

ANÁLISE MOLECULAR DE *Escherichia coli* ISOLADAS DE CELULITE E MIÚDOS (FÍGADO E CORAÇÃO) DE FRANGOS SOB INSPEÇÃO SANITÁRIA*

Thaís Badini Vieira¹⁺, Virginia Leo de Almeida Pereira², Robson Maia Franco³, Elmiro Rosendo do Nascimento², Marcia Quinhones Pires Lopes⁴, Harrison Magdinier Gomes⁴, Marcelo Emanuel Ivens de Araújo⁴, Phillip Noel Suffys⁴ e Rogério Tortelly²

ABSTRACT. Vieira T.B., Pereira V.L. de A., Franco R.M., Nascimento E.R., Lopes M.Q.P., Gomes H.M., de Araújo M.E.I., Suffys P.N. & Tortelly R. [**Molecular analysis of *Escherichia coli* isolated from cellulitis and offal (liver and heart) of broiler by Sanitary Inspection**]. Análise molecular de *Escherichia coli* isoladas de celulite e miúdos (fígado e coração) de frangos sob Inspeção Sanitária. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 35(3):247-252, 2013. Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (H.V.P.T.P.O.A.), Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Rua Vital Brazil Filho, 64, Santa Rosa, Niterói, RJ 24230-360, Brasil. Email: thaís.badini@hotmail.com

In function of industrial production of broiler chickens, skin lesions, such as cellulitis, are becoming one of the biggest reasons for carcasses condemnation around the world. The objective of this study was isolate *Escherichia coli* from cellulitis and offal (liver and heart) of broilers, identify the isolates by RAPD-PCR and correlate them by molecular analysis to prove the septic character of the infection. During the Sanitary Inspection, 51 broiler chickens with characteristic lesions of cellulitis were removed from the slaughter line. These broilers were sent to Laboratory of Quality Control where the cellulitis lesions were measured and described macroscopically. Samples of skin and offal (heart and liver) of each broiler chicken were collected for microbiological examination. Isolates of *E. coli* were analyzed by RAPD-PCR and compared phylogenetically using the software BIONUMERICS 5.1. All lesions of cellulitis were visualized as cutaneous ulcer, changes in color (reddish-yellow) and irregular skin. In eight broilers were also observed thickening of the skin. At cutting, gelatinous fluid and yellowish patches were observed and, in some cases, there were involvement of adjacent muscle. 190 isolates of *E. coli* were obtained, 98 in cellulitis, 52, in liver and 40, in heart. The results of the RAPD-PCR, were compared by the software BIONUMERICS and grouped into 46 “clusters” with 80% or more similarity, with the lowest “cluster” containing two strains and the greater “cluster”, twelve. Of the 30 broilers in which were isolated *E. coli* in cellulitis lesions associated with offal (liver and / or heart), in 10, were obtained strains with more than 85% of similarity between isolates of cellulite and offal; in nine broilers, were obtained strains with more than 85% of similarity between *E. coli* isolates of the liver and heart, however these isolates showed no similarity to the isolates obtained

* Recebido em 29 de julho de 2012.

Aceito para publicação em 19 de agosto de 2013.

¹ Médica-veterinária, DSc. Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (H.V.P.T.P.O.A.), Faculdade de Veterinária (FV), Universidade Federal Fluminense (UFF), Rua Vital Brazil Filho, 64, Niterói, RJ 24230-360, Brasil. +Autora para correspondência. Email: thaís.badini@hotmail.com

² Médico-veterinário, DSc. Departamento de Saúde Coletiva Veterinária e Saúde Pública, FV, UFF, Rua Vital Brazil Filho, 64, Niterói, RJ 24230-360. E-mail: msv@vm.uff.br

³ Médico-veterinário, DSc. Departamento de Tecnologia de Alimentos, FV, UFF, Rua Vital Brazil Filho, 64, Santa Rosa, Niterói, RJ 24230-360. E-mail: mta@vm.uff.br

⁴ Biólogo, DSc. Departamento de Micobacterioses: IOC/Fiocruz, Av. Brasil, 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ 21040-360, Brasil. E-mails: mqlopes@yahoo.com.br; harrison@ioc.fiocruz.br; mivenmail@gmail.com; psuffys@ioc.fiocruz.br

from the cellulite; and 11, there were no correlation between the isolates. The detection of strains of *E. coli* with high genetic similarity in cellulitis and offal can mean that the partial removal of these lesions does not minimize the risk to public health.

KEY WORDS. Colissepticemia, cellulitis, broiler, RAPD-PCR.

RESUMO. 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 *Escherichia 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 com lesões características de 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 *E. coli* foram analisados pela técnica de RAPD-PCR e comparados filogeneticamente através do software BIONUMERICS 5.1. Todas as lesões de celulite foram visualizadas úlcera cutânea, alterações na coloração (amarelo-avermelhado) e irregularidade na pele. Em oito aves, observou-se também espessamento da pele. Ao corte, foi observado fluido gelatinoso e placas amarelas destacáveis e em alguns casos, o acometimento da musculatura adjacente. Foram obtidos 190 isolados de *E. coli*, 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. Das 30 aves 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 frangos, 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.

PALAVRAS-CHAVE. Colissepticemia, celulite, frango, 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 (Giroto & Miele 2006). O Brasil é o terceiro maior produtor mundial e o primeiro colocado nas exportações de carne de frango (ABEF 2009)

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 (Andrade 2005).

Conforme a Portaria nº210 de 26/11/1998 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (Brasil 1998), 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 (Vieira 2006, Alves 2007).

A celulite apresenta etiologia multifatorial, porém *Escherichia coli* tem sido um dos agentes mais frequentemente isolados. 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 (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 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 le-

sões de celulite e nos outros tecidos (Gomis et al. 1997, Gomis et al. 2000).

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 (Ngeleka et al. 1996, Kumor et al. 1998, Kuhnert et al. 2000).

O uso da reação em cadeia da polimerase (PCR) na rotina de diagnósticos é uma ferramenta de rápida detecção de organismos infecciosos. Alguns estudos demonstraram que a técnica de Análise da Amplificação Randômica do DNA Polimórfico (RAPD-PCR) é eficiente na discriminação filogenética de *E. coli* de origem humana (Vogel et al. 2000) e de animais (Chansiriporchai et al. 2001, Gomes et al. 2005, Salehi et al. 2008, Kiliç et al. 2009) em estudos epidemiológicos e estudos de contaminação cruzada em alimentos (Radu et al. 2000, Vogel et al. 2000, Kanungo 2009). É uma técnica relativamente mais fácil e rápida de ser reproduzida, quando comparada a outras técnicas moleculares como *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) (Maurer et al. 1998), robótípagem (Vogel et al. 2000) *MultiLocus Sequence Typing* (MLST) (Bando et al. 2007) e *Pulsed-Field Gel Electrophoresis* (PFGE) (Radu et al. 2000). 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, a fim de comprovar o caráter séptico da infecção.

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 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 Methylene Blue* (EMB) e as placas foram incubadas a 37°C por 24h, conforme a metodologia descrita por Quinn et al (1998). 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 à 37°C por 24 horas para bioquímica presumtiva. 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 IOC/Fiocruz, Mangueiras, Rio de Janeiro, RJ.

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 tipo 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'), descrito por Chansiripornchai et al (2001) e Salehi et al (2008). A PCR foi composta por 2,5mM dNTP, 1,25mM MgCl₂, 100pmol do *primer* (Prodinol), 1,25U Taq DNA polimerase (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 Ladder 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 dos perfis genéticos das estirpes de *E. coli* foram realizadas através do software BIONUMERICS versão 5.1 (Applied-Maths) utilizando-se o teste de correlação de Pearson.

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* partir da técnica de RAPD-PCR. 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 31 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 celulite e miúdos, em nove amostras houve 85% de similaridade entre isolados de fígado e coração com ausência de similaridade com os isolados de celulite e em onze amostras não foi possível obter correlação de similaridade entre as cepas (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	12
Total	31

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

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 Gomis et al. (1997), Vieira (2006) e Alves (2007). Achados macroscópicos da celulite permitem à equipe de inspeção identificar a enfermidade, realizar a avaliação e o 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” (Brasil 1998).

Foram isoladas 190 estirpes de *E. coli* de celulite enfatizando os achados de que a espécie bacteriana está frequentemente presente nesta lesão (Norton 1997, Fallavena 2000). 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 em fases recentes de infecção sem determinar lesões macroscópicas (Gomis et al. 1997, Gomis et al. 2000) o que caracteriza a importância da enfermidade e as implicações com a saúde coletiva, visto que as condenações de carcaças e vísceras serão totais somente quando houver evidência do caráter sistêmico (Brasil 1998).

O primer utilizado para a técnica de RAPD-PCR permitiu uma eficiente discriminação das estirpes, conforme descritos por Chansiriporchai et al. (2001), Salehi (2008) e Kiliç et al. (2009).

A análise molecular das estirpes a partir dos dendogramas possibilitou identificar que em 33,33% das aves 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. Em 30% 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. Neste caso, suspeita-se que estirpes de *E. coli* sejam capazes de penetrar através da lesão de celulite e alcançar órgãos internos. Além disso, a presença da lesão de celulite poderia tornar aves susceptíveis à colonização por outras cepas de *E. coli* ou por outros microrganismos (Gomis et al. 1997, Gomis et al. 2000).

Estirpes isoladas de celulite desenvolvem mais frequentemente casos de septicemia, quando comparadas a outras, isoladas de outras manifestações clínicas de colibacilose (Brito et al 2003). 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 (Fallavena 2000). 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. Desta forma, os produtos derivados de frangos seriam fontes importantes de enfermidades transmitidas por alimentos. Pelos riscos relativos à saúde pública, torna-se necessária a reavaliação dos critérios de condenação em casos de celulite aviária, determinados na legislação (Brasil 1998).

Agradecimentos. Ao CNPq e à Faperj pelo apoio financeiro a esta pesquisa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEF. Associação Brasileira dos Produtores e Exportadores de Frangos. Relatório anual 2008-2009 [internet]. 2009. Disponível em < http://www.abef.com.br/portal/_clientes/abef/cat/Abef%20RA_4021.pdf>. Acesso em: 17 de jun. de 2010.
- Alves F.M.X., Pereira V.L.A., do Nascimento E.R., 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. Ci. Vet.*, 14:23-27, 2007.
- Andrade C.L. Histopatologia e identificação da *Escherichia coli* como agente causal da celulite aviária em frangos de corte. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária, H.V.P.T.P.O.A.), Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2005. 62f. (Disponível em: <http://www.btdt.ndc.uff.br/tde_arquivos/16/TDE-2008-08-11T152352Z-1574/Publico/claudia_andrade_completa_mestrado.pdf>).
- 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*, 102:169-174, 2007.
- 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.
- 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.*, 71:4175-4177, 2003.
- Chansiriporchai N., Ramasoota P., Sasipreeyajan J. & Svensson S.B. Differentiation of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) strains by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Vet. Microbiol.*, 80:75-83, 2001.
- Fallavena L.C.B. *Enfermidades da Pele e das Penas*, p.37-47. In: Berchieri Jr A. & Macari M. (Eds), *Doença das Aves*. FACTA, Campinas, 2000.
- 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. Poul. Sci.*, 4:378-381, 2005.
- 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. J.*, 38:159-162, 1997.
- 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. *Trop. Anim. Health Prod.*, 32:341-31, 2000.
- Giroto A.F. & Miele M. *Situação atual e tendências para a avicultura de corte nos próximos anos*. Estudos da Embrapa Disponível em: < http://www.aviculturaindustrial.com.br/site/dinamica.asp?id=12024&tipo_tabela=produtos&categoria=frango_de_corte>. Acesso em: 20 jul. 2006.
- Kanungo S. A simplified analysis different *Escherichia coli* strains by using RAPD technique. *Not. Bot. Hort. Agrobot. Clu.*, 37:257-60, 2009.
- 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.*, 23:1-4, 2009. Disponível em < perweb.firat.edu.tr/personel/yayinlar/fua_1360/1360_48359.pdf>. Acesso em: 25 jul. 2012.
- Kuhnert P., Boerlin P. & Frey J. Target genes for virulence assessment of *Escherichia coli* isolates from water, food and the environment. *FEMS Microbiol. Rev.*, 24:107-17, 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 Dis.*, 42:285-91, 1998.
- Maurer J.J., Lee M.D., Lobsinger C., Brown T.P., Mize M. & Thayer S.G.. Molecular typing of avian *Escherichia coli* isolates by random amplification of polymorphic DNA. *Avian Dis.*, 42:431-51, 1998.
- 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.*, 64:3118-26, 1996.
- 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.*, 43:320-25, 1999.
- Quinn P.S., Carter M.E., Marvey B. & Carter G.R. *Clinical Veterinary Microbiology*. Wolfe Publishing, Londres, 1998. 648p.

- 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. Biol. Sci.*, 3:558-561, 2000.
- Salehi T.Z., Madani S.A., Karimi V. & Khazaeli F.A. Molecular genetic differentiation of avian *Escherichia coli* by RAPD-PCR. *Braz. J. Microbiol.*, 39:494-497, 2008.
- 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.*, 13:230-235, 1982a.
- 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.*, 13:309-315, 1982b.
- Vieira T.B., Franco R.M., Magalhães H., Praxedes C.I.S. & Tortelly R. Celulite em frangos de corte abatidos sob inspeção sanitária: aspectos anatomopatológicos associados ao isolamento de *Escherichia coli*. *Rev. Bras. Ci. Vet.*, 13:174-77, 2006.
- Vogel L., van Oorschot E., Maas H.M.E., Minderhoud B. & Dijkshoorn L. Epidemiologic typing of *Escherichia coli* using RAPD analysis, robotyping and serotyping. *Clin Microbiol. Infect.*, 6:82-87, 2000.