos, majoritariamente baseados em critérios subjetivos e, conseqüentemente, de difícil reprodução.

Macklin *et al.*, (1999) ao desafiar em aves de 28 dias de idade por via SC, com uma dose de 1ml contendo  $1 \times 10^6$  UFC/ml, estabeleceram um critério de classificação das lesões que variou de zero a quatro. No escore zero não foram detectadas lesões de celulite. Já o escore 1, correspondia a lesão menor que 2cm de diâmetro e infiltração muscular mínima. No escore 2 era observado um quarto (1/4) do total do peito coberto por lesão de celulite e infiltração muscular moderada. O escore 3 estava representado pelas lesões que cobriam a metade da massa total do peito e podia ser visualizada infiltração muscular severa. Finalmente, no escore 4, o peito achava-se completamente tomado pela lesão e esta era acompanhada por severa infiltração muscular.

Peighambari *et al.*,(1995) ao avaliarem a função do trauma no desenvolvimento da celulite e relacionarem a capacidade de formar a lesão com amostras de diferentes origens, sugeriram que, baseado no aspecto macroscópico da lesão, poderia dividi-las em quatro grupos. No primeiro grupo colocaria as aves com ausência de lesão. O segundo, seria composto por animais com pele de coloração amarelada suave, lesões cutâneas com menos de  $5 \text{ cm}^2$  de área e ausência de hemorragia. No terceiro, poderiam ser observadas aves com pele de coloração amarela moderada, área de lesão entre  $5$  e  $10 \text{ cm}^2$  e ausência de hemorragia. O quarto grupo conteria os animais com severas lesões na pele com área maior que  $10 \text{ cm}^2$  e presença de hemorragias.

Peighambari *et al.*, (1995) desenvolveram conceitos de severidade de lesão microscópicas e se basearam em alterações na cápsula do tecido conectivo, contagem de células inflamatórias por campo e presença de neo-vascularização. Desta forma, “sem lesão” significaria ausência de tecido conectivo de cápsula, ausência de heterófilos, 1 a 2 linfócitos por campo e ausência de neo-vascularização. Na categoria “lesão leve” estariam os quadros

histológicos caracterizados pelo domínio de tecido conectivo maduro composto por colágeno, menos de 10 heterófilos e 3 a 5 linfócitos por campo e ausência de neo-vascularização. Como “lesão intermediária” seriam classificadas as lesões histológicas que apresentassem quantidades iguais no tecido conectivo de tecido celular e tecido conectivo com colágeno, 10 a 50 heterófilos, 6 a 10 linfócitos e ausência de neo-vascularização. Por último, um quadro de “lesão severa” seria representado por grande quantidade de tecido conectivo jovem, mais de 50 heterófilos e 10 linfócitos por campo e presença de neo-vascularização .

Mellata *et al.*, (2003) ao inocularem aves com 25 dias no saco aéreo, desenvolveram um critério para classificar as lesões de septicemia. Para tanto, levaram em consideração as lesões presentes nos sacos aéreos , no fígado e no coração. O escore proposto era construído da seguinte maneira: saco aéreo (0- normal; 1- leve edema; 2- espessamento difuso, neovascularização e escudado fibrinoso leve; 3- escudado fibrinoso moderado e 4- exsudato fibrinoso severo). As lesões cardíacas foram agrupadas como: 0- sem lesão; 1- líquido pericárdico turvo; 2- pericardite aguda . O último grupo dizia respeito às lesões hepáticas que foram assim divididas: 0- sem lesão; 1- pequena quantidade de exsudato e 2- perihepatite marcada.

Jeffrey *et al.*, (1999) além de empregarem critérios quantitativos para medir a lesão de celulite e a lesão de órgãos, acrescentaram uma nova variável ao seu método, o tempo de formação da lesão. Assim sendo, foram inoculadas aves aos 22 dias de idade por via SC com, aproximadamente, 1ml de solução bacteriana contendo  $10^7$  UFC/ml. Após a inoculação, as aves foram observadas e necropsiadas em 6, 12, 24, 36, 48 e 60 horas p.i. Quanto mais precoces fossem as lesões de celulite, mais pontos eram atribuídos a elas. Portanto, o quadro podia ser resumido assim: escore 0- sem lesão aparente; escore 1- leve opacidade e espessamento do tecido subcutâneo; escore 2- espessamento unilateral moderado, exsudato fibrinopurulento e hemorragia petequial; escore 3- exsudato fibrinopurulento tendendo para fibrinocaseoso com hemorragias equimóticas na musculatura e lesão disseminada por todo o lado onde ocorreu a inoculação; escore 4- similar ao escore 3 com predomínio de exsudato fibrinocaseoso e lesão além da linha média

peitoral; escore 5- similar ao escore 4, mas, além de se estender pela linha média, a lesão deve comprometer pelo menos a metade da musculatura do peito

Os mesmos autores classificaram as lesões septicêmicas em fracas, moderadas e severas, depois de observar o fígado, o coração e as articulações. O escore foi graduado de 1 a 5 e obedecia as seguintes normas: escore 1- uma ou duas lesões leves; escore 2- presença de uma lesão moderada em um órgão ou lesões suaves em 3 órgãos; escore 3- quando o animal apresentasse lesão moderada em dois órgãos; escore 4- quando as aves, ao menos, apresentassem uma lesão severa no fígado e articulação e coração com lesões moderadas e escore 5- quando mais de um órgão apresentassem lesões severas.

Mesmo em testes de patogenicidade que só envolvem a observação do número de animais mortos por um determinado período de tempo, os critérios para avaliar essas amostras são diversos.

Dho & Lafont., (1982) propuseram inocular 0.1 ml de solução pura de BHI contendo  $10^9$  UFC/ml, via subcutânea, em grupos de 5 animais e consideraram como cepa patogênica a que fosse capaz, de matar 3 de 5 animais do grupo inoculado e cepa apatogênica a que não matasse nenhum animal. Infelizmente, estes autores não relataram como classificariam amostras que matassem 1 ou 2 animais do grupo testado. Alguns anos depois, os mesmos autores em um outro experimento, associaram a presença dos fatores de virulência, como a produção de aerobactina e a capacidade de adesão em células epiteliais, à diferenças na letalidade de diversas amostras. Foi usada a mesma metodologia quanto a via, dose e número de animais. Porém, o critério de classificação foi diferente da usada anteriormente. Agora, a amostra letal deveria matar todos os 5 animais inoculados, amostras intermediárias de 2 a 4 animais e não letais 0 ou 1 animal.

Knobl *et al.*, (2001) utilizaram a mesma metodologia proposta por Dho & Lafont, (1982) só que ao invés de utilizar cinco animais usaram oito e estabeleceram que: alta mortalidade mataria mais de 80% dos animais, intermediária de 50 a 80% dos animais e baixa patogenicidade menos de 40% dos animais.

Brito et al., ( 2002), também usa a metodologia estabelecida por Dho & Lafont, (1982), observando 5 animais por 7 dias e considerou amostras de alta patogenicidade as que matassem mais de 80% dos animais, intermediária de 50 a 80%. Baixa patogenicidade de 50 a 10% e apatogênica que não matasse nenhum animal.

Ao finalizar esta revisão, fica a observação de que os diferentes autores propuseram distintos critérios de interpretação de resultados, embora a metodologia básica dos experimentos seja a mesma, ou seja, todos eles se basearam em DHO & LAFONT, (1982). Assim sendo, e como um agravante ao quadro, se visualizarmos o conjunto da literatura existente sobre o assunto, que cita trabalhos que utilizam outras metodologias, fica muito difícil o estudo da patogenicidade de amostras de *E. coli* empregando como referência os trabalhos citados internacionalmente. Esta dificuldade nos remete a um outro objetivo: o desenvolvimento de um método no qual seja avaliada a letalidade da amostra associada á capacidade desta mesma amostra de produzir lesões características da enfermidade e expressar o resultado em números para diminuir a interferência subjetiva do pesquisador e proporcionar que dois conjuntos de amostras, classificadas por este novo método, tenham suas patogenicidades médias comparadas através de critérios objetivos e com validade estatística comprovada. Estes são os objetivos da presente dissertação.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Amostra bacteriana

Foram utilizadas 300 amostras isoladas de *E.coli* oriundas de três diferentes fontes: cama de aviários, lesões de celulite entre os mesmos lotes e lesões de aves com quadros respiratórios (58). As amostras oriundas de lesões cutâneas (170) e de cama de aviários (72) eram pertencentes a 71 propriedades, associadas a três diferentes integrações avícolas gaúchas. As amostras de lesões cutâneas foram coletadas por ocasião do abate nos animais com lesões compatíveis com celulite e as amostras de cama foram coletadas nos aviários onde estes frangos foram criados. As amostras de quadros respiratórios foram isoladas e identificadas pela equipe do Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária (CDPA)/ Porto Alegre/RS, no ano de 1995 e conservadas sob refrigeração a -20°C em solução de glicerol a 50%.

#### 3.2 Inóculo

Dos estoques em glicerol, foram retiradas 100µl de cultura e postas em 3 ml de caldo infusão coração cérebro (BHI) por 24hs a 37°C, para a obtenção de concentração de 10<sup>9</sup> UFC/ml de *E.coli*. Cada tubo de BHI foi homogeneizado vigorosamente durante 15 segundos, por meio de agitador “vortex” e colocado em dez seringas hipodérmicas 0,1 ml de solução de BHI.

#### 3.3 Animais

Foram selecionados grupos com 10 pintinhos de 1 dia por amostra testada, totalizando 3200 pintos fêmeas de 1 dia de idade, provenientes de um mesmo incubatório. Esses animais foram alojados em gaiolas com água e comida *ad libitum* e, quando necessário, foi realizado o aquecimento do ambiente. Em cada ocasião eram testadas 40 amostras de *E.coli* e acompanhados por um grupo controle de 10 animais.

### **3.4 Via de inoculação**

Os animais foram inoculados via subcutânea na porção abdominal posterior esquerda com 0,1 ml de BHI contendo  $10^9$  UFC/ml. Os grupos controle foram inoculados apenas com BHI.

### **3.5 Observação dos animais**

Todos os animais foram observados durante 7 dias consecutivos. Os animais foram examinados e necropsiados em intervalos de 6, 12 e 24 horas p.i. no primeiro dia. Após este período, os referidos procedimentos eram realizados a cada 12 horas e os resultados das observações eram agrupados e registrados a cada 24 horas. Cada animal morto era necropsiado e se observava a presença das seguintes lesões: aerossaculite, pericardite, perihepatite, peritonite e celulite. À presença da lesão era atribuído o valor “1” e a ausência era caracterizada pelo valor “0”. Nos animais mortos no primeiro dia e que não apresentassem lesões compatíveis por infecção de *E.coli* tentou-se caracterizar a morte por septicemia, através do isolamento bacteriano e, a partir do fígado, o material era semeado em EMB a 37°C por 24 h, para se observar colônias típicas da *E.coli*. Os animais sobreviventes até o sétimo dia foram sacrificados e necropsiados.

### **3.6 Exame histopatológico**

Foram coletadas aleatoriamente seis amostras de lesões cutâneas compatíveis com celulite a cada 24 horas após a inoculação, por um período de 7 dias. As amostras foram fixadas em formol a 10%, processadas, coradas com hematoxilina e eosina e examinadas microscopicamente.

### **3.7 Estabelecimento de critérios para a determinação de índice de patogenicidade (IP)**

Além dos critérios já citados, o tempo de morte foi utilizado para a determinação de um índice de patogenicidade, embora tenha recebido um tratamento diferente. Em princípio, animais mortos nas primeiras 24 h e com isolamento de E.coli positivo recebiam a pontuação 1 para todos os itens observados totalizando 10 que representa o índice máximo. Cada dia posterior às 24 h da inoculação, ou seja, do segundo ao sétimo dia, havia uma diminuição proporcional da pontuação, e a correção foi calculada da seguinte forma: dividindo o fator 1 por 7, obteve-se o número (0,14) e esse número foi subtraído de 1 a cada dia que o animal sobrevivia. Esta constante (0,14) recebeu a denominação de *Fator de Bonificação de Sobrevivência* (FBS). As demais variáveis não sofreram qualquer alteração. O valor obtido para o tempo de morte era multiplicado por 5, para dar um peso cinco vezes maior à mortalidade em comparação com as outras lesões estudadas. Desta forma, o Índice de Patogenicidade Individual calculado nesta dissertação obedeceu à seguinte fórmula:

$$\text{IPI} = (\text{TM} \times 5) + \text{P} + \text{Pe} + \text{Ph} + \text{A} + \text{C}$$

onde:

IPI = Índice de patogenicidade individual

TM = Tempo de Morte

P = Pericardite

Pe = Peritonite

Ph = Perihepatite

A = Aerossaculite

C = Celulite

Para o cálculo do Índice de Patogenicidade da amostra inoculada em 10 pintos, os valores obtidos na fórmula anterior eram divididos por 10, obedecendo a seguinte fórmula:

$$\text{IP} = \frac{\sum(\text{IPI}_{ni})}{N}$$

N = nº de pintos inoculados

Na Tabela 1 está apresentado, como exemplo, o comportamento de uma amostra de *E. coli*, quando foi submetida à metodologia proposta nesta dissertação.

Tabela 1 – Exemplo do estabelecimento do índice de patogenicidade de uma amostra de *E. coli* utilizada no experimento.

Amostra	Animal	Dia Morte	TM	A	P	Ph	Pe	C	IP
1	1	1	1	1*	1*	1*	1*	0*	10
1	2	2	0,857	0	0	1	1	1	7,29
1	3	2	0,857	1	1	1	1	1	9,29
1	4	3	0,714	1	1	1	1	1	8,57
1	5	4	0,571	0	1	1	1	1	6,86
1	6	4	0,571	0	0	0	0	0	2,86
1	7	S**	0	0	0	0	0	0	0
1	8	S	0	0	0	0	0	1	1
1	9	S	0	0	0	0	0	1	1
1	10	S	0	0	0	0	0	1	1
IP									4,79

\* Ocorrência de lesão = 1

\* Ausência de Lesão = 0

\*\* S = Sacrificados no 7º dia pós-inoculação

OBS1: A coluna TN foi multiplicada por 5 para o cálculo do IP

OBS2: O cálculo do IPI é realizado com os valores das linhas e do IP é calculado com os valores das colunas

No caso de morte no primeiro dia por septicemia, todas as outras lesões eram consideradas positivas, sendo aferido o valor 10 ao IPI e, nestes casos, não foi necessário a aplicação da fórmula.

### 3.8 Análise estatística

Os resultados foram agrupados conforme procedência da amostra e analisados estatisticamente através do programa *SigmaStat for Windows*, versão 2,03.

#### 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Esse trabalho teve como objetivo estabelecer uma metodologia para a classificação da *E.coli* de diversas origens, considerando algumas outras variáveis que, freqüentemente, são relevadas a segundo plano, para determinar a patogenicidade das cepas.

A partir do experimento realizado neste trabalho foi possível observar que, além de classificar essas bactérias como patogênicas e apatogênicas, é possível mensurar a intensidade da patogenicidade das mesmas. Constatou-se que o critério que utiliza apenas a letalidade de pintos de um dia, durante um período determinado de tempo, é questionável, tendo em vista que amostras consideradas iguais, em termos de patogenicidade medida por métodos convencionais, podem apresentar resultados totalmente diversos, se analisados o tempo de morte e a capacidade da bactéria de causar lesões compatíveis com septicemia.

O tempo decorrido entre a inoculação e a morte das aves já foi uma variável considerada por Jeffrey *et al.*, (1999), enquanto outros preferiram medir a intensidade das lesões através de análise macro e microscópica. No modelo de índice de patogenicidade proposto, foi levado em conta o tempo de morte, como a principal variável a ser contabilizada. Para melhor representar o quadro observado após as inoculações, foi criado o FBS do animal. Desta forma, quanto mais longa a sobrevivência, menor seria o valor atribuído à variável “tempo” no cálculo do índice de patogenicidade.

A septicemia seguida de morte esteve presente nas amostras consideradas patogênicas e, muitas vezes, acompanhada de lesões de celulite. Este fato, também foi observado por Jeffrey *et al.*, (1999). Por outro lado, tal achado colide com a descrição de Johnson *et al.*, (2001), que encontraram septicemia e toxemia em todos os grupos de diferentes idades trabalhados, embora só tenham observado lesão de celulite em animais com mais de 10 dias de idade. Devido ao grande número de amostras utilizadas no presente experimento, só foi possível inserir o tipo de lesão em relação à ausência ou presença, sem considerar a intensidade das mesmas. Muitos dos critérios que pretendem medir a

intensidade das lesões observadas por alguns autores são diversificados, imprecisos e de natureza muito subjetiva.

No experimento atual, foram observadas lesões compatíveis com celulite nas primeiras 6 horas pós-inoculação, confirmadas histopatologicamente. Este achado coincide com as observações feitas por Jeffrey *et al.*, (1999) e discorda de outros autores que citam o surgimento deste tipo de lesão somente após 18 horas decorrentes da inoculação bacteriana em animais mais velhos (Gomis *et al.*, 1997; Norton *et al.*, 1997).

A Figura 1 apresenta a distribuição do total de amostras classificadas no experimento quanto ao índice de patogenicidade, sem levar em consideração a origem das amostras. É possível perceber que há uma distribuição relativamente homogênea com predominância das amostras apatogênicas ou de baixa patogenicidade, com índices de patogenicidade 0 e 1.

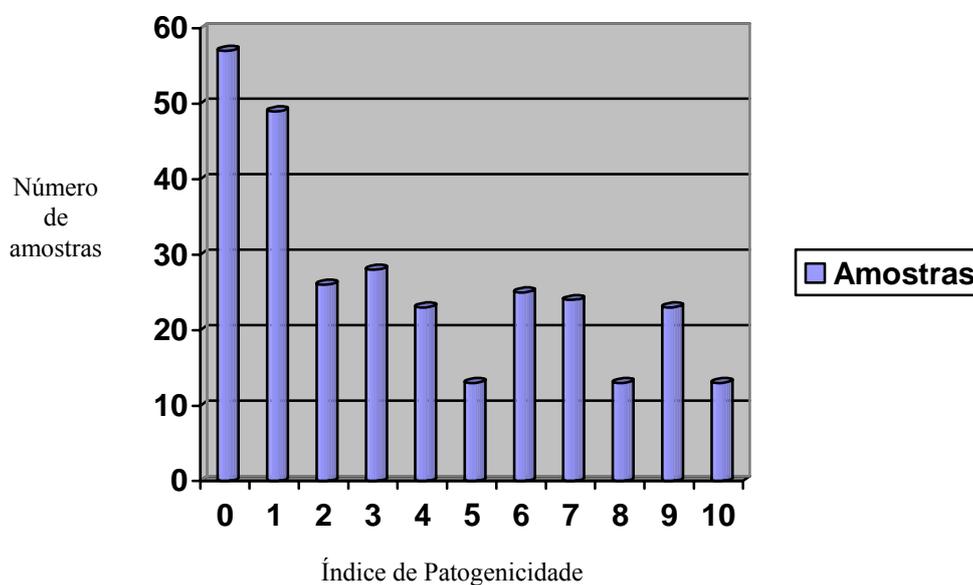


Figura 1 – Distribuição das amostras de *Escherichia coli* conforme o grupo do Índice de Patogenicidade e desconsiderando a origem das amostras.

A distribuição das amostras de acordo com a estação do ano e a origem dos isolamentos está exibida na Tabela 2. Percebe-se que as amostras com baixa patogenicidade (0 e 1) foram isoladas de diferentes quadros lesionais, ou seja, tanto de lesões cutâneas

como de problemas respiratórios. Assim sendo, é provável que, no campo, estas amostras estivessem associadas a outros fatores que provocaram no animal as condições favoráveis para a proliferação bacteriana e ao desenvolvimento das lesões. No caso das amostras isoladas nas camas e com alta patogenicidade, a literatura relata há um percentual de *E. coli* patogênicas (10-15%) em equilíbrio com cepas de baixa patogenicidade, ou apatogênicas (Harry & Hemsley, 1965)



Fig.1

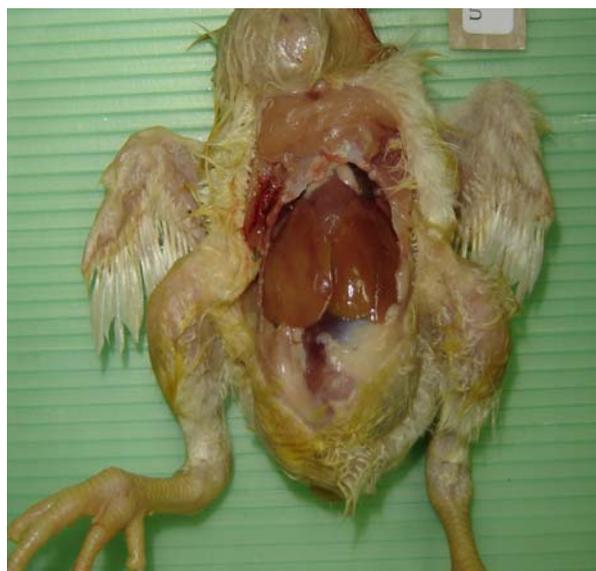


Fig.2

Retirada do tecido subcutâneo com exposição da musculatura peitoral fig.1 e abertura da cavidade celomática em uma ave sadia fig. 2



Fig.3



Fig.4

Retirada do tecido subcutâneo com exposição da musculatura peitoral com lesão de celulite fig.3 e abertura da cavidade celomática com lesão de perihepatite e pericardite fig.4.

Tabela 2 – Distribuição das amostras de *Escherichia coli* conforme o grupo do Índice de Patogenicidade considerando a origem das amostras e a estação.

Origem / Estação	Grupo de patogenicidade										
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Cama/Verão	17*	10	7	6	1	2	1	0	1	2	0
Cama/Inverno	6	3	1	1	0	0	0	2	0	0	0
Lesão/Verão	15	10	7	6	12	6	1	11	5	11	7
Lesão/inverno	7	10	5	6	1	2	4	3	1	3	3
Respiratório	5	8	3	4	7	2	8	6	6	7	2

\* Número de amostras

A Tabela 3 confirma a aplicabilidade deste novo modelo de índice de patogenicidade, já que o esperado seria que as amostras de *E.coli* oriundas de quadros respiratórios e de lesões de celulite obtivessem um índice de patogenicidade significativamente maior do que as amostras isoladas de cama de aviário. O surpreendente foi a evidência de que os índices de patogenicidade de amostras respiratórias e do grupo de lesões cutâneas não diferissem estatisticamente, embora as primeiras apresentassem uma média superior. Os coeficientes de variação expressam a homogeneidade do índice de patogenicidade das amostras e ele destaca que as de origem respiratória são as mais homogêneas, seguidas por aquelas isoladas de lesões cutâneas. Os dados ressaltam que o fato de haver um coeficiente variação mais alto no índice de patogenicidade das amostras isoladas de camas de aviário pode ser atribuído à presença de uma maior diversidade de tipos de *E.coli*, incluindo-se, neste caso, algumas amostras muito patogênicas.

Tabela 3 – Média dos Índices de Patogenicidade de *Escherichia coli*, conforme a origem das amostras

Origem da amostra	Número de amostras	Índice de Patogenicidade *	Coefficiente de Variação
Respiratória	58	5,420±2,991 <sup>a</sup>	55,16
Lesão cutânea	170	4,622±3,245 <sup>a</sup>	70,21
Cama	72	2,319±2,292 <sup>b</sup>	98,83

\* Média ± desvio padrão

Letras distintas na mesma coluna representam diferença significativa ( $P \leq 0,001$ )

A estação do ano em que houve a coleta das amostras, quando analisado sem considerar a origem das mesmas, não influenciou significativamente nos índices de patogenicidade (Tabela 4). Entretanto, ao comparar os índices de patogenicidade conforme origem das amostras e a estação do ano (Tabela 5), observa-se uma esperada igualdade estatística entre os índices de patogenicidade das amostras isoladas na cama, independentemente da estação. As amostras isoladas das lesões cutâneas no inverno, tampouco foram diferentes das isoladas nas camas. Por outro lado, ficou clara a diferença significativa entre os índices de patogenicidade obtidos nas lesões cutâneas e nas de origem respiratórias, quando comparadas com as *E. coli* das camas dos aviários. Na tabela 2, verifica-se que não houve diferença significativa entre os índices de patogenicidade das amostras originárias das lesões respiratórias e das lesões cutâneas.

Tabela 4 – Índice de Patogenicidade de *E. coli* isoladas de lesões cutâneas e de camas em duas estações do ano.

Estação do ano	Nº. amostras	Índice de Patogenicidade (*)	Coefficiente de Variação (%)
Verão	147	4,201±3,278 <sup>a</sup>	78
Inverno	58	3,580±3,175 <sup>a</sup>	89

\* Média ± desvio padrão

Letras iguais representam diferença não significativa ( $P=0,258$ )

Tabela 5 – Índice de Patogenicidade de acordo com a estação do ano e da origem do isolamento da *Escherichia coli*

Estação/Origem	Nº de amostras	Índice de Patogenicidade*	Coefficiente de Variação (%)
Verão/ Cama	48	1,785 <sup>a</sup>	101
Verão/ Lesão	99	4,985 <sup>b</sup>	64
Inverno/ Cama	13	1,171 <sup>a</sup>	127
Inverno/ Lesão	45	3,142 <sup>a, b</sup>	80
Respiratórias	58	5,928 <sup>b</sup>	55

Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks

Letras distintas na mesma coluna representam diferença significativa ( $P \leq 0,05$ ).

\* Mediana

O novo método proposto para classificação do índice de patogenicidade (Tabela 6) pode ser utilizado para se ajustar a 4 diferentes categorias conforme foi utilizado no trabalho de Brito *et al.*,(2003). Verifica-se que ao agrupar os novos índices eles exibem uma vantagem imediata, ou seja, por serem expressados numericamente, é possível estabelecer diferenças significativas entre as categorias. Esta caracterização estatística, fica dificultada quando a classificação restringe-se a critério meramente qualificativo (Alta, Intermediária, Baixa e Apatogênica). Esta vantagem pode ser bem explorada ao serem comparadas as amostras de *E. coli* isoladas em uma mesma granja avícola, pois no experimento que dão base a esta dissertação foi demonstrado que existem distintas amostras bacterianas com patogenicidade variável e que as diferenças no índice de patogenicidade porventura existentes entre granjas de uma mesma integração, poderão ser estatisticamente caracterizadas

Tabela 6 – Agrupamento de patogenicidade (Brito,2001) *versus* Índice de Patogenicidade, desconsiderando a origem das amostras.

Grupo (Benito)	Nº amostras	Índice Pat. (Mediana)	25%	75%
A	97	8,159 <sup>a</sup>	7,142	9,453
I	59	4,571 <sup>b</sup>	3,778	5,582
B	103	1,685 <sup>c</sup>	1,064	2,300
AP	41	0,300 <sup>d</sup>	0,100	0,600

Letras distintas na mesma coluna representam diferença significativa ( $P \leq 0,001$ ).

A= Alta patogenicidade

I= Intermediária

B= Baixa patogenicidade

AP= Apatogênica

A Tabela 7 exemplifica o afirmado anteriormente e os resultados permitem inferir que a caracterização segura das diferenças entre os índices de patogenicidade serão levadas em conta pelos médicos veterinários no campo para sua atividade clínica.

Tabela 7 – Índices de patogenicidade de amostras de *E. coli* presentes em três diferentes granjas de uma integração avícola

Granja	Nº de amostras	Índice de Patogenicidade
A	5	7,54 ± 4,18 <sup>a</sup>
B	5	8,52 ± 3,32 <sup>a</sup>
C	6	2,14 ± 2,51 <sup>b</sup>

Letras distintas na mesma coluna representam diferença significativa ( $P \leq 0,05$ ).

A Tabela 8 mostra como lesão mais prevalente a celulite, quando comparada a todas as outras e a perihepatite foi a menos freqüente. A mesma tabela também revela que há uma grande variação no aparecimento das lesões, pois os coeficientes de variação têm valores altos.

Tabela 8 – Comparação entre as lesões apresentadas no traçado do Índice de Patogenicidade, desconsiderando a fonte da amostra.

Lesão	Nº de amostras	Presença da lesão *	Coefficiente de Variação (%)
Aerossaculite	300	2,0 <sup>a</sup>	87
Peritonite	300	2,0 <sup>a</sup>	101
Perihepatite	300	1,0 <sup>a</sup>	98
Pericardite	300	2,0 <sup>a</sup>	99
Celulite	300	3,0 <sup>b</sup>	77

Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks

Letras distintas na mesma coluna representam diferença significativa ( $P \leq 0,05$ ).

\* Mediana

As Tabelas numeradas de 9 a 12 exibem a presença das distintas lesões observadas por ocasião das inoculações para o traçado da patogenicidade. Nestes casos, a mediana representa o número de animais que apresentaram a lesão, num grupo de 10 aves inoculadas. No conjunto, é imediatamente observado que os isolamentos bacterianos nas camas, quase sempre, estão acompanhadas de um coeficiente de variação mais alto do que as demais amostras e a situação se inverte, no caso das amostras de origem respiratória.

Como era de se esperar, as lesões de aerossaculite são mais freqüentes nas amostras isoladas de animais com problemas respiratórios, embora as diferenças entre as amostras de lesões cutâneas e as de respiratórias não tenham sido significativas. Os altos coeficientes de variação sugerem que a heterogeneidade das observações pode levar a resultados

estatisticamente não significativos, contrariando a expectativa científica. Observe-se que as amostras de origem respiratória têm o menor coeficiente de variação, mais uma vez (Tabela, 9).

Tabela 9 – Presença de aerossaculite induzida pelas amostras de *E. coli* de acordo com a origem do isolamento.

Origem	Nº e amostras	Aerossaculite*	Coeficiente de variação (%)
Cama	72	1,00 <sup>a</sup>	99
Lesão	170	2,00 <sup>b</sup>	83
Respiratória	58	3,00 <sup>b</sup>	62

Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks

Letras distintas na mesma coluna representam diferença significativa ( $P \leq 0,05$ ).

\*Mediana

As Tabelas 10, 11 e 12 relacionam os resultados referentes à peritonite, perihepatite e pericardite, lesões que, em geral estão presentes em quadros respiratórios onde há o envolvimento da *E. coli*. Analisadas em bloco, pode-se reafirmar os argumentos sugeridos anteriormente para a aerossaculite, agora referindo-se à peritonite, perihepatite e pericardite, respectivamente.

Tabela 10 – Presença de peritonite induzida pelas amostras de *E. coli* de acordo com a origem do isolamento.

Origem	Nº e amostras	Peritonite*	Coeficiente de variação (%)
Cama	72	1,00 <sup>a</sup>	115
Lesão	170	2,00 <sup>b</sup>	89
Respiratória	58	2,00 <sup>a, c</sup>	84

Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks

Letras distintas na mesma coluna representam diferença significativa ( $P \leq 0,05$ ).

\*Mediana

Tabela 11 – Presença de perihepatite induzida pelas amostras de *E. coli* de acordo com a origem do isolamento.

Origem	Nº e amostras	Perihepatite*	Coefficiente de variação (%)
Cama	72	1,00 <sup>a</sup>	129
Lesão	170	2,00 <sup>b</sup>	96
Respiratória	58	3,00 <sup>b</sup>	52

Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks

Letras distintas na mesma coluna representam diferença significativa ( $P \leq 0,05$ ).

\*Mediana

Tabela 12 – Presença de pericardite induzida pelas amostras de *E. coli* de acordo com a origem do isolamento.

Origem	Nº e amostras	Pericardite (mediana)	Coefficiente de variação (%)
Cama	72	1,00 <sup>a</sup>	105
Lesão	169	2,00 <sup>a,b</sup>	99
Respiratória	58	3,00 <sup>b</sup>	71

Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks

Letras distintas na mesma coluna representam diferença significativa ( $P \leq 0,05$ ).

No caso da Tabela 13, apresentada a seguir, as diferenças não foram significativas para a presença da celulite nas amostras provenientes das camas ou das lesões cutâneas. Aqui, deve ser lembrado que as amostras que provocam lesões cutâneas são provenientes das camas dos aviários e que, por alguma razão, encontram condições favoráveis para proliferar no organismo da ave. A literatura consultada não estabelece com precisão a expectativa do aparecimento das lesões de celulite de acordo com a origem das amostras (Peighambari *et al.*, 1995; Johnson *et al.*, 2001). Por outro lado, as amostras isoladas de casos respiratórios comportaram-se dentro da expectativa científica e diferiram significativamente daquelas isoladas das camas ou das lesões cutâneas.

Tabela 13 – Presença de celulite induzida pelas amostras de *E. coli* de acordo com a origem do isolamento.

Origem	Nº e amostras	Celulite*	Coefficiente de variação (%)
Cama	72	3,00 <sup>a</sup>	76
Lesão	170	4,00 <sup>a</sup>	66
Respiratória	58	2,00 <sup>b</sup>	83

Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks

Letras distintas na mesma coluna representam diferença significativa ( $P \leq 0,05$ ).

\* Mediana

Foi observada celulite neste experimento, nas primeiras 6 horas p.i. Este achado, acompanhado da observação de celulite no período de 7 dias p.i. de observação, reveste-se de importância quando comparado com as citações da literatura que, geralmente, utiliza animais mais velhos do que os usados neste experimento para caracterizar o aparecimento da lesão. Foi observado nesse experimento, que pintos de 1 dia podem vir a desenvolver, além da lesão de celulite, uma forma septicêmica da colibacilose, ainda mais comum, onde são observadas lesões de aerossaculite, peritonite, perihepatite e pericardite. Esse achado vem de encontro às observações de (Peighambari *et al.*, 1995; Johnson *et al.*, 2001), e contraria o relatado por (Norton *et al.*, 2000). Estes últimos, ao inocularem amostras de celulite em animais nos primeiros dias de idade, observaram septicemia e morte, levando-os a afirmar que animais jovens não desenvolvem celulite.

O conceito de dia de morte apresentado na Tabela 14 poderia servir como um parâmetro interessante para se medir o quanto a bactéria possui de manifestação aguda e septicêmica. O que parece evidente é que as amostras respiratórias apresentam maior índice de dia de morte, refletindo, assim, o comportamento “agressivo” destas amostras no campo.

Tabela 14 – Dia de morte dos animais de acordo com a estação do ano e da origem do isolamento da *Escherichia coli*

Estação/Origem	Nº de amostras	Índice Dia da Morte* (mediana)	Coefficiente de Variação (%)
Verão/ Cama	48	2,0 <sup>a</sup>	108
Verão/ Lesão	99	6,0 <sup>b</sup>	62
Inverno/ Cama	13	2,0 <sup>a</sup>	121
Inverno/ Lesão	45	4,0 <sup>a, b</sup>	79
Respiratórias	58	7,5 <sup>c</sup>	45

Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks

Letras distintas na mesma coluna representam diferença significativa ( $P \leq 0,05$ ).

\* Valores com amplitude de 0 a 10 e computando o FBS.

Autores que associam perfil genético para identificar fatores de virulência e testes de patogenicidade, normalmente, usam o critério de DL50% em seus testes, devido a uma maior precisão nos resultados (Dozois *et al.*, 1992; Dozois *et al.*, 2000; Mellata *et al.*, 2003). Esses mesmos autores trabalharam com 3 a 4 diluições e com, normalmente, 5 a 10 animais por amostra.

Uma das características mais positivas desse experimento é o número de amostras trabalhadas: 300. Esse alto número de amostras tem como objetivo servir de alicerce para se observar padrões de virulência diversos, o que antes seria dificultado em razão da maioria dos experimentos trabalharem com um limitado número de amostras. Vale ainda lembrar que, há algum tempo atrás, geralmente identificavam-se amostras patogênicas através dos sorogrupos mais prevalentes em lesões.

Este trabalho pretende abrir a possibilidade de associar esses índices de patogenicidade com seu comportamento no campo e estabelecer qual o impacto de uma amostra com um determinado índice de patogenicidade na produção avícola. Isto posto, haveria a possibilidade de se coletar amostras no campo da cama e microbiota dos animais e fazer predições do quanto essa amostra prevalente no ambiente, e nos animais, pode ser determinante nas perdas econômicas daquele lote. Associado a ferramentas de inteligência artificial, a estudos para determinação de fatores de risco e a resistência a antimicrobianos, seria possível realizar predições e simulações e, através delas, propor medidas de controle adequadas e economicamente viáveis.

## CONCLUSÕES

Com o presente trabalho realizado podemos concluir que:

Com a nova metodologia proposta neste trabalho, é possível identificar diferenças estatisticamente significativas entre os índices de patogenicidade das amostras.

Cepas de *E.coli* provenientes de quadros respiratórios e de amostras de lesão de celulite, possuem índice de patogenicidade maior que amostras bacterianas oriundas de cama.

A utilização do cálculo do tempo de morte, corrigido pelo Fator de Bonificação de Sobrevivência (FBS) e da presença de cinco tipos de lesões de colibacilose, refletiu adequadamente a virulência da amostra, após a inoculação em pintinhos.

Não houve relação entre a origem da amostra de *E.coli* e a capacidade de causar alguma lesão específica em animais inoculados.

Os índices de patogenicidade, com maiores coeficientes de variação foram encontrados nas amostras oriundas das camas de aviários.

## REFERÊNCIAS

- Assis, ACB and Santos, BM. Patogenicity In Vivo and In Vitro of Escherichia Coli Samples from Avian Origin. **Rev. Bras. Cienc. Avic.**, May/Aug. 2001, vol.3, no.2, p.181-184.
- Barnes, H.J.;Groos, W.B.Diseases of Poultry.10<sup>o</sup> edição ,ed. B.W.Calnek, Iowa State University Press, Ames, Iowa USA,1997.
- Beer, Joachim. Doenças infecciosas em animais domésticos.ed ?,Roca Ltda São Paulo, Brasil,1999.
- Bettelheim, K.; Thomas, G. *E. coli* as Pathogens. Phenotypic characteristics. Serotypes Disponível em:URL:<http://ecoli.bham.ac.uk/> Acesso em 16 de janeiro de 2006
- 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, 2003
- Brito, B. G.Fatores de virulência e variabilidade genética de amostras de Escherichia coli isoladas de aves com celulite.Tese de Doutorado - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo,70 p.,1999
- 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, 2003
- Caya, F.; Fairbrother, J. M.; Lessard, L.; Quessy, S. Characterization of the risk to human health of pathogenic Escherichia coli isolates from chicken carcasses. **J. Food Prot.** v.62, n.7, p.741-746, 1999
- Delicato, E. R.; de 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, n.2, p.97-103, 2003
- Delicato, E. R.; de 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, n.2, p.97-103, 2003
- Derosa, M.; Ficken, M. D.; Barnes, H. J. Acute Airsacculitis in Untreated and Cyclophosphamide-Pretreated Broiler-Chickens Inoculated with Escherichia-Coli Or Escherichia-Coli Cell-Free Culture Filtrate. **Veterinary Pathology**. v.29, n.1, p.68-78, 1992

Dho, M.; Lafont, J. P. Escherichia-Coli Colonization of the Trachea in Poultry - Comparison of Virulent and Avirulent Strains in Gnotoxenic Chickens. **Avian Diseases**. v.26, n.4, p.787-797, 1982

Dozois, C. M.; Dho-Moulin, M.; Bree, A.; Fairbrother, J. M.; Desautels, C.; Curtiss, R. Relationship between the Tsh autotransporter and pathogenicity of avian Escherichia coli and localization and analysis of the tsh genetic region. **Infection and Immunity**. v.68, n.7, p.4145-4154, 2000

Dozois, C. M.; Fairbrother, J. M.; Harel, J.; Bosse, M. Pap-Related and Pil-Related Dna-Sequences and Other Virulence Determinants Associated with Escherichia-Coli Isolated from Septicemic Chickens and Turkeys. **Infection and Immunity**. v.60, n.7, p.2648-2656, 1992

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 Diseases**. v.40, n.3, p.546-552, 1996

Elfadil, A. A.; Vaillancourt, J. P.; Meek, A. H.; Gyles, C. L. A prospective study of cellulitis in broiler chickens in southern Ontario. **Avian Diseases**. v.40, n.3, p.677-689, 1996

Elfadil, A. A.; Vaillancourt, J. P.; Meek, A. H.; Julian, R. J.; Gyles, C. L. Description of cellulitis lesions and associations between cellulitis and other categories of condemnation. **Avian Diseases**. v.40, n.3, p.690-698, 1996

Fallavena, L. C. B.; Moraes, H. L. S.; Salle, C. T. P.; da Silva, A. B.; Vargas, R. S.; do Nascimento, V. P.; Canal, C. W. Diagnosis of skin lesions in condemned or downgraded broiler carcasses - a microscopic and macroscopic study. **Avian Pathology**. v.29, n.6, p.557-562, 2000

Ferreira, A.J.P; Knöbl, T. Colibacilose Aviária. In Berquieri, A.,M.Doença das aves. Campinas :2000;197-205.

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, n.6, p.341-351, 2000

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 broilers at slaughter. **Canadian Veterinary Journal-Revue Veterinaire Canadienne**. v.38, n.3, p.159-162, 1997

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 Diseases**. v.41, n.1, p.234-240, 1997

Gyles, C.L. *Escherichia coli* in Domestic Animals and Humans, ed. Gyles C.L., Cab International, UK, 1994.

Harry, E. G.; Hemsley, L. A. Relationship Between Environmental Contamination with Septicaemia Strains of *Escherichia coli* and Their Incidence in Chickens. **Veterinary Record**. v.77, n.9, p.241-&, 1965

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 Diseases**. v.43, n.3, p.491-496, 1999

Johnson, L. C.; Bilgili, S. F.; Hoerr, F. J.; McMurtrey, B. L.; Norton, R. A. The effects of early exposure of cellulitis-associated *Escherichia coli* in 1-day-old broiler chickens. **Avian Pathology**. v.30, n.2, p.175-178, 2001

Johnson, L. C.; Bilgili, S. F.; Hoerr, F. J.; McMurtrey, B. L.; Norton, R. A. The influence of *Escherichia coli* strains from different sources and the age of broiler chickens on the development of cellulitis. **Avian Pathology**. v.30, n.5, p.475-478, 2001

Knobl, T.; Baccaro, M. R.; Moreno, A. M.; Gomes, T. A. T.; Vieira, M. A. M.; Ferreira, C. S. A.; Ferreira, A. J. P. Virulence properties of *Escherichia coli* isolated from ostriches with respiratory disease. **Veterinary Microbiology**. v.83, n.1, p.71-80, 2001

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.** v.42, n.2, p.285-291, 1998

Macklin, K. S.; Norton, R. A.; McMurtrey, B. L. Scratches as a component in the pathogenesis of avian cellulitis in broiler chickens exposed to cellulitis origin *Escherichia coli* isolates collected from different regions of the US. **Avian Pathology**. v.28, n.6, p.573-578, 1999

Mellata, M.; Dho-Moulin, M.; Dozois, C. M.; Curtiss, R.; Brown, P. K.; Arne, P.; Bree, A.; Desautels, C.; Fairbrother, J. M. Role of virulence factors in resistance of avian pathogenic *Escherichia coli* to serum and in pathogenicity. **Infection and Immunity**. v.71, n.1, p.536-540, 2003

Messier, S.; Quessy, S.; Robinson, Y.; Devriese, L. A.; Homme, J.; Fairbrother, J. M. Focal Dermatitis and Cellulitis in Broiler-Chickens - Bacteriological and Pathological Findings. **Avian Diseases**. v.37, n.3, p.839-844, 1993

- Moura, A. C.; Irino, K.; Vidotto, M. C. Genetic variability of avian *Escherichia coli* strains evaluated. by enterobacterial repetitive intergenic consensus and repetitive extragenic palindromic polymerase chain reaction. **Avian Diseases**. v.45, n.1, p.173-181, 2001
- Nakamura, K.; Narita, M.; Imai, K.; Matsumura, T.; Maeda, M.; Tanimura, T. The effect of mixed live vaccines of Newcastle disease and infectious bronchitis on the chicken respiratory tract. **J. Comp Pathol**. v.106, n.4, p.341-350, 1992
- 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 Diseases**. v.46, n.1, p.143-152, 2002
- Nolan, L. K.; Horne, S. M.; Giddings, C. W.; Foley, S. L.; Johnson, T. J.; Lynne, A. M.; Skyberg, J. Resistance to serum complement, iss, and virulence of avian *Escherichia coli*. **Veterinary Research Communications**. v.27, n.2, p.101-110, 2003
- Norton, R. A.; Bilgili, S. F.; McMurtrey, B. C. A reproducible model for the induction of avian cellulitis in broiler chickens. **Avian Diseases**. v.41, n.2, p.422-428, 1997
- Norton, R. A.; Macklin, K. S.; McMurtrey, 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, n.6, p.571-574, 2000
- 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 Diseases**. v.41, n.4, p.935-940, 1997
- Peighambari, S. M.; Julian, R. J.; Vaillancourt, J. P.; Gyles, C. L. *Escherichia-Coli* Cellulitis - Experimental Infections in Broiler-Chickens. **Avian Diseases**. v.39, n.1, p.125-134, 1995
- Peighambari, S. M.; Vaillancourt, J. P.; Wilson, R. A.; Gyles, C. L. Characteristics of *Escherichia-Coli* Isolates from Avian Cellulitis. **Avian Diseases**. v.39, n.1, p.116-124, 1995
- Pourbakhsh, S. A.; Boulianne, M.; Martineau-Doize, B.; Fairbrother, J. M. Virulence mechanisms of avian fimbriated *Escherichia coli* in experimentally inoculated chickens. **Veterinary Microbiology**. v.58, n.2-4, p.195-213, 1997
- Pourbakhsh, S. A.; Boulianne, M.; MartineauDoize, B.; Dozois, C. M.; Desautels, C.; Fairbrother, J. M. Dynamics of *Escherichia coli* infection in experimentally inoculated chickens. **Avian Diseases**. v.41, n.1, p.221-233, 1997
- Rocha, A. C; Silva, A. B.; Brito, A. B.; oraes, H. L.; ntes, A. P.; , M. C.; , Nascimento V; lle, C. T. Virulence factors of avian pathogenic *Escherichia coli* isolated from broilers from the south of Brazil. **Avian Dis**. v.46, n.3, p.749-753, 2002

Vidotto, M. C.; Muller, E. E.; Defreitas, J. C.; Alfieri, A. A.; Guimaraes, I. G.; Santos, D. S. Virulence Factors of Avian Escherichia-Coli. **Avian Diseases**. v.34, n.3, p.531-538, 1990