

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

Perfil bioquímico de amostras de *Escherichia coli* isoladas de materiais avícolas no Estado do Rio Grande do Sul e sua relação com a patogenicidade

Autor: Flávia Bornancini Borges Fortes
Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências 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

2008

FLÁVIA BORNANCINI BORGES FORTES

Perfil bioquímico de amostras de *Escherichia coli* isoladas de materiais avícolas no Estado do Rio Grande do Sul e sua relação com a patogenicidade.

Aprovada em 29 FEV 2008

APROVADO POR:

Prof. Dr. Carlos Tadeu Pippi Salle
Orientador e Presidente da Comissão

Prof. Dr. Benito Guimarães de Brito
Membro da Comissão

Prof. Dr. Hamilton Luiz de Souza Moraes
Membro da Comissão

Prof. Dr. Sérgio José de Oliveira
Membro da Comissão

Ao meu avô José Carlos Bornancini, por todo o incentivo e apoio ao longo desta trajetória. O teu amor, a tua amizade e companheirismo estarão sempre vivos em meu coração. Obrigada pela agradável e inesquecível convivência!

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me proporcionar, pela Sua Vontade, todas as condições necessárias para que eu realizasse este trabalho.

Ao professor Dr. Carlos Tadeu Pippi Salle, por todos os ensinamentos ao longo destes anos de convivência no CDPA. Obrigada pela confiança e por toda a atenção dispensada, e, principalmente, pelo apoio e compreensão nos momentos mais difíceis desta trajetória.

Ao professor Dr. Hamilton Luiz de Souza Moraes, por todos os aprendizados, desde a graduação, até o presente momento. Agradeço também as sugestões e correções feitas durante a parte experimental deste projeto.

Aos funcionários do CDPA, Luiz Henrique Ribas, Omar de Oliveira e Adelina Bergmann Rodrigues (Dona Dila), pelo apoio e colaboração na realização deste trabalho.

Aos colegas de pós-graduação Felipe de Oliveira Salle, Silvio Luis da Silveira Rocha, Diana Giotto e Francielli Cordeiro Zimmerman, pelo incentivo, amizade, companheirismo e colaboração nas diferentes etapas da elaboração e execução deste trabalho. Aos demais colegas, agradeço a atenção dispensada e colaboração técnica na execução deste trabalho.

Aos estagiários do CDPA, em especial a Caroline Hiller, Daniela Pinheiro, Fabrício Imperatori, Rafael Peruzzolo, João Guayba e Juliana Herpich, por toda a dedicação durante a execução deste trabalho.

Aos professores da Faculdade de veterinária da UFRGS, Dra. Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso, Dr. César Augusto Avancini e Dr. Marcos Gomes, pela colaboração fundamental para a realização deste trabalho.

A minha família: vó Ilza e vô Cao, mãe e Renata, agradeço o apoio, carinho e compreensão ao longo desta jornada. O incentivo de vocês foi imprescindível para que

eu conseguisse alcançar mais este objetivo.

Ao Marco, pela dedicação, carinho e companheirismo. Obrigada por ter entendido a importância deste projeto para mim, aceitando minhas ausências e colaborando com este trabalho ao me incentivar a seguir em frente, mesmo perante as maiores dificuldades. Sem dúvida, esta é mais uma conquista que compartilhamos.

Às colegas e amigas Mariane Feser, Ana Paula Morel, Luciana Scherch, Ana Caroline Welter, Vanessa P. Ferraro de Ávila, Daniela Pinheiro, Caroline Hiller e Denise Garcia pelo apoio em diversos momentos ao longo da execução deste projeto.

À Raquel von Hohendorff, pela amizade, apoio, correções e sugestões para esta dissertação.

À Karina Kohl, pela amizade, incentivo e apoio sempre presentes.

Às funcionárias do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, pela atenção dispensada.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPQ), pela bolsa de mestrado.

RESUMO

A *Escherichia coli* é um microorganismo pertencente à flora bacteriana entérica de animais e seres humanos, estando amplamente disseminada na natureza. A colonização intestinal ocorre logo após o nascimento, sendo que 10 a 20% das *E. coli* podem ser potencialmente patogênicas para as aves. Esta bactéria representa um problema econômico na indústria avícola, pois é responsável por causar as colibaciloses. Este termo refere-se a qualquer tipo de infecção, localizada ou sistêmica, causadas total ou parcialmente por amostras patogênicas de *E. coli*. Como exemplos, podem-se citar os problemas respiratórios, como aerosaculite e pneumonias, além de peritonite, onfalite, salpingite e sinovite, entre outros. Além disso, a *E. coli* é o agente mais frequentemente isolado nos casos de celulite aviária, provocando lesões cutâneas que levam as carcaças à condenação total ou parcial no momento do abate, provocando relevantes prejuízos. O objetivo deste trabalho foi verificar o perfil bioquímico de 261 amostras de *E. coli*, obtidas a partir de diferentes materiais de origem aviária, coletados no Rio Grande do Sul. Posteriormente, estes resultados foram associados com os Índices de Patogenicidade (IP) de cada amostra, verificando a possibilidade de relacioná-los. Além do teste de hemólise, foram realizadas 21 provas bioquímicas, sendo dez variáveis para *E. coli*. Dentre os testes variáveis, a melibiose, o sorbitol e a ramnose foram considerados positivos para as bactérias analisadas, pois mais de 90% das amostras fermentaram estes carboidratos. A salicina, a sacarose, a rafinose, o adonitol e o dulcitol, bem como a arginina e a ornitina continuaram apresentando-se como testes variáveis para *E. coli*. Os demais testes tiveram resultados positivos ou negativos de acordo com o esperado para *E. coli*. Constatou-se que as amostras positivas para arginina, dulcitol, rafinose e sacarose têm maiores Índices de Patogenicidade que as negativas. Por outro lado, as amostras negativas para a salicina e para o teste de indol também possuem IP's mais altos que as positivas. Os resultados dos testes também foram analisados agrupando-se as amostras de acordo com a sua origem (quadros respiratórios, camas de aviários e lesões de celulite), apontando-se diferenças nos IP ao compará-los entre si.

ABSTRACT

The *Escherichia coli* are microorganisms that belong to the enteric bacterial flora of animals and humans, and are widespread in the nature. The intestinal colonization occurs right after de birth, as 10 to 20% could be potentially pathogenic to birds. The *E. coli* represents an economic trouble in the poultry industry, as it's the responsible for causing the colibacillosis. This term refers to any kind of infection, localized or systemic, caused entirely or partly by pathogenic *E. coli*. As examples, it's possible to quote the respiratory problems, as aerosaculitis and pneumonia, yonder peritonitis, onfalitis, salpingitis and sinovitis, among others symptoms. Besides that, *E. coli* is the most frequently isolated agent in avian cellulitis cases, promoting cutaneous lesions that brings the carcasses to total or partial condemnation in the abattoir, resulting in relevant prejudices. The objective of the present work was to verify the biochemical profile of 261 *E. coli* samples, obtained from different avian materials, collected in Rio Grande do Sul. Later, these results were associated to the Pathogenic Index (PI) of each sample, to verify if it was possible to relate them. Besides the hemolysis test, 21 biochemical's tests were done, as ten were variable for *E. coli*. Among the variable tests, the melibiose, sorbitol and rhamnose were considered positive for the analyzed samples, as more than 90% fermented these carbohydrates. The salicin, sucrose, raffinose, adonitol and dulcitol, as arginine and ornithine still variable to *E. coli*. The results of the rest of the tests (positives and negatives) agree with what were expected for *E. coli*. It was noticed that the samples that were positive for arginine, dulcitol, raffinose and sucrose have higher Pathogenic Indexes than the others. On the other hand, the samples that were negative for salicin and indole test also possess high PI's. The results of those tests were also analyzed aggregating the samples according to their origin (respiratory symptoms, avian litter and celullitis lesions), pointing to differences in the PI when comparing to each other.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1 <i>Escherichia coli</i>	12
2.1.1 Fatores de virulência	14
2.1.2 Colibacilose	15
2.1.3 Propriedades bioquímicas da <i>E. coli</i>	18
2.1.4 Bioquimismo e sua relação com a patogenicidade de amostras de <i>E. coli</i> ...	21
2.2 Provas bioquímicas	22
2.2.1 Fermentação de carboidratos	22
2.2.2 Descarboxilação de aminoácidos	24
2.2.3 Citrato de Simmon's	25
2.2.4 Motilidade, produção de indol e de gás sulfídrico.....	25
2.2.5 Deaminação da fenilalanina	26
2.2.6 Urease	26
2.2.7 Hemólise	27
3 MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1 Amostras bacterianas	28
3.2 Testes bioquímicos	29
3.3 Inóculo	30
3.4 Controles	31
3.5 Cálculo dos Índices de Patogenicidade das amostras	33
3.6 Análise estatística.....	33
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
5 CONCLUSÕES	44
REFERÊNCIAS	45
APÊNDICE A - Meios de cultura	48

1 INTRODUÇÃO

A indústria avícola brasileira é destaque no mercado mundial, mantendo, desde 2004, a condição de maior exportadora de carne de frango do mundo. Além disso, o Brasil produziu, em 2006, 9,3 milhões de toneladas de carne de frango, atingindo a terceira colocação em termos de produtividade, ficando somente atrás dos Estados Unidos e China, que produziram, respectivamente, 16,16 e 10,35 milhões de toneladas (ABEF, 2006). Estas posições privilegiadas perante o mercado internacional de carnes têm como base uma avicultura tecnicizada, onde se verifica a união de esforços da indústria e dos pesquisadores, objetivando aprimorar o *status* sanitário e produtivo dos plantéis, aumentando a competitividade de nossos produtos.

Apesar de toda a atenção dispensada à Influenza Aviária em 2006, tanto por parte da mídia, quanto por parte das autoridades sanitárias, verificou-se que o mercado avícola apresentou crescimento de 1% em relação a 2005. Os primeiros meses de 2006 foram muito preocupantes para a avicultura mundial, pois foram constatadas quedas de até 70% no consumo de carne de frango na Itália, e 20 a 30% em outros países da Europa. Este quadro se reverteu ao longo do segundo semestre do mesmo ano, trazendo novo fôlego para a indústria. Ainda que não tenha sido registrado nenhum caso de Influenza Aviária, o Brasil também sentiu os reflexos desta enfermidade, pois apresentou queda nas suas exportações (AVEWORLD, 2007).

Em 2006, 71% da produção brasileira de carne de frango foi destinada ao mercado interno, e os 29% restantes corresponderam às exportações, gerando uma receita de US\$ 3,203 bilhões, sendo os principais importadores a Ásia e o Oriente Médio. No que se refere ao mercado de exportações de carnes em nosso país, o frango ocupa a posição de liderança, participando com 52,86% do total exportado. A carne bovina e a suína vêm em seguida, com 31,12% e 10,29% do total, respectivamente.

Ao observar a magnitude da avicultura no Brasil, constata-se a relevância do desenvolvimento de estudos que forneçam informações que agreguem melhorias para a sanidade animal, para que se ofereçam produtos de qualidade, procurando manter a competitividade brasileira dentro de um mercado tão exigente, que atualmente utiliza tanto as barreiras tarifárias como as barreiras sanitárias como limitações comerciais.

Dentre os problemas sanitários mais freqüentes na indústria avícola, trazendo grandes prejuízos econômicos, estão as colibaciloses, que, numa de suas manifestações, provoca lesões cutâneas, como a celulite, levando as carcaças ao descarte. No Brasil, de acordo com o Serviço de Inspeção Federal, entre 2001 e 2005 as condenações parciais e totais de carcaças de frango, devido a lesões ocasionadas pela *E. coli* causaram perdas de aproximadamente US\$ 58,00 milhões na avicultura (BRASIL/MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2006). De acordo com Salle & Silva (2000), pode-se dizer que as enfermidades que causam perdas econômicas em criações de aves domésticas são classificadas em cinco grupos, sendo que a *Escherichia coli* se destaca no grupo das doenças bacterianas de maior impacto, juntamente com as salmoneloses.

O objetivo deste estudo foi verificar se as 261 amostras de *E. coli*, isoladas de diferentes materiais de origem avícola, coletados no Estado do Rio Grande do Sul, apresentam diferenças ao serem submetidas a diversas provas bioquímicas. Além disso, os Índices de Patogenicidade destas amostras foram associados aos resultados dos testes bioquímicos, a fim de constatar a possibilidade de correlacioná-los.

Esta pesquisa visa agregar informações aos trabalhos que vêm sendo realizados no Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária (CDPA-UFRGS), na sua Linha de Pesquisa sobre *Escherichia coli*. As informações obtidas através do estudo do perfil bioquímico destas amostras serão somadas aos dados já existentes sobre os Índices de Patogenicidade e genes associados à virulência das mesmas. Além disso, outras pesquisas referentes a estes microorganismos estão sendo desenvolvidas no CDPA neste momento, como testes para verificar a resistência a antimicrobianos e realização de uma técnica de PCR multiplex para a identificação de alguns genes de patogenicidade deste microorganismo. Ao término destes estudos, todas estas informações serão inseridas num programa de redes neurais artificiais, em uma linha de pesquisa sobre uso de inteligência artificial no gerenciamento de empresas avícolas que está sendo desenvolvida há alguns anos neste laboratório, tendo sido pioneiro no Brasil. A utilização de redes neurais artificiais para a identificação da patogenicidade de *E. coli* é uma ferramenta para os médicos veterinários poderem decidir de forma adequada quais medidas tomarem em casos de contaminação por esta bactéria. A avaliação da patogenicidade através destas redes é mais criteriosa e objetiva, proporcionando dados

que podem auxiliar os técnicos a prevenir ou tratar os casos de colibacilose de forma mais precisa e rápida. Além disso, a utilização de animais vivos não é necessária, o que vem de encontro com as tendências atuais sobre ética e bem-estar animal, ao empregar-se uma técnica que evita o sacrifício dos mesmos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Escherichia coli*

A *Escherichia coli* foi descrita pela primeira vez em 1885 por Theodor von Escherich, tendo sido chamada de *Bacterium coli commune*, sendo inicialmente identificada como parte da microbiota intestinal dos animais, considerada apatogênica, sendo esta caracterização modificada após alguns sorotipos de *E. coli* serem associados a doenças em animais e seres humanos (FERREIRA & KÖBIL, 2000). Também chamou-se *B. coli* até que seu nome atual foi definido por Castellani e Chalmers em 1919 (BARNES *et al.*, 1997). O primeiro caso de colibacilose foi descrito em 1894, tendo sido o agente responsável pela mortalidade de patos, ao ser isolado do fígado, coração e baço dos mesmos. Em 1907 houve a primeira publicação sobre colisepticemia, baseada na mortalidade de frangos, com quadro similar a cólera aviária, enquanto estavam sendo transportados (BARNES *et al.*, 1997). Além da *E. coli*, o gênero *Escherichia* inclui as espécies *E. adecarboxylata*; *E. blattae*; *E. fergusonii*; *E. hermanii* e *E. vulneris* (BETTELHEIM, 1994).

A *E. coli* está amplamente disseminada na natureza, fazendo parte da flora bacteriana entérica de animais e seres humanos (MORENG & AVENS, 1990). A colonização intestinal ocorre logo após o nascimento, e no trato digestivo de aves este microrganismo pode ser encontrado na concentração de 10^6 unidades formadoras de colônia (UFC) por grama de fezes, sendo 10-20% destas amostras patogênicas para os animais. Aves silvestres e roedores também são disseminadores da *E. coli* (FERREIRA & KÖBIL, 2000). A poeira presente nas granjas pode ser uma relevante fonte de *E. coli* patogênica, podendo conter cerca de 10^6 *E. coli*/g, sendo possível verificar uma relação positiva entre os sorogrupos encontrados na poeira e em animais septicêmicos (GROSS, 1994). Esta bactéria pode permanecer no ambiente por longos períodos, especialmente em locais secos. Fezes de roedores, ração e água contaminada podem conter coliformes patogênicos, servindo como fontes de propagação do agente nas criações comerciais de aves (BARNES *et al.*, 1997). La Ragione & Woodward (2002) comentam que tanto em aves domésticas, quanto em silvestres podem-se encontrar amostras de *E. coli* patogênicas para aves presentes nas superfícies mucosas e na microbiota normal do trato intestinal. Além disso, sorotipos patogênicos podem ser isolados juntamente com

os não-patogênicos no ambiente onde as aves são criadas.

A *E. coli* pertence à família *Enterobacteriaceae*. Apresenta-se na forma de bastonetes Gram-negativos, não esporulados, com tamanho variando entre 1,1 a 1,5 µm por 2-6 µm. É anaeróbia facultativa, pois possui tanto metabolismo respiratório quanto fermentativo (FERREIRA & KÖBIL, 2000). A forma e o tamanho destes microorganismos podem variar, sendo que seu crescimento ocorre em temperaturas entre 18° e 44°C. Em ágar Mac Conkey as colônias se apresentam na cor rosa clara circundadas por um precipitado, e em ágar EMB (Eosyn-Methylene-Blue), são verde-escuras em tom metálico ou pretas (BARNES *et al.*, 1997).

As diferentes espécies de *E. coli* podem ser classificadas através da sorotipificação. Kauffmann, em 1944, foi o primeiro a classificar as amostras de *E. coli* por métodos sorológicos, baseando-se na identificação dos antígenos “O”, “K” e “H” (LIOR, 1994). O antígeno somático “O” é uma endotoxina liberada após a lise de células lisas, sendo composto por polissacarídeos, apresentando estabilidade quando aquecido a 100°C. O antígeno “K” está presente na superfície da célula, sendo relacionado com a virulência. É chamado de antígeno capsular e interfere na aglutinação do antígeno “O”, podendo ser removido após aquecer a amostra bacteriana por 1 hora a 100°C (BARNES *et al.*, 1997). O antígeno flagelar “H” é relacionado à presença da flagelina, proteína que constitui o flagelo nos microorganismos móveis (LIOR, 1994). Para verificar sua presença, os isolados devem ser cultivados em condições que propiciem a motilidade. Os antígenos “H” raramente são utilizados como classificação antigênica e não são correlacionados com patogenicidade, sendo destruídos a 100°C (BARNES *et al.*, 1997). O antígeno fimbrial “F” está relacionado com a capacidade de aderência da bactéria à superfície celular. As fimbrias, também chamadas de *pili*, são classificadas como manose sensíveis ou manose resistentes, ao verificar-se se a aglutinação é inibida ou não na presença deste carboidrato (BARNES *et al.*, 1997). A aglutinação bacteriana nem sempre é adequada para demonstrar a presença dos antígenos fimbriais, pois uma amostra pode conter inúmeras fimbrias com diferentes tipos antigênicos (LIOR, 1994). Muitos pesquisadores em todo o mundo têm procurado determinar quais os sorogrupos de *E. coli* causadores de patologias em frangos. Entre os grupos de antígenos “O” freqüentemente designados como patogênicos para as aves estão: 1, 2, 3, 6, 8, 15, 18, 35, 71, 74, 78, 87, 88, 95, 103 e 109. Os sorogrupos “O” 1, 2

e 78 são os mais comuns, mas muitas amostras patogênicas não pertencem a nenhum destes “O” grupos, sendo caracterizadas como não tipificáveis sorologicamente. A sorotipificação é um procedimento caro e realizado somente em alguns centros especializados, sendo desnecessária para diagnósticos laboratoriais de rotina, mas de grande valor para estudos epidemiológicos (GROSS, 1994).

Os problemas provocados pela *E. coli* têm grande importância econômica, acarretando perdas na indústria avícola, seja devido à mortalidade que acarreta em aves jovens, seja pelas condenações de carcaças que ocorrem nos abatedouros. Em relação à saúde pública, as cepas que são patogênicas para as aves apresentam baixo risco de contaminação para humanos ou outros animais, entretanto, as aves também são suscetíveis à *E. coli* O157:H7, que é causadora de quadros de enterohemorragias em seres humanos (BARNES *et al.*, 1997).

2.1.1 Fatores de Virulência

Os principais fatores de virulência da *E. coli* são: antígenos de superfície K, que conferem resistência às bactérias perante a ação dos neutrófilos e do soro normal; produção de *pili*, que torna o microrganismo capaz de se fixar a vários tecidos do hospedeiro; produção de colicinas, que são substâncias capazes de inibir o crescimento de outras bactérias presentes no mesmo nicho onde as *E. coli* se encontram; síntese de hemolisinas e sideróforos, compostos capazes de obter ferro do organismo, possibilitando que a bactéria se multiplique nos fluidos orgânicos; produção de citotoxinas, também chamadas de verotoxinas, que são proteínas citotóxicas produzidas por alguns sorotipos de *E. coli* (ASSIS & SANTOS, 2005).

Segundo Barnes *et al.* (1997), um grande número de fatores de virulência têm sido identificados em cepas patogênicas de *E. coli*, isoladas a partir de aves doentes, mas, ainda assim, suas funções ainda não estão bem esclarecidas. A resistência ao soro, que pode ser mediada pelo antígeno K, e é relacionada ao gene *iss* (resistência sérica), correlaciona-se bem com a virulência das amostras. As amostras virulentas também permanecem por mais tempo e em maior quantidade que as avirulentas no trato intestinal, e isto pode estar relacionado com a produção de colicinas.

De acordo com Gross (1994), as cepas de *E. coli* que causam colibacilose pertencem à classe de *E. coli* patogênicas que invadem a corrente sanguínea a partir de uma superfície epitelial, sendo similares às cepas que causam infecções extra-intestinais em humanos. Assim, acredita-se que os fatores de virulência presentes em ambas sejam semelhantes, incluindo a presença de *pili*, resistência ao complemento (resistência ao soro), produção de aerobactina e presença do antígeno K. Muitos estudos demonstram que amostras patogênicas de *E. coli* possuem a capacidade de obtenção de ferro a partir de níveis baixos deste elemento no ambiente em que se encontra no hospedeiro. Este evento ocorre devido à presença da aerobactina, sendo que os genes responsáveis pela expressão desta característica estão relacionados ao plasmídeo Col V.

Delicato *et al.* (2003) realizaram um estudo para verificar a presença de dezesseis genes responsáveis pela virulência de amostras de *E. coli*, através de testes de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), em duzentos isolados deste microrganismo. Ao final da pesquisa, observaram que os genes *iut A* (receptor para aerobactina), *iss* (resistência sérica), *cva C* (colicina V), *tsh* (hemaglutinina sensível à temperatura), *pap C* e *pap G* (responsáveis pela expressão da fimbria P, um dos fatores de colonização) e *fel A* (fimbria F 11) foram detectados com maior frequência nos isolados obtidos de colibacilose do que nos isolados provenientes de amostras fecais de aves saudáveis, demonstrando que genes de virulência com diferentes potenciais participam na patogenia da colibacilose. Segundo Barnes *et al.* (1994), os fatores de virulência e os genes responsáveis identificados em amostras de *E. coli* isoladas de aves, comumente encontrados são: capacidade de adesão pela fimbria P (*pap C*) e fimbria F 11 (*fel A*), produção de colicinas (*cva C*), presença de aerobactina (*iut A*), presença dos antígenos capsulares K1 e K5 (*kpsII*), resistência sérica (*iss*) e hemaglutinina sensível à temperatura (*tsh*).

De acordo com Rocha (1999), os fatores de virulência detectados com maior frequência em amostras respiratórias de *E. coli*, isoladas no Rio Grande do Sul, foram a resistência sérica e a produção de colicinas.

2.1.2 Colibacilose

A *Escherichia coli* é um microrganismo conhecido por causar doenças em aves,

embora ainda não esteja claro se é uma causadora primária ou secundária das enfermidades a ela atribuídas (MONTGOMERY *et al.*, 2005). Ferreira & Köbl (2000) comentam que a *E. coli* é considerada secundária a outros agentes, sendo a causa de doenças extra-intestinais em aves. Muitos sintomas são apresentados por aves contaminadas por esta bactéria, tais como: colisepticemia, aerossaculite, peritonite, pleuropneumonia, pneumonia, síndrome da cabeça inchada, osteomielite, entre outros (BARNES *et al.*, 1997; FERREIRA & KÖBIL, 2000; MONTGOMERY *et al.*, 2005). O termo colibacilose refere-se a qualquer tipo de infecção, localizada ou sistêmica, causadas total ou parcialmente por amostras patogênicas de *E. coli* (GROSS, 1994). A colibacilose em mamíferos é tratada como uma doença entérica de origem primária, entretanto, em frangos, pode ser localizada ou sistêmica, ocorrendo secundariamente quando as defesas do hospedeiro estão fragilizadas, ou ainda, devido a cepas patogênicas do agente (MONTGOMERY *et al.*, 2005). Além disso, a *E. coli* é o microrganismo que vêm sendo isolado com maior frequência de lesões de celulite aviária (PEIGHAMBARI *et al.*, 1995; GOMIS *et al.*, 2000; MACKLIN *et al.*, 1999).

A infecção do trato respiratório, causado pela *E. coli*, é uma das doenças aviárias mais comuns, usualmente ocorrendo entre 2 e 12 semanas de idade, sendo chamada também de doença respiratória crônica. As aves inalam cepas patogênicas de *E. coli*, derivadas das fezes, presentes na poeira do galpão. Normalmente, as defesas do hospedeiro conseguem combater o agente, mas se existirem fatores predisponentes, como a presença de outros patógenos que afetem o trato respiratório, como, por exemplo, o *Mycoplasma gallisepticum*, a *E. coli* conseguirá estabelecer-se, ocasionando problemas respiratórios. A exposição à amônia e à poeira também favorecem a *E. coli*, pois provocam a deciliação do epitélio respiratório (GROSS, 1994).

A celulite aviária é uma causa comum de descarte parcial ou total de carcaças de frango, tendo como agente etiológico principal a *E. coli*, apesar de também já terem sido isolados outros microrganismos, como *Pasteurella multocida*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter agglomerans*, *Proteus vulgaris* e *Streptococcus dysgalactiae* (GOMIS *et al.*, 2000; MACKLIN *et al.*, 2000; PEIGHAMBARI *et al.*, 1995). Segundo Macklin *et al.* (2000), a celulite aviária é um problema grave na indústria de frangos de corte, causando perdas estimadas em US\$ 30 a US\$ 40 milhões anualmente. As lesões de celulite são, atualmente, as maiores causas de condenação de carcaças em

abatedouros, sendo que no Canadá, a rejeição de carcaças devido à celulite aumentou 7,5 vezes em 1992, em relação ao ano de 1986 (PEIGHAMBARI *et al.*, 1995). A celulite caracteriza-se pela presença de uma placa fibronecrótica no tecido subcutâneo, verificando-se a existência de inflamação na pele que recobre o local. A lesão de celulite é iniciada por arranhões na pele que proporcionam que as bactérias presentes no ambiente acessem o tecido subcutâneo (JEFFREY *et al.*, 2004). As lesões de celulite são primariamente unilaterais e localizadas na região abdominal, com tamanho variando entre 1 a 10 centímetros de diâmetro. A região afetada fica inchada, sendo que a pele que recobre o local tem sua coloração alterada para amarela-clara, amarelo-opaca ou marrom-avermelhada, além de geralmente apresentar arranhões ou feridas. Ao abrir a pele, observa-se a presença de vários graus de edema subcutâneo, hemorragias musculares e exsudato subcutâneo, que podem estar localizados ou podem se estender pelo peito, costas ou coxa (ELFALDIL *et al.*, 1996a). A celulite aviária não resulta em morte nem em sinais clínicos, mas a presença das lesões, que geralmente só são detectadas no momento do abate, leva a perdas substanciais devido à condenação das carcaças (GROSS, 1994; JOHNSON *et al.*, 2001).

Um estudo conduzido por Elfaldil *et al.* (1996b) demonstrou a influência de alguns fatores na ocorrência de celulite nos lotes de frangos de corte. Dentre as correlações positivas observadas pelos pesquisadores, está a utilização de palha nas camas dos aviários, pois, além de promover um ambiente propício para o crescimento e multiplicação da *E. coli*, pode causar pequenos ferimentos na pele, quando constituída por material que contenha porções afiadas e pontiagudas. Estas soluções de continuidade podem servir de porta de entrada para a bactéria instalar-se no animal.

O tratamento para as doenças causadas por *E. coli* é baseado na administração de antimicrobianos e quimioterápicos, preferencialmente administrados na fase inicial da doença. Drogas como Quinolonas de 3^a geração, como Enrofloxacina e Danofloxacina, além de Sulfonamidas e Macrolídeos, entre outros agentes, têm sido usados no combate a colibacilose. O ideal é que antes de iniciar a administração de qualquer droga, sejam realizados testes de suscetibilidade com as amostras isoladas, pois, atualmente, têm-se constatado um elevado índice de resistência aos antimicrobianos disponíveis no mercado, devido ao uso indiscriminado dos mesmos (FERREIRA & KÖBIL, 2000).

A prevenção e o controle da colibacilose baseiam-se, principalmente, num manejo adequado das aves e das instalações onde estas permanecem. Boa ventilação, alimentação de qualidade, intensificação no número de coleta dos ovos que estão na cama do aviário, fornecimento de probióticos e limpeza diária dos bebedouros e comedouros são atitudes que auxiliam a diminuir a contaminação nos aviários. Controlar os fatores que desencadeiam estresse ambiental e populacional nos animais, evitar a ocorrência de doenças que provoquem imunodepressão e a utilização de vacinas são mais algumas ferramentas que podem ser empregadas no combate à *E. coli* (BARNES *et al.*, 1997; FERREIRA & KÖBIL, 2000). Entretanto, Gross (1994) comenta que as vacinas contra *E. coli* não são amplamente utilizadas, provavelmente devido ao imenso número de sorogrupos envolvidos nos casos de campo. O custo das vacinas também pode ser um fator que influencia sua utilização.

2.1.3 Propriedades Bioquímicas da *E. coli*

Atualmente, a *E. coli* é um dos microrganismos mais ricamente documentados, sendo que os estudos sobre seu metabolismo e processos bioquímicos serviram de base para outros microrganismos. Dentro de seu complexo metabolismo, constatou-se que, assim como outros organismos vivos, a *E. coli* responde positivamente a mudanças no meio em que se encontra através do controle das enzimas que possui. Três tipos de mecanismos que exercem este tipo de controle já foram identificados: modulação, modificação covalente e inativação seletiva. Assim, dependendo das necessidades de sobrevivência e dos nutrientes disponíveis, a bactéria irá inibir ou ativar determinadas enzimas que venham a auxiliar a sua sobrevivência em determinada situação, seja dentro do organismo de um hospedeiro, ou no meio ambiente (BETTELHEIM, 1994).

Segundo Ferreira & Köbil (2000), a *E. coli* tem como características bioquímicas a produção de ácido e gás após a fermentação da glicose, maltose, manose, manitol, xilose, glicerol, ramnose, sorbitol e arabinose. A utilização de adonitol, sacarose, salicina, rafinose, ornitina, dulcitol e arginina é variável. A maioria das amostras possui capacidade para fermentar a lactose, embora algumas realizem este processo de forma mais lenta que outras. Motilidade, lisina e produção de indol têm respostas positivas, enquanto que os testes de oxidase, utilização do citrato, hidrólise de uréia, liquefação de gelatina e produção de H₂S são negativos. A *E. coli* é positiva para a reação de

vermelho de metila, e negativa para Voges Proskauer. As provas bioquímicas para *E. coli* são úteis para diferenciá-la das outras espécies de *Escherichia* e de outras bactérias da família *Enterobacteriaceae* (BARNES *et al.*, 1997).

De acordo com Bettelheim (1994), a habilidade de fermentar a glicose com produção de ácido e gás é uma característica básica da *E. coli*. A presença da enzima β -galactose, cuja função é transformar a lactose em glicose e galactose, é utilizada para a diferenciação da *E. coli* de *Salmonella sp.* e *Shigella sp.*

Segundo Oliveira (2000), o cultivo laboratorial de *E. coli* possui as seguintes características: as colônias em ágar sangue podem ou não apresentar hemólise, dependendo da cepa analisada; em meio Mac Conkey, as colônias são de coloração rosada, devido à fermentação de lactose; em meio líquido (caldo simples), ocorre turvação na presença de *E. coli*; a incubação pode ser realizada em aerobiose ou anaerobiose facultativa, durante 24 horas a 37°C; em relação a motilidade, podem ser móveis ou imóveis; o perfil bioquímico compatível com *E. coli* apresentará catalase positivo; oxidase negativo; fermentação de açúcares com produção de gás (glicose positivo, lactose positivo, sacarose variável, maltose positivo, fenilalanina negativo); hidrólise de gelatina negativo; citrato negativo; urease negativo; indol positivo; vermelho de metila positivo; Voges-Proskauer negativo.

Muitos autores demonstram as características bioquímicas dos microrganismos através de tabelas onde constam os nomes dos testes e a porcentagem de amostras que se apresentam positivas para cada um deles. Neste caso, os testes considerados positivos serão aqueles com 90% ou mais de resultados positivos, os testes negativos serão os que têm menos de 10% de positivos e os testes variáveis são os que apresentam entre 10 e 89,9% de resultados positivos (BARON & FINEGOLD, 1990; BETTELHEIM, 1994). Outros utilizam tabelas com os testes e os classificam como positivos, negativos e variáveis (BARNES *et al.*, 1997; SEELEY JR. *et al.*, 1991). Já MacFaddin (2000), utiliza tabelas contendo as reações bioquímicas para cada espécie bacteriana, classificando-as em positivas, negativas e variáveis, sendo que as variáveis também são subdivididas em variáveis com tendência a negativas e variáveis com tendência a positivas, de acordo com o percentual de positividade apresentado. Em relação à *E. coli*, os dados apresentados na literatura somente divergem em relação a alguns testes

variáveis, pois certos autores consideram determinado teste como positivo, mas outros o descrevem como variável. Por exemplo, Barnes *et al.* (1997) e Bettelheim (1994) classificam a fermentação de adonitol como negativa para *E. coli*, enquanto Ferreira & Köbil (2000) a consideram como variável. Estes autores também classificam a motilidade como positiva, enquanto Barnes *et al.* (1997), Seeley Jr. (1991) e Oliveira (2000) a tratam como variável. A Tabela 1 demonstra algumas características bioquímicas da *E. coli*.

É importante ressaltar que, após a realização de subculturas, amostras de *E. coli* podem ter suas características bioquímicas alteradas. Apesar disso, amostras estocadas a -70°C ou a 4°C não demonstraram mudanças em seu perfil bioquímico (BETTELHEIM, 1994).

Tabela 1 - Características bioquímicas esperadas para *Escherichia coli*.

Testes	<i>E. coli</i>
Motilidade	variável
Catalase	positivo
Oxidase	negativo
Nitratos/nitritos	positivo
Gelatina	negativo
Produção de Gás Sulfídrico (H ₂ S)	negativo
Indol	positivo
Vermelho de Metila	positivo
Voges-Proskauer	negativo
Citrato de Simmon's	negativo
Urease	negativo
Lisina	positivo
Ornitina	variável
Fenilalanina	negativo
Glicose	positivo
Lactose	positivo
Manitol	positivo
Dulcitol	variável
Sacarose	variável
Salicina	variável
Adonitol	negativo
Inositol	negativo

Adaptada de Barnes *et al.*, 1997.

2.1.4 Bioquimismo e sua relação com a patogenicidade de amostras de *E. coli*

Ao estudar a patogenicidade *in vitro* e *in vivo* de amostras de *E. coli*, Raji *et al.* (2003) observaram a correlação entre a fermentação de açúcares, hidrólise de esculina, teste de vermelho Congo, hemólise, motilidade, sorotipo e patogenicidade em pintos de um dia. Foram utilizadas 24 amostras diferentes de *E. coli*, e ao analisar os resultados, os autores observaram que houve diferenças no perfil bioquímico das amostras testadas, bem como no teste de patogenicidade *in vivo* em pintos de um dia. As amostras foram submetidas aos seguintes testes bioquímicos: xilose, manitol, rafinose, sorbitol, adonitol, ramnose, lactose, sacarose, maltose, dextrose, dulcitol, hidrólise de esculina e salicina. Outro ponto relevante neste estudo é que tanto as amostras patogênicas quanto as não-patogênicas fermentaram dulcitol, resultado que discordou de outros obtidos em experimentos anteriores, em que uma porcentagem maior de amostras patogênicas fermentou dulcitol, ao serem comparadas com outras menos patogênicas.

Montgomery *et al.* (2005) analisaram 103 amostras de *E. coli*, lactose positivas, provenientes de diferentes fontes de frangos de corte, em relação ao seu perfil bioquímico, entre outros fatores *in vitro*. As amostras apresentaram variações nos resultados dos testes bioquímicos, demonstrando não haver um padrão ao serem submetidas ao bioquimismo. A análise foi baseada nos seguintes testes: ortonitrofenil-beta-D-galactosídeo (ONPG), arginina dihidrolase, lisina descarboxilase, ornitina descarboxilase, citrato, produção de gás sulfídrico (H₂S), urease, triptofano deaminase, produção de indol, Voges-Proskauer, hidrólise de gelatina e reações de fermentação de glicose, manitol, inositol, sorbitol, ramnose, sacarose, melibiose, amigdalina e arabinose.

Rosenberger *et al.* (1985), após estudarem a patogenicidade de 197 amostras de *E. coli* em relação a vários fatores, dentre eles, a atividade metabólica, constataram que esta foi similar entre as amostras analisadas, não podendo ser associada com a sua patogenicidade. A exceção foi a fermentação de adonitol, já que 23% das *E. coli* altamente patogênicas foram positivas, enquanto somente 8% das intermediárias e 4% das cepas pouco patogênicas fermentaram este carboidrato.

Barnes *et al.* (1997) citam a fermentação do adonitol como um fator que pode

ser correlacionado com a virulência de *E. coli* para aves.

2.2 Provas bioquímicas

Os microrganismos, como todos os seres vivos, podem, até certo ponto, modificar o meio em que se encontram e utilizar as soluções químicas como fontes de energia, produzindo um ambiente propício para seu crescimento e reprodução. Todas as atividades celulares são mediadas por enzimas, e os microrganismos produzem diversos tipos delas, que atuam de forma interligada. Ao testar os produtos finais de reações enzimáticas e notar o desaparecimento de algumas substâncias de um meio de cultura, os microbiologistas podem estabelecer as características enzimáticas de um microorganismo e identificá-lo, podendo então diferenciá-lo de espécies similares (SEELEY JR. *et al.*, 1991).

A mais de um século, os testes convencionais ou clássicos para a identificação de microrganismos vêm sendo utilizados, baseados na habilidade que o organismo em estudo possui para utilizar diferentes fontes de carbono ou observando os produtos finais de seu metabolismo (BETTELHEIM, 1994).

2.2.1 Fermentação de carboidratos

Assim como os humanos, a maioria dos microrganismos utiliza inúmeros carboidratos como sua fonte principal de energia. Estes incluem os polissacarídeos (salicina, dextrina), os dissacarídeos (lactose, melibiose, sacarose), os trissacarídeos (rafinose) e os monossacarídeos (glicose, ramnose, adonitol, dulcitol, manitol, sorbitol) (SEELEY JR. *et al.*, 1991). Os carboidratos são chamados de açúcares, entretanto, alguns deles são na verdade álcoois. Normalmente, um açúcar “verdadeiro” tem seu nome terminado com “ose”, enquanto os álcoois terminam com “ol”. Poucas exceções existem em relação a estas nomenclaturas, sendo uma delas o açúcar salicina (MacFADDIN, 2000).

Os testes de fermentação de carboidratos são realizados para determinar a habilidade de um organismo fermentar, ou seja, degradar, determinado carboidrato, incorporado a um meio basal, tendo como resultado a produção de ácido ou ácido e gás.

Os padrões de fermentação são característicos de grupos de bactérias ou espécies, como por exemplo, todas as *Enterobacteriaceae* são fermentadoras de glicose. Os testes de fermentação de carboidratos podem ser úteis na diferenciação entre gêneros e podem auxiliar na identificação de espécies bacterianas (MacFADDIN, 2000). Os produtos resultantes da quebra dos carboidratos são ácidos orgânicos (p. exemplo, ácido láctico e acético) e gases, como hidrogênio e dióxido de carbono, sendo que o tipo e a proporção dos produtos formados dependerá da espécie do microorganismo e do carboidrato que está sendo disponibilizado para utilização. A habilidade, ou a sua ausência, que um organismo possui para utilizar um açúcar simples, uma combinação de açúcares ou vários tipos de açúcares proporciona informações para a classificação das espécies bacterianas, pois a fácil observação da produção de ácido e gás por certos microorganismos é de grande valor prático para a identificação dos mesmos (SEELEY JR. *et al.*, 1991). Para verificar a formação de gás, coloca-se um pequeno tubo de vidro, chamado de tubo de Durham, dentro de um tubo de ensaio contendo um meio basal e um carboidrato. O tubo de Durham deve ser colocado invertido, e, se houver formação de gás, será coletado pelo tubo e poderá ser visto na forma de bolhas. Apesar da maioria das *Enterobacteriaceae* produzirem gás ao fermentarem glicose, *Salmonella Typhi*, *Providencia stuartii*, a maioria das espécies de *Yersinia* e algumas cepas de *E. coli* não produzem gás, sendo chamadas de anaerogênicas (BARON & FINEGOLD, 1990).

Os testes de fermentação de carboidratos são preparados utilizando-se um meio de cultura base, acrescido de um indicador de pH, sendo o vermelho de fenol o mais amplamente utilizado. Sua coloração original é laranja – avermelhada, quando apresenta pH 7,4, mudando para vermelha ou rosa quando o pH é 8,5, indicando alcalinidade, ou ficando amarela quando o pH é 6,9, indicando acidez (MacFADDIN, 2000; SEELEY JR. *et al.*, 1991). Para a realização destes testes é necessário, primeiramente, preparar o caldo base, de acordo com as indicações do fabricante, para posteriormente adicionar o carboidrato que será testado. Os carboidratos são acrescentados ao caldo na concentração de 1%, sendo a única exceção a salicina, que é utilizada a 0,5%. Após 24h-48h de incubação a 37°C, a interpretação dos resultados deverá ser: positivo, quando a cor do meio mudar para amarelo, negativo, quando o meio apresentar coloração vermelho-rosada, e “atrasada”, quando o meio ficar laranja. Em relação à presença de gás, o resultado pode ser positivo, se houver bolhas dentro do tubo de Durham, ou negativo, quando não houver bolhas (MacFADDIN, 2000).

2.2.2 Descarboxilação de aminoácidos

Os aminoácidos, além de servirem como constituintes primários de várias proteínas que compõem os organismos vivos, também são utilizados pelas células com outros objetivos, pois podem ser degradados gerando energia e outros produtos finais, como amônia (NH_3), indol e H_2O . Além disso, os aminoácidos podem ser quimicamente modificados em componentes celulares essenciais, incluindo outros aminoácidos. Os membros da família *Enterobacteriaceae* são similares, dificultando a diferenciação das espécies pelos microbiologistas. Assim, os testes de descarboxilação de aminoácidos são importantes ferramentas para uma identificação rápida dos diferentes microrganismos desta família (SEELEY JR. *et al.*, 1991). Segundo MacFaddin (2000), os testes de descarboxilase, que utilizam os aminoácidos lisina, arginina e ornitina, são utilizados para verificar a habilidade enzimática de um organismo em descarboxilar um aminoácido e formar uma amina, resultando em alcalinidade. A descarboxilação é um processo em que a bactéria que possui uma enzima específica para descarboxilação ataca o grupo carboxil presente no aminoácido, produzindo uma amina ou uma diamina e dióxido de carbono. Existem inúmeras enzimas de descarboxilação, cada uma específica para um tipo de substrato. Em um laboratório de bacteriologia clínica, as descarboxilases mais importantes para a identificação bacteriana são a lisina, a ornitina e a arginina.

Para a realização dos testes de descarboxilação, deve-se adicionar cada aminoácido em tubos contendo caldo base para a descarboxilação de aminoácidos, como, por exemplo, o caldo base para descarboxilação de Moeller. Os aminoácidos serão adicionados ao caldo na concentração de 1%. O caldo, juntamente com os aminoácidos, deve ser preparado de acordo com as indicações do fabricante. Após a inoculação das amostras, os tubos devem ser incubados por 24h até quatro dias, sendo examinados diariamente. A interpretação dos resultados deve ser da seguinte forma (ao utilizar como indicador de pH o bromocresol roxo): positivo, se o meio estiver roxo ou roxo-amarelado, com pH em torno de 6,8, ou negativo, se o meio estiver amarelo claro, e o pH for 5,2 (MacFADDIN, 2000). De acordo com Seeley Jr. *et al.* (1990), a descarboxilação pode ser verificada pelo aumento do pH, já que esta reação resulta em um acúmulo de amina, que é básica.

2.2.3 Citrato de Simmon's

O teste de utilização de citrato consiste em determinar se um organismo é capaz de utilizá-lo como única fonte de carbono para seu metabolismo e crescimento, resultando em alcalinidade do meio. É utilizado primariamente na identificação de gêneros da família *Enterobacteriaceae*, mas também serve para a identificação entre espécies bacterianas. O citrato de Simmon's é um dos meios de cultura que são utilizados para a realização deste teste. Apresenta coloração verde quando não-inoculado, e, ao inocular um microrganismo positivo, este mudará a cor do meio para azul. Caso seja negativo, o meio permanecerá verde. É interessante colocar o citrato de Simmon's como primeiro teste em uma bateria, pois qualquer resquício de nutriente proveniente de outro teste pode provocar um falso-positivo (MacFADDIN, 2000).

2.2.4 Motilidade, produção de indol e de gás sulfídrico

Segundo Seeley Jr. *et al.* (1990), os testes de motilidade, produção de indol e de gás sulfídrico (H_2S) podem ser realizados no meio de cultura denominado ágar SIM (Sulfide-Indole-Motility). A produção de H_2S é visualizada através de uma reação onde o local de inoculação ficará preto. No caso de uma bactéria móvel, a coloração enegrecida poderá se espalhar por todo o meio. Para que ocorra esta reação, é necessário que o meio de cultura possua na sua constituição sais de metais como ferro e bismuto.

Algumas bactérias têm a habilidade de degradar o aminoácido triptofano em indol. Além do indol, outros produtos podem ser gerados através desta degradação, como ácido pirúvico, amônia e energia, que podem ser posteriormente metabolizados pelo microorganismo. A produção de indol é detectada através da utilização de um reagente, que, ao combinar-se com este elemento, gera uma reação química que resulta em mudança de cor. Um dos reagentes que pode ser utilizado neste teste é o reativo de Kovac's, que deve ser acrescentado ao meio onde o microorganismo foi inoculado (por exemplo, ágar SIM). Após o período de incubação, o reativo de Kovac's é administrado, gerando uma coloração rosa, classificando como positiva a reação, ou seja, houve produção de indol. No caso da reação ser negativa, a coloração permanecerá amarela, sendo esta a cor original do reagente. Pode-se verificar uma coloração laranja ao colocar-se o reagente, classificando o teste como variável, pois esta cor indicaria a

presença de um composto que poderia ser um precursor do indol (MacFADDIN, 2000).

Para verificar se uma bactéria é móvel ou imóvel, pode-se utilizar meios semi-sólidos, como o SIM. Assim como os demais testes, esta é uma forma de diferenciar gêneros e espécies de microrganismos. A amostra bacteriana é inoculada com o uso de uma agulha bacteriológica, bem ao centro do meio de cultura, até a metade do conteúdo do tubo. Após a incubação, se a amostra for móvel, haverá uma migração do organismo além da zona de inoculação, se difundindo pelo meio, causando turbidez. Caso a amostra seja negativa, haverá crescimento somente ao longo da linha de inoculação (MacFADDIN, 2000).

2.2.5 Deaminação da fenilalanina

O teste da deaminação da fenilalanina consiste em colocar a amostra a ser testada em um meio de cultura que contenha, entre outros compostos, o aminoácido fenilalanina. Este meio geralmente é um ágar e deve ser preparado com um longo bisel, pois é neste que a amostra será inoculada. Após a incubação a 37°C por 24h, se ocorrer a deaminação da fenilalanina, será possível detectar seu produto, o ácido fenilpirúvico, através da formação de um complexo de cor verde ao administrar uma solução de cloreto férrico sobre o local onde a amostra foi inoculada (BARON & FINEGOLD, 1990). A transformação da fenilalanina em ácido fenilpirúvico é uma atividade enzimática característica do Gênero *Proteus* (OLIVEIRA, 2000).

2.2.6 Urease

A presença da enzima urease também é uma forma de diferenciação entre os microrganismos. Primariamente, este teste era utilizado somente para diferenciar o gênero *Proteus* de outras bactérias Gram-negativas. Atualmente, este teste é utilizado para diferenciar algumas espécies bacterianas e auxiliar na identificação de outras. O teste consiste em verificar se um microorganismo produz a enzima urease, cuja função é degradar a uréia, transformando-a em duas moléculas de amônia, provocando a alcalinização do meio. Para a realização deste teste utiliza-se o caldo uréia, que deve ser preparado de acordo com as orientações do fabricante. Após a incubação a 37°C por 24h, se o meio estiver rosa, o resultado é positivo. Caso o meio permaneça laranja, o

resultado é negativo (MacFADDIN, 2000; SEELEY JR. *et al.*, 1991).

2.2.7 Hemólise

A maioria dos microrganismos recebidos em um laboratório de microbiologia é semeada em ágar sangue, pois este meio de cultura é propício para o crescimento de amostras fastidiosas, além de ser o meio de eleição dos microbiologistas para iniciar a identificação bacteriana a partir da morfologia colonial apresentada. Nos Estados Unidos, utiliza-se o sangue de ovelha para preparar este meio, sendo que na Europa é utilizado o sangue de cavalo. É também no ágar sangue que pode-se verificar se uma bactéria é hemolítica ou não, pois algumas produzem enzimas extra-celulares que lisam as células vermelhas, produzindo uma hemólise total, chamada de β -hemólise, ou há a produção de zonas com coloração esverdeada ao redor das colônias, caracterizando a hemólise parcial, ou α -hemólise. Ainda pode-se constatar que uma bactéria não provocou nenhum tipo de hemólise, sendo então considerada não hemolítica, podendo ser classificada como γ -hemólise (BARON & FINEGOLD, 1990; SEELEY JR. *et al.*, 1991). Para verificar adequadamente se houve ou não a produção de hemólise em uma placa de ágar sangue, deve-se observá-la com uma luz incidindo por trás da placa (BARON & FINEGOLD, 1990).

Além dos testes convencionais para identificação de microrganismos, atualmente existem inúmeros testes comerciais, que possuem, dentro de seu sistema, várias provas bioquímicas. Nos testes mais modernos, existem perfis bioquímicos armazenados em programas de computador, que comparam o resultado da análise de uma amostra com os perfis de microrganismos já conhecidos, e identificam a amostra com o maior índice de segurança possível. Caso necessário, o computador indica a realização de mais testes para confirmar a identidade do isolado. O sistema API (API, Bio-Mérieux AS, Lyon, France) é um dos exemplos deste tipo de teste, e, apesar de ter sido um dos pioneiros, continua sendo usado com sucesso em todo o mundo (BETTELHEIM, 1994).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Amostras bacterianas

As 261 amostras de *Escherichia coli* analisadas no presente estudo são provenientes de quadros respiratórios, lesões de celulite e camas aviárias (Figura 1), sendo que deste total, quatro amostras estão sem as informações sobre sua origem. As amostras respiratórias (51) foram isoladas no ano de 1995 pela equipe do CDPA - Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária, situado em Porto Alegre, RS, e conservadas em frascos contendo uma solução de BHI (Brain Heart Infusion) e glicerol a 50%, numa proporção de 1:4. As 139 amostras de lesões de celulite foram obtidas no momento do abate das aves, tendo sido coletados porções de pele e de tecido subcutâneo dos animais que apresentavam alterações compatíveis com esta patologia. As amostras de cama (67) são oriundas dos galpões onde estas aves estavam sendo criadas. Este material foi coletado em 60 propriedades pertencentes a três integrações avícolas, localizadas no Rio Grande do Sul, em 2002.

A parte experimental desta pesquisa foi realizada integralmente nas instalações do CDPA-UFRGS, situadas em Porto Alegre.

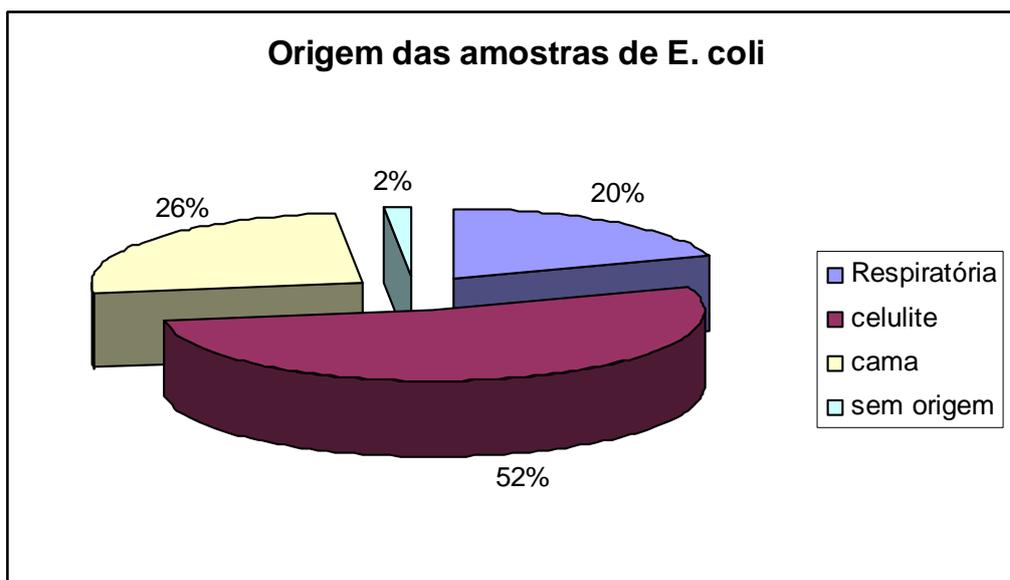


Figura 1 - Origem das amostras de *E. coli*.

3.2 Testes bioquímicos

A escolha dos testes realizados neste experimento, com o objetivo de caracterizar bioquimicamente as amostras de *E. coli*, foi feita através de uma revisão bibliográfica, levando-se em consideração os testes citados com maior frequência na literatura especializada.

A Tabela 2 demonstra o comportamento esperado da *E. coli* para os testes realizados neste estudo.

Tabela 2 - Perfil bioquímico esperado para as amostras de *E. coli* em relação aos testes realizados neste experimento.

Testes	<i>E. coli</i>
Hemólise	Variável
Citrato de Simmon's	Negativo
Fenilalanina Deaminase	Negativo
Produção de Indol	Positivo
Produção de Gás Sulfídrico (H ₂ S)	Negativo
Motilidade	Variável
Adonitol	Variável
Arginina	Variável
Lisina	Positivo
Ornitina	Variável
D-manose	Positivo
Dulcitol	Variável
Glicose	Positivo
Lactose	Positivo
Manitol	Positivo
Melibiose	Variável
Rafinose	Variável
Ramnose	Variável
Sacarose	Variável
Salicina	Variável
Sorbitol	Variável
Urease	Negativo

Os meios de cultura utilizados neste trabalho foram preparados conforme as orientações dos fabricantes e o armazenamento dos mesmos, bem como a leitura e interpretação dos resultados, foram realizados de acordo com a metodologia descrita por MacFaddin (2000), e encontram-se detalhados no APÊNDICE A. As amostras que não apresentaram resultados de acordo com o esperado para o padrão de *E. coli* (positivo ou negativo) foram analisadas novamente.

O teste de hemólise foi realizado em placas de Petry contendo ágar sangue, preparado com 5 a 8% de sangue de ovelha desfibrinado. As placas, após serem semeadas, eram incubadas a 37°C por 24h, e, após este período, observadas para a verificação da presença ou não de zonas de hemólise junto às colônias.

3.3 Inóculo

Foram retirados 20 microlitros (μL) de cada amostra de *E. coli* que estava estocada em BHI e glicerol e colocados em tubos de ensaio contendo 3 mL de BHI, os quais permaneceram por 24h a 37°C. Após este período, cada cultura bacteriana foi semeada em EMB, pois este é um meio de cultura seletivo e diferencial para *E. coli*, pois suas colônias adquirem uma coloração verde-metálica ou preta neste meio (Figuras 2 e 3), sendo facilmente diferenciadas de outras bactérias gram-negativas, e em BHA (Brain Heart Agar), meio de cultura não-seletivo, e colocadas na estufa a 37°C por mais 24h, conforme a Figura 4.



Figuras 2 e 3 - Colônias de *E. coli* em EMB.



Figura 4 - Colônias de *E. coli* em BHA.

Os inóculos foram preparados a partir das colônias bacterianas isoladas no BHA. Estas foram colocadas em tubos contendo solução salina estéril a 0,85%, a fim de que a carga bacteriana neles contida atingisse um grau de turbidez semelhante a 0,5 na escala de MacFarland. Após o preparo desta solução, realizou-se a inoculação de 50 μ L de cada amostra nos testes bioquímicos líquidos. Para verificar a presença hemólise, as amostras foram estriadas em ágar sangue, e para os testes de citrato de Simmon's, deaminação da fenilalanina e pesquisa para motilidade, produção de H₂S e Indol, utilizou-se uma agulha bacteriológica para sua inoculação. A seguir, as placas e os tubos eram colocados em estufas a 37°C, por 24 a 48 horas, sendo que os testes de descarboxilação de aminoácidos permaneciam por até 96 horas na estufa, sendo observados diariamente. Estes procedimentos foram realizados para todas as 261 amostras de *E. coli* analisadas neste experimento. Após o término desta etapa, os resultados das provas bioquímicas, positivas ou negativas, foram relacionados com os Índices de Patogenicidade das amostras, obtidos por Souza (2006).

3.4 Controles

Para cada teste bioquímico realizado, foi utilizado um controle negativo e um controle positivo, para a certificação de que estavam sendo preparados de forma adequada. Além dos controles, a cada série de amostras testadas, uma bateria de testes sem inóculo foi incubada concomitantemente, visando verificar se os meios de cultura apresentavam-se sem alterações ou contaminações.

As bactérias que foram selecionadas para constituírem os controles dos testes estavam armazenadas na bacterioteca do CDPA, tendo sido identificadas na Fundação Oswaldo Cruz, situada no Rio de Janeiro (FIOCRUZ), exceto a *Klebsiella pneumoniae*, que foi cedida pelo Professor Dr. Marcos Gomes, do Setor de Microbiologia da Faculdade de Veterinária da UFRGS (Tabela 3).

Tabela 3 - Bactérias utilizadas como controles dos testes bioquímicos.

Testes	Controles positivos	Controles negativos
Hemólise	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	<i>Salmonella sp</i>
Citrato de Simmon's	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>E. coli</i> ATCC 25922
Fenilalanina Deaminase	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>E. coli</i> ATCC 25922
Produção de Indol	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>K. pneumoniae</i>
Produção de Gás Sulfídrico (H ₂ S)	<i>P. mirabilis</i>	<i>E. coli</i> ATCC 25922
Motilidade	<i>P. mirabilis</i>	<i>K. pneumoniae</i>
Arginina	<i>Salmonella sp.</i>	<i>Morganella morganii</i>
Lisina	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. mirabilis</i>
Ornitina	<i>M. morganii</i>	<i>K. pneumoniae</i>
Adonitol	<i>K. pneumoniae</i>	<i>M. morganii</i>
D-manose	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. mirabilis</i>
Dulcitol	<i>Salmonella sp.</i>	<i>M. morganii</i>
Glicose	<i>E. coli</i> ATCC 25922	-
Lactose	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>M. morganii</i>
Manitol	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. mirabilis</i>
Melibiose	<i>K. pneumoniae</i>	<i>M. morganii</i>
Rafinose	<i>K. pneumoniae</i>	<i>M. morganii</i>
Ramnose	<i>Kluyvera sp.</i>	<i>P. mirabilis</i>
Sacarose	<i>K. pneumoniae</i>	<i>Salmonella sp</i>
Salicina	<i>Kluyvera sp.</i>	<i>M. morganii</i>
Sorbitol	<i>K. pneumoniae</i>	<i>M. morganii</i>
Urease	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>E. coli</i> ATCC 25922

Estas bactérias eram retiradas dos estoques em ágar nutriente e semeadas semanalmente em ágar Mac Conkey. Após a incubação a 37°C por 24h, eram preparadas e inoculadas de forma similar às amostras a serem testadas, para servirem como controles dos testes bioquímicos.

3.5 Cálculo dos Índices de Patogenicidade das amostras

Os Índices de Patogenicidade que foram utilizados neste trabalho, com o objetivo de verificar se havia relação entre os resultados dos testes bioquímicos e a patogenicidade das amostras, foi obtido por Souza, em 2006. Este realizou um teste de patogenicidade em pintos de um dia, inoculando as amostras de *E. coli* (10 pintos para cada amostra), via subcutânea, na região abdominal posterior. Os animais foram observados por até 7 dias após a inoculação, sendo que os que vinham à óbito eram necropsiados e observados quanto à presença de aerossaculite, pericardite, perihepatite, peritonite e celulite. Caso o animal não viesse a óbito até o sétimo dia, era sacrificado e também se averiguava a presença das lesões citadas anteriormente. Além destes critérios, o tempo de morte e uma constante denominada “Fator de Bonificação de Sobrevivência” também foram utilizados para compor a fórmula matemática para o cálculo do Índice de Patogenicidade individual das amostras, sendo possível, então, não só classificá-las como patogênicas ou apatogênicas, mas sim mensurar a intensidade da patogenicidade, pois este método foi capaz de classificar o IP das amostras numa escala de 1 a 10.

3.6 Análise estatística

Para a realização das análises estatísticas dos resultados dos testes bioquímicos, sua relação com as diferentes origens e com os Índices de Patogenicidade, utilizou-se o programa computacional JMP 6.0, SAS Institute, Inc. USA (2005).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O objetivo deste trabalho foi traçar o perfil bioquímico de 261 amostras de *E. coli* provenientes de lesões de celulite, quadros respiratórios e camas de aviários. Além disso, procurou-se verificar a possibilidade de relacionar estes resultados com o Índice de Patogenicidade das amostras. Os resultados obtidos sobre perfil bioquímico das amostras de *E. coli* estão na Tabela 4.

Tabela 4 - Perfil bioquímico das 261 amostras de *E. coli* provenientes de diferentes materiais de origem avícola.

Testes	Resultados	
	Positivos	Negativos
Hemólise	18,01%	81,99%
Citrato de Simmon's	0%	100%
Fenilalanina	0%	100%
Produção de Indol	91,57%	8,43%
Produção de Gás Sulfídrico (H ₂ S)	0,38%	99,62%
Motilidade	47,51%	52,49%
Arginina	26,44%	73,56%
Lisina	98,85%	1,15%
Ornitina	77,01%	22,99%
Adonitol	22,61%	77,39%
D-manose	100%	0%
Dulcitol	77,39%	22,61%
Glicose	100%	0%
Lactose	100%	0%
Manitol	100%	0%
Melibiose	100%	0%
Rafinose	83,91%	16,09%
Ramnose	97,32%	2,68%
Sacarose	72,03%	27,97%
Salicina	48,66%	51,34%
Sorbitol	99,23%	0,77%
Urease	0%	100%

As amostras de *E. coli* comportaram-se conforme o esperado para o padrão da espécie nos testes de citrato de Simmon's, fenilalanina e urease, onde 100% das amostras foram negativas. Em relação à produção de gás sulfídrico, 99,62% (n=260) das amostras foram negativas, e 0,38% (n=1) apresentaram a produção deste gás. Os resultados obtidos nos testes de D-manose, lactose, glicose e manitol também corresponderam ao padrão da *E. coli*, pois 100% (n=261) das amostras foram positivas. Em relação à produção de indol, 91,57% (n=239) das amostras foram positivas, e 8,43%

(n=22) foram negativas. Para o teste de descarboxilação da lisina, 98,85% (n=258) das amostras foram positivas, enquanto 1,15% (n=3) foram negativas. Estes resultados estão de acordo com Bettelheim (1994), Baron & Finegold (1990) e Barnes *et al.* (1997). No entanto, em relação ao teste de descarboxilação da lisina, Seeley Jr. *et al.* (1991) o considera como variável, assim como Montgomery *et al.* (2005) e Rosenberger *et al.* (1985), enquanto os demais autores consultados o têm como positivo para *E. coli*, assim como foi constatado nas amostras testadas neste experimento. Os testes com percentual de positivos abaixo de 10% foram considerados negativos, e os positivos apresentaram percentual de positividade a partir de 90%. Os testes enquadrados como variáveis obtiveram entre 10% e 89,9% de positividade (BARON & FINEGOLD, 1990; BETTELHEIM, 1994).

Dentre os testes considerados como variáveis para a *Escherichia coli*, a Melibiose, o Sorbitol e a Ramnose apresentaram, respectivamente, 100%, 99,23% (n=259) e 97,32% (n=254) de positividade, não apresentando a variabilidade esperada. Raji *et al.* (2003) também encontraram alta frequência (100%) das amostras de *E. coli*, com diferentes graus de patogenicidade, positivas para ramnose em seu estudo. Bettelheim (1994) e Baron & Finegold (1990), em contrapartida, enquadram a fermentação de melibiose e ramnose como variáveis para *E. coli*, enquanto consideram o sorbitol como um teste positivo para esta bactéria. Seeley Jr. *et al.* (1991) comentam que o sorbitol e a ramnose são variáveis para *E. coli*. Ao analisar 103 amostras de *E. coli* em relação a várias características *in vitro*, dentre elas, seu comportamento bioquímico, Montgomery *et al.* (2005) encontraram resultados variáveis para fermentação de sorbitol, melibiose e ramnose. Os demais testes de fermentação de carboidratos comportaram-se como variáveis, e serão comentados posteriormente.

Em relação à hemólise, 18,01% (n=47) foram positivas, enquanto 81,99% (n=214) foram negativas. Montgomery *et al.* (2005) também verificaram a produção de hemólise como variável para as 103 amostras de *E. coli* que analisaram. Brito (2002), ao estudar amostras de *E. coli*, constatou que nenhuma foi capaz de provocar hemólise em ágar sangue. Raji *et al.* (2003) verificaram que 10% das amostras originárias de casos clínicos de colibacilose eram hemolíticas, e as amostras isoladas de casos de morte embrionária apresentaram 2,22% de positividade para o teste de hemólise.

A motilidade das amostras foi variável, sendo 47,51% (n=124) positivas e 52,49% (n=137) negativas, sendo estes resultados similares aos encontrados por Montgomery *et al.* (2005) e Rosenberger *et al.* (1985), sendo que este último ainda ressalta que não foi possível relacionar a motilidade com o grau de patogenicidade. Barnes *et al.* (1997), Seeley Jr. *et al.* (1991) e Oliveira (2000) classificam o teste de motilidade como variável para *E. coli*, enquanto Bettelheim (1994), Baron & Finegold (1990) e Macfaddin (2000) o consideram como positivo. Brito (2002) encontrou 88% de motilidade ao avaliar 52 amostras de *E. coli*, e Raji *et al.* (2003) ao analisarem 93 amostras de *E. coli*, observaram que 92 foram móveis e 1 foi imóvel.

Nos testes de descarboxilação de aminoácidos, 26,44% (n=69) das amostras foram positivas para a arginina, enquanto 73,56% (n=192) foram negativas. Em relação a ornitina, 77,01% (n=201) foram positivas, e 22,99% (n=60) foram negativas. Estes resultados estão de acordo com a literatura consultada (Macfaddin (2000); Seeley Jr. *et al.* (1991); Bettelheim (1994); Baron & Finegold (1990), bem como são similares aos encontrados por Montgomery *et al.* (2005). Rosenberger *et al.* (1985) não incluíram a arginina em seus testes, mas em relação a ornitina, seus resultados foram semelhantes aos aqui encontrados. Barnes *et al.* (1997) também descrevem a ornitina como variável para *E. coli*, e igualmente não incluíram a arginina na sua lista de características diagnósticas para este microrganismo.

Nas provas de fermentação de carboidratos, constatou-se que dos oito testes realizados, cinco se caracterizaram como variáveis: adonitol, com 22,61% (n=59) das amostras positivas e 77,39% (n=202) negativas; dulcitol, sendo 77,39% (n=202) positivas, e 22,61% (n=59) negativas; rafinose, com 83,91% (n=219) de amostras positivas, e 16,09% (n=42) de amostras negativas; sacarose, onde 72,03% (n=188) apresentaram-se positivas, e 27,97% (n=73) foram negativas, e, finalmente, a salicina, com 48,66% (n=127) das amostras positivas, e 51,34% (n=134) negativas. Estes resultados coincidem com os encontrados por Montgomery *et al.* (2005), e discordam de Rosenberger *et al.* (1985) em relação a salicina, onde estes não encontraram nenhuma amostra de *E. coli* apta a fermentá-la. Em relação ao adonitol, os resultados obtidos estão de acordo com Ferreira & Köbil (2000), que também o consideram variável para *E. coli*, mas estão em desacordo com Macfaddin (2000); Seeley Jr. *et al.* (1991); Bettelheim (1994); Baron & Finegold (1990), que classificam o adonitol como

negativo para *E. coli*. Por outro lado, a fermentação variável de salicina, dulcitol, rafinose e sacarose estão em concordância com estes autores. A melibiose, o sorbitol e a ramnose, já tratados anteriormente, não se apresentaram como testes variáveis neste experimento. A Figura 5 demonstra os resultados dos testes bioquímicos considerados variáveis para *E. coli*, de acordo com a literatura, realizados neste trabalho:

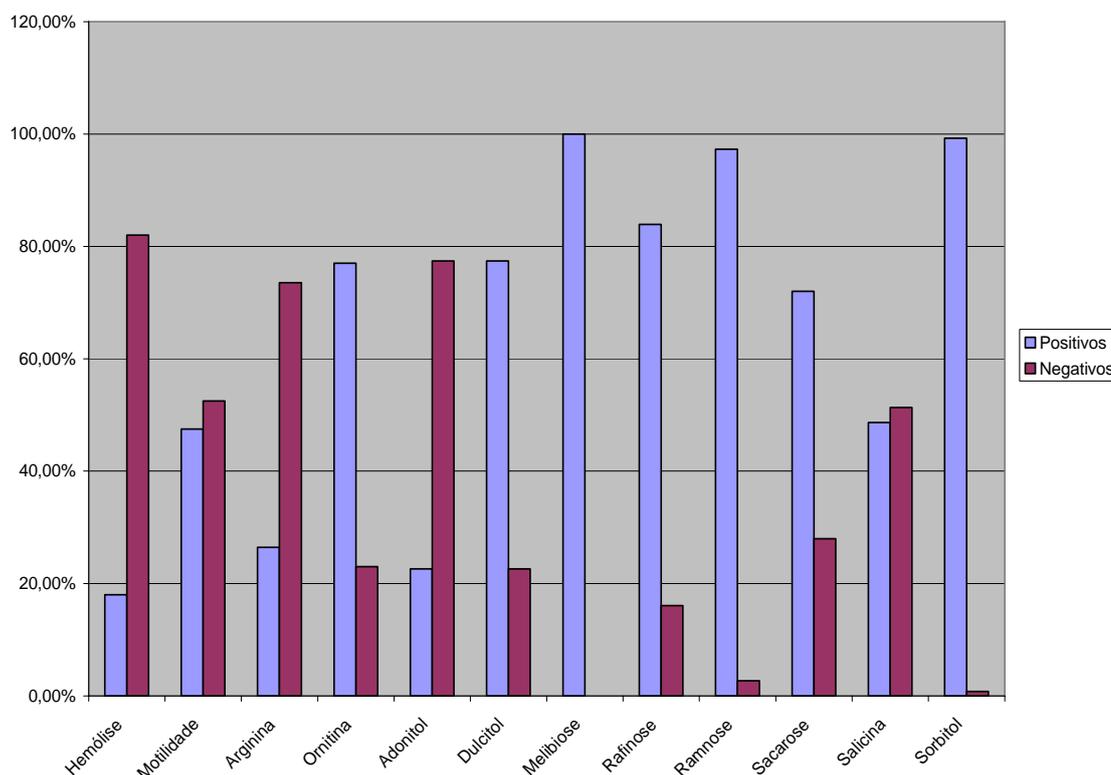


Figura 5 – Resultados obtidos neste experimento para os testes considerados variáveis para *E. coli*.

Ao observar os resultados dos testes variáveis para *E. coli*, de acordo com as origens das amostras, verificou-se que estes apresentam algumas diferenças entre si, e também em relação aos resultados dos testes quando analisados como um todo. Por exemplo, nas amostras de quadros respiratórios, a presença de hemólise e a fermentação de adonitol foram negativas, pois obtiveram, respectivamente, 92,16% e 90,20% de resultados negativos nestes testes. Por outro lado, a utilização da rafinose por estas amostras foi positiva, pois 92,16% delas fermentaram este carboidrato, enquanto que os exemplares obtidos em outros materiais foram variáveis para o teste. Os demais testes permaneceram como variáveis, mesmo sendo agrupados em relação a sua origem, assim como os testes positivos e negativos para *E. coli* mantiveram-se com estas características, independentemente da sua proveniência. As Tabelas 5, 6 e 7

demonstram estas informações.

Tabela 5 – Resultados dos testes variáveis para *E. coli* nas amostras de camas de aviários.

Teste Bioquímico	Amostras Negativas	Amostras Positivas
Adonitol	61,19%	38,81%
Arginina	83,58%	16,42%
Dulcitol	35,82%	64,18%
Hemólise	85,07%	14,93%
Motilidade	52,24%	47,76%
Ornitina	29,85%	70,15%
Rafinose	35,82%	64,18%
Sacarose	44,78%	55,22%
Salicina	40,30%	59,70%

Tabela 6 – Resultados dos testes variáveis para *E. coli* nas amostras de celulite aviária.

Teste Bioquímico	Amostras Negativas	Amostras Positivas
Adonitol	79,86%	20,14%
Arginina	67,63%	32,37%
Dulcitol	15,11%	84,89%
Hemólise	76,98%	23,02%
Motilidade	53,24%	46,76%
Ornitina	19,42%	80,58%
Rafinose	10,07%	89,93%
Sacarose	25,90%	74,10%
Salicina	59,71%	40,29%

Tabela 7 – Resultados dos testes variáveis para *E. coli* nas amostras de quadros respiratórios.

Teste Bioquímico	Amostras Negativas	Amostras Positivas
Adonitol*	90,20%	9,80%
Arginina	76,47%	23,53%
Dulcitol	27,45%	72,55%
Hemólise*	92,16%	7,84%
Motilidade	52,94%	47,06%
Ornitina	25,49%	74,51%
Rafinose*	7,84%	92,16%
Sacarose	11,76%	88,24%
Salicina	41,18%	58,82%

* indicam os testes que tiveram resultados diferentes na análise por origem, em relação aos resultados dos testes quando as amostras foram analisadas juntas.

Muitas pesquisas vêm sendo desenvolvidas com o objetivo de verificar a correlação entre amostras de *Escherichia coli* isoladas de aves e a presença de fatores de virulência, mortalidade em pintos de um dia, influência da origem do isolado (celulite, problemas respiratórios, cama, fezes) na patogenicidade e suas características bioquímicas. Atualmente, a maioria destes estudos prioriza a relação entre os genes que codificam a expressão dos fatores de virulência e os testes de mortalidade em pintos de um dia, verificando a patogenicidade das amostras ao relacioná-las com a capacidade de levar os animais a óbito dentro de um período previamente estipulado.

Dentro da linha de pesquisa sobre colibacilose existente no CDPA-UFRGS, Souza (2006) desenvolveu uma metodologia para calcular os Índices de Patogenicidade (IP) de amostras de *E. coli* de origem aviária, levando em consideração não só a capacidade dos microorganismos em causar morte em pintos de um dia, mas também o tempo de morte e a capacidade de causar lesões compatíveis com septicemia. Estes dados foram utilizados neste trabalho, a fim de verificar a possibilidade de relacionar o perfil bioquímico das amostras de *E. coli* com seus IP's (Tabela 8). Observou-se que as médias dos IP's das amostras positivas para arginina, dulcitol, rafinose e sacarose foram significativamente ($P \leq 0,05$) maiores que a média dos IP's das amostras negativas. Já com o indol e com a salicina ocorreu o oposto, pois as médias dos IP's das amostras negativas foram significativamente maiores do que a média dos IP's das amostras positivas. Resumindo, dentre os testes variáveis para *E. coli* realizados neste experimento, as amostras positivas para arginina, dulcitol, rafinose e sacarose foram mais patogênicas que as demais. Por outro lado, as amostras negativas para indol e salicina também encontraram-se entre as mais patogênicas. Estes resultados discordam de Raji *et al.* (2003), que afirmaram não ser possível relacionar a atividade metabólica de diferentes amostras de *E. coli*, pois todas fermentaram carboidratos de forma similar, exceto o adonitol, onde a maioria fermentadora foi de sorotipos não-patogênicos. Rosenberger *et al.* (1985) também constataram que a atividade metabólica foi semelhante em diferentes isolados, não sendo possível associá-la com a patogenicidade, entretanto, verificaram que as amostras positivas para o adonitol foram, em sua maioria, altamente patogênicas. Em contrapartida, Montgomery *et al.* (2005) comentam que foi possível correlacionar a origem das amostras de *E. coli* e seu perfil bioquímico com a letalidade em ovos de galinha embrionados.

Tabela 8 – Perfil bioquímico das amostras de *E. coli* e sua relação com as médias dos IP's.

Teste Bioquímico	Amostras Negativas	Amostras Positivas	Média IP- Negativas	Média IP- Positivas
Adonitol	202	59	4,25	4,04
Arginina	192	69	3,92	5,00*
Citrato	261	0	4,2	-
D-Manose	0	261	-	4,2
Dulcitol	59	202	3,21	4,50*
Fenilalanina	261	0	4,2	-
Glicose	0	261	-	4,2
H ₂ S	260	1	4,22	1,44
Hemólise	214	47	4,17	4,37
Indol	22	239	6,48	4,00*
Lactose	0	261	-	4,2
Lisina	3	258	2,56	4,22
Manitol	0	261	-	4,2
Melibiose	2	259	6,18	4,19
Motilidade	137	124	4,41	3,97
Ornitina	60	201	4,7	4,06
Rafinose	42	219	2,38	4,56*
Ramnose	7	254	5,18	4,18
Sacarose	73	188	3,18	4,60*
Salicina	134	127	4,77	3,60*
Sorbitol	2	259	6,75	4,19
Uréia	261	0	4,2	-

* - Diferença significativa ($P \leq 0,05$)

Posteriormente, verificaram-se as médias dos IP's das amostras de *E. coli*, agrupando-as por origem, em relação aos testes bioquímicos variáveis. Além destes, também se realizaram estas análises para o teste de indol, pois, apesar de ter sido considerado como positivo para as amostras analisadas, foi possível relacioná-lo com a patogenicidade das mesmas. Assim, constatou-se que os isolados de camas de aviários negativos para o adonitol obtiveram maior média de IP que a média geral de IP's das amostras para este teste. Também se observou que as médias dos IP's destas amostras, quando positivas para rafinose e sacarose, foram significativamente mais altas que as médias dos demais testes, como está ilustrado na Tabela 9.

Tabela 9 – Resultados dos testes variáveis para amostras de *E. coli*, provenientes de camas de aviários, relacionando-os com as médias de seus IP's.

Teste Bioquímico	Amostras negativas	Amostras positivas	Média IP-Negativas	Média IP-Positivas
Adonitol	41	26	2,64*	1,50
Arginina	56	11	1,97	3,39
Dulcitol	24	43	1,93	2,35
Hemólise	57	10	2,12	2,67
Indol	2	65	4,31	2,14
Motilidade	35	32	1,86	2,57
Ornitina	20	47	1,93	2,32
Rafinose	24	43	1,17	2,77*
Sacarose	30	37	1,22	2,99*
Salicina	27	40	2,59	1,94

* - Diferença significativa ($P \leq 0,05$)

As amostras de *E. coli* obtidas em lesões de celulite aviária, negativas para os testes de indol, ornitina e salicina demonstraram maior IP que as positivas para estes testes (Tabela 10). Esta relação com o IP e a ornitina não foi verificada quando todas as amostras, independente da origem, foram analisadas, enquanto que o observado nos outros testes citados vem de encontro com esta análise geral.

Tabela 10 – Resultados dos testes variáveis para amostras de *E. coli*, oriundos de lesões de celulite aviária, relacionando-os com as médias de seus IP's.

Teste Bioquímico	Amostras negativas	Amostras positivas	Média IP-Negativas	Média IP-Positivas
Adonitol	111	28	4,59	5,74
Arginina	94	45	4,6	4,28
Dulcitol	21	118	3,94	4,97
Hemólise	107	32	4,76	5,01
Indol	18	121	6,88*	4,51
Motilidade	74	65	5,08	4,52
Ornitina	27	112	6,7*	4,36
Rafinose	14	125	3,61	4,95
Sacarose	36	103	4,56	4,91
Salicina	83	56	5,43*	3,92

* - Diferença significativa ($P \leq 0,05$)

Em relação às amostras isoladas de quadros respiratórios de aves, não houve relação entre a origem e a patogenicidade das amostras, como se pode verificar na Tabela 11, discordando do resultado da análise geral das amostras, onde foi possível

associar alguns testes com os IP's das mesmas. Convém chamar a atenção para o fato de que, apesar de não ter sido possível realizar a correlação estatística entre os resultados dos testes e a patogenicidade, as amostras positivas para o adonitol tiveram uma média de IP alta, mesmo sendo em pequeno número. As amostras positivas para este carboidrato, originárias de casos de celulite, também apresentaram IP mais alto que as negativas. Estes dados concordam com Rosenberger *et al.* (1985), que verificaram que as amostras positivas para o adonitol eram mais patogênicas que as negativas. Outra questão relevante na análise destas amostras é que a única negativa para o indol apresentou um IP muito elevado.

Tabela 11 – Resultados dos testes variáveis para amostras de *E. coli*, isoladas de quadros respiratórios de aves, relacionando-os com as médias de seus IP's.

Teste Bioquímico	Amostras negativas	Amostras positivas	Média IP- Negativas	Média IP- Positivas
Adonitol	46	5	5,06	7,60
Arginina	39	12	5,2	5,67
Dulcitol	14	37	4,27	5,71
Hemólise	47	4	5,43	4,00
Indol	1	50	8,95	5,24
Motilidade	27	24	5,89	4,66
Ornitina	13	38	4,78	5,49
Rafinose	4	47	5,24	5,32
Sacarose	6	45	4,98	5,36
Salicina	21	30	5,31	5,31

Ao comparar os dados da análise de todas as amostras juntas, em relação aos testes realizados neste trabalho e sua relação com os IP's, com os resultados obtidos nas análises das amostras agrupadas por origem, constatou-se que as amostras de camas de aviários, negativas para o adonitol tiveram uma média de IP significativamente maior que as positivas, fato que não se observou nas amostras das outras duas origens, nem na análise geral. Também foi possível associar a patogenicidade dos isolados de cama com os testes de fermentação da rafinose e da sacarose, onde as amostras positivas obtiveram maior média em seus IP's que as negativas para estes testes. Na análise geral das amostras este fenômeno também foi observado. Foi possível relacionar as amostras de celulite com patogenicidade para os testes de indol, salicina e ornitina, quando positivas para os mesmos. A relação entre patogenicidade e positividade para a ornitina não ocorreu na análise geral das amostras, ao contrário do indol e da salicina. Por outro

lado, na análise geral, os IP's das amostras positivas para a arginina e o dulcitol foram maiores que os das negativas, possibilitando que estes testes pudessem ser relacionados com patogenicidade, mas isto não foi observado ao avaliar as amostras por origem.

5 CONCLUSÕES

Ao término deste trabalho, verificou-se que, independentemente da origem da amostra:

a. Todas as amostras de *E. coli* foram negativas para os testes de citrato de Simmon's, fenilalanina e urease, e positivas para D-manose, lactose e manitol, tendo reagido conforme o esperado para esta espécie bacteriana.

b. A fermentação de sorbitol, melibiose e ramnose foi positiva para a maioria das amostras analisadas, não apresentando a variabilidade relatada por outros autores.

c. A atividade metabólica das amostras foi variável para os testes de fermentação de adonitol, rafinose, sacarose, salicina e dulcitol.

d. Nas provas de descarboxilação de aminoácidos, a arginina e a ornitina apresentaram-se como variáveis.

e. A motilidade e a produção de hemólise das amostras testadas foram variáveis.

f. Foi possível relacionar o Índice de Patogenicidade das amostras com os resultados de algumas provas bioquímicas, ao constatar-se que as amostras positivas para arginina, dulcitol, rafinose e sacarose possuíram maior IP que as demais. Por outro lado, as amostras negativas para indol e salicina testadas neste trabalho apresentaram IP maior que as positivas para estes testes.

Posteriormente, ao ordenar as amostras por origem, constatou-se diferenças nos resultados dos testes bioquímicos variáveis para *E. coli* entre as distintas origens e também em relação aos resultados de todas as amostras agrupadas (análise geral). Pode-se também verificar uma correlação entre os Índices de Patogenicidade, a origem das amostras e os resultados de alguns destes testes.

REFERÊNCIAS

- ABEF (Associação Brasileira dos Produtores e Exportadores de Frangos). **Relatório anual 2006**. Disponível em < [http:// www.abef.com.br](http://www.abef.com.br) >. Acesso em: 26 nov. 2007.
- ASSIS, A. C. B. & SANTOS, B. M. 2005. Patogenicidade *In Vivo* e *In Vitro* de amostras de *Escherichia coli* de origem aviária. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**. v. 3, n.2. Disponível em < [http:// www.scielo.com.br](http://www.scielo.com.br) >. Acesso em: 7 julho 2006.
- AVEWORLD. < [http:// www.aveworld.la](http://www.aveworld.la) >. Acesso em: 14 out. 2007.
- BARNES, H. J.; VAILLANCOURT, J-P; GROSS, W. B. Colibacillosis. In: **Diseases of Poultry**. 10th ed. Ed. Calnek, B. D. Ames: University Press, 1997. p. 631-644. 1231p.
- BARON, E. J. & FINEGOLD, S. M. **Diagnostic Microbiology**. 8th ed. St. Louis: The C. V. Mosby Company, 1990. 861p.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária/Delegacia Federal de Agricultura e Reforma Agrária/Serviço de Inspeção Federal/ Setor de Estatística, 2006.
- BETTELHEIM, K. A. Biochemical Characteristics of *E. coli*. In: **Escherichia coli in domestic animals and humans**. Ed. Gyles, C. L.: Guelph, Cab International, 1994. p. 3-30. 666p.
- BRITO, B. G. de. Fatores de virulência e variabilidade genética de amostras de *Escherichia coli* isoladas de aves com celulite. São Paulo: USP, 2002. Tese (Doutorado em Microbiologia) Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade São Paulo.
- DELICATO, E. R.; BRITO, B. G.; GAZIRI, L. C. J.; VIDOTTO, M. C. Virulence-associated genes in *Escherichia coli* isolates from poultry with colibacillosis. **Veterinary microbiology**. v. 94, n.2, p. 97-103, 2003.
- ELFALDIL, A. A.; VAILLANCORT, 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, 1996a.
- ELFALDIL, A. A.; VAILLANCORT, J. P.; MEEK, A. H. Farm management risk factors associated with cellulitis in broiler chickens in Southern Ontario. **Avian Diseases**. v. 40, n. 3, p. 699-706, 1996b.
- FERREIRA, A. J. P. & KÖBIL, T. **Colibacilose Aviária**. In: Doenças das Aves. Ed. Berchieri Júnior, A. & Macari, M. Campinas: FACTA, 2000. p. 197-207. 505 p.
- GOMIS, S. M.; GOMIS, A. I. U.; HORADAGODA, N. U.; WIJEWARDENE, T. G.; ALLAN, B. J. 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.
- GROSS, W.G. Diseases due to *Escherichia coli* in poultry. In: ***Escherichia coli in domestic animals and humans***. Ed. Gyles, C. L. Guelph: Cab International, 1994. p. 237-259. 666p.
- JEFFREY, J. S.; SINGER, R. S.; O'CONNOR, R.; ATWILL, E. R. Prevalence of pathogenic *Escherichia coli* in the broiler house environment. ***Avian Diseases***. v. 48, n. 1, p. 189-195, 2004.
- 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. 475-479, 2001.
- LA RAGIONE, R. M. & WOODWARD, M. J. Virulence factors of *Escherichia coli* serotypes associated with avian colisepticaemia. ***Research in Veterinary Science***. v. 73, n. 1, p. 27-35, 2002.
- LIOR, H. Classification of *Escherichia coli*. In: ***Escherichia coli in domestic animals and humans***. Ed. Gyles, C. L. Guelph: Cab International, 1994. p.31-72. 666p.
- MacFADDIN, J. F. ***Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria***. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. 912p.
- 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 USA. ***Avian Pathology***. v.28, n. 6, p. 573-578, 1999.
- MONTGOMERY, R. D.; JONES, L. S.; BOYLE, C. R.; LUO, Y.; BOYLE, J. A. The embryo lethality of *Escherichia coli* isolates and its relationship to various *In Vitro* attributes. ***Avian Diseases***. v. 49, n. 1, p. 63-69, 2005.
- MORENG, R. E. & AVANS, J. S. ***Ciência e Produção de Aves***. São Paulo: Roca, 1990. 380p.
- OLIVEIRA, S. J. ***Microbiologia Veterinária***. Guia Bacteriológico Prático. 2 ed. Canoas: Editora da ULBRA, 2000. 237p.
- 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.
- RAJI, M. A.; ADEKEYE, J. O.; KWAGA, J. K. P.; BALE, J. O. O. *In vitro* and *in vivo* pathogenicity studies of *Escherichia coli* isolated from poultry in Nigeria. ***Israel Veterinary Medical Association***, v.58, n.1, 2003. Disponível em < http://www.isrvm.org/article/58_1_6.htm >. Acesso em: 3 agosto 2006.
- ROCHA, A. C. G. P. Fatores de virulência de amostras de *Escherichia coli* isoladas de

- frangos de corte com problemas respiratórios. Porto Alegre: UFRGS, 1999 Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Faculdade de veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- ROSENBERGER, J. K.; FRIES, P. A.; CLOUD S. S.; WILSON, R. A. *In vitro* and *in vivo* characterization of avian *Escherichia coli*. II. Factors associated with pathogenicity. **Avian Diseases** v. 29, n.4, p. 1094-1107, 1985.
- SALLE, C.T.P & SILVA, A.B. **Prevenção de doenças/manejo profilático/monitoração**. Doenças das Aves. Ed. BERCHIERI JUNIOR, A. & MACARI, M. Campinas: FACTA, 2000. p. 3-12. 505p.
- SEELEY, JR., H. W.; VANDERMARK, P. J.; LEE, J. J. **Microbes in action. A Laboratory Manual of Microbiology**. 4th ed. New York: W. H. Freeman and Company, 1991.
- SOUZA, G. F. Estabelecimento de uma nova metodologia para o cálculo do índice de patogenicidade em amostras de *Escherichia coli* provenientes da produção de frango de corte. Porto Alegre: UFRGS, 2006 Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Faculdade de veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

APÊNDICE A - Meios de cultura

1. Agar Mac Conkey (Merck®)
2. Base para agar sangue (Oxoid®)
3. Brain Heart Agar - BHA (Merck®)
4. Brain Heart Broth – Caldo cérebro coração (Merck®)
5. Eosyn-Methylene-Blue – EMB (Merck®)

Os meios de cultura acima relacionados encontravam-se na forma desidratada, tendo sido preparados com água deionizada, nas proporções indicadas pelos fabricantes, e autoclavados a 121°C por 15 minutos.

Os meios de cultura descritos abaixo também se encontravam na forma desidratada, sendo que as particularidades de cada um, bem como a forma de leitura dos seus resultados estão comentadas a seguir. Todos foram preparados com água deionizada, seguindo as orientações dos fabricantes, e autoclavados a 121°C por 15 minutos, exceto a base para os testes de fermentação de carboidratos, que era autoclavada a 118°C, e a base para os testes de descarboxilação de aminoácidos, que era autoclavada a 121°C por 10 minutos.

6. Citrato de Simmon's (BD) BBL™

O teste do citrato de Simmon's demonstra a utilização do citrato como fonte de carbono ao provocar um aumento de PH no meio de cultivo, que, no local de inoculação, torna-se azul. Caso o microorganismo seja negativo para o teste, a coloração do meio permanecerá verde, como demonstra a Figura 6.

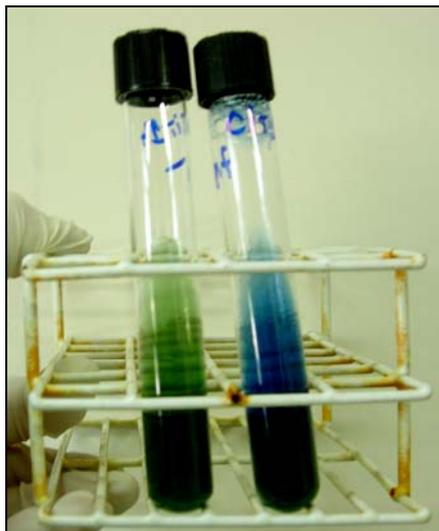


Figura 6 - Teste do Citrato de Simmon's.

7. Fenilalanina (BD) Difco™

As amostras bacterianas capazes de produzir ácido fenilpirúvico, ao serem inoculadas em ágar fenilalanina, apresentaram uma coloração verde escura quando acrescentada uma solução de cloreto férrico na sua superfície. No caso das amostras negativas, o meio permaneceu inalterado, como demonstrado na Figura 7.

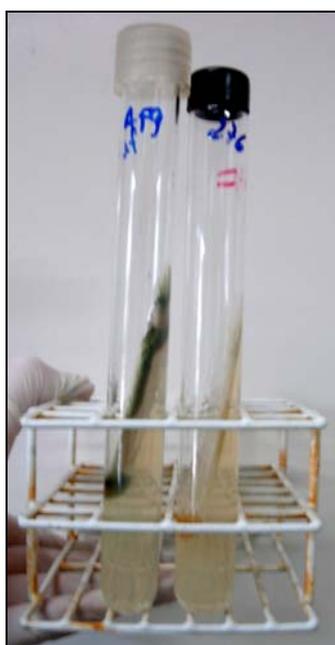


Figura 7 – Teste da fenilalanina.

8. Caldo uréia (BD) Difco™

O caldo uréia é utilizado para verificar a presença da enzima urease, que será demonstrada pela mudança na cor do meio, originalmente laranja, para rosa, no caso de positividade. (Figura 8).



Figura 8 - Teste da urease.

9. Sulfide-Indole-Motility – SIM (Merck®)

O meio SIM foi utilizado para verificar se as amostras analisadas eram móveis e se produziam gás sulfídrico e indol (Figura 9). Após acrescentar o reagente de Kovac's, os tubos que apresentaram uma coloração amarela na sua superfície foram negativos para a produção de indol, e os que apresentaram coloração rosa foram positivos. Em relação à produção de gás sulfídrico, os tubos enegrecidos demonstram a sua formação, enquanto os tubos em cor amarela (cor original do meio) foram negativos para sua produção. Nos tubos positivos para a produção do gás, pode-se diferenciar se os microorganismos neles inoculados eram móveis ou imóveis, pois, no primeiro caso, a coloração preta se espalhou pelo meio de cultura. No caso das amostras imóveis, a coloração preta ficou limitada à zona de inoculação. Em relação a motilidade, as amostras móveis cresceram por todo o meio de cultivo, tornando-o turvo, já as imóveis apresentaram crescimento ao longo da zona de inoculação.



Figura 9 - Teste de motilidade e produção gás sulfídrico e indol.

10. Fermentação de carboidratos

Utilizou-se o Caldo Base para Carboidratos Vermelho de Fenol (BD) BBL™ para realizar os testes de fermentação de carboidratos. Após seu preparo, acrescentou-se o açúcar ou álcool desejado, na concentração de 1%, exceto a salicina, que foi preparada a 0,5%. Os testes foram considerados positivos quando o meio ficou amarelo, demonstrando que houve a utilização do carboidrato, resultando na liberação do ácido lático, que diminui o PH do meio de cultivo, mudando a sua cor. No caso do meio ficar rosa, o resultado para o teste era considerado negativo, assim como quando a coloração permanecia vermelha, pois esta é a cor original do meio de cultivo, sem inoculo (Figura 10). A leitura destes testes foi realizada após 24 horas de incubação na estufa a 37°C, e, no caso de resultado negativo, aguardava-se mais 24 horas para a leitura final. Os tubos que apresentaram cor laranja foram considerados positivos. Os carboidratos utilizados neste experimento foram:

Adonitol (Vetec®)

Dulcitol (Vetec®)

Manitol (BD) Difco™

D-manose (Inlab Ltda.®)

Melibiose (Vetec®)

Rafinose (Vetec®)

Ramnose (Vetec®)
Salicina (Vetec®)
Sorbitol (Vetec®)
Lactose (BD) Difco™
Sacarose (Merck®)
Glicose (Merck®)

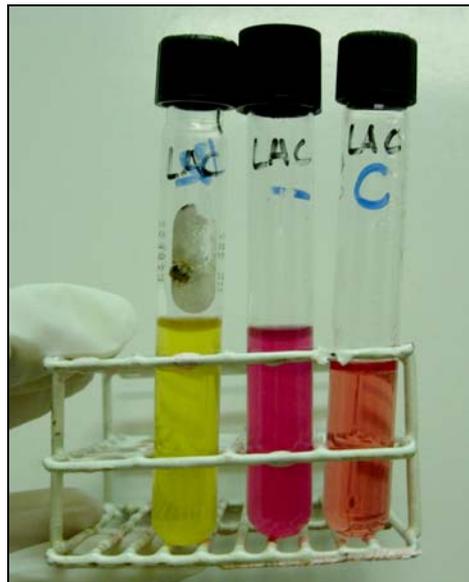


Figura 10 - Teste para fermentação de carboidratos.

11. Descarboxilação de aminoácidos

Para a realização dos testes de descarboxilação de aminoácidos, foi utilizada a Base Moeller para descarboxilação (BD) Difco™. Os aminoácidos testados neste experimento foram adicionados à base, na concentração de 1%. A leitura dos testes durou entre 24 horas e 96 horas após a inoculação das amostras, seguindo o protocolo descrito por MacFaddin (2000). Os tubos considerados negativos permaneciam com a coloração original do meio (verde clara), ou apresentavam-se amarelos. No caso das amostras positivas, estas eram visualizadas através de mudanças na cor do meio de cultivo, que se tornava lilás ou roxo (Figura 11).



Figura 11 - Testes de descarboxilação de aminoácidos.