

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE *Escherichia coli*
POTENCIALMENTE PATOGÊNICAS EM AVES SELVAGENS
E POMBOS-DOMÉSTICOS NA CIDADE DE JABOTICABAL-
SP**

Clarissa Araújo Borges

Bióloga

2015

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE *Escherichia coli*
POTENCIALMENTE PATOGÊNICAS EM AVES SELVAGENS
E POMBOS-DOMÉSTICOS NA CIDADE DE JABOTICABAL-
SP**

Clarissa Araújo Borges

Orientador: Prof. Dr. Fernando Antônio de Ávila

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Microbiologia Agropecuária.

2015

Borges, Clarissa Araújo
B732d Detecção e caracterização de *Escherichia coli* potencialmente patogênicas em aves selvagens e pombos-domésticos na cidade de Jaboticabal-SP / Clarissa Araújo Borges. -- Jaboticabal, 2015
xiv, 60 p. : il. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2015
Orientador: Fernando Antônio de Ávila
Banca examinadora: Luiz Augusto do Amaral, Ariel Eurides Stella, José Moacir Marin, Oliveira Caetano de Freitas Neto
Bibliografia

1. Epidemiologia. 2. ExPEC. 3. Multirresistência. 4. Patógenos zoonóticos. 5. Saúde pública. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 576.8:598.2

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

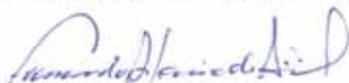
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE *Escherichia coli* POTENCIALMENTE PATOGÊNICAS EM AVES SELVAGENS E POMBOS-DOMÉSTICOS NA CIDADE DE JABOTICABAL-SP

AUTORA: CLARISSA ARAÚJO BORGES

ORIENTADOR: Prof. Dr. FERNANDO ANTONIO DE AVILA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM MICROBIOLOGIA AGROPECUÁRIA , pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. FERNANDO ANTONIO DE AVILA

Departamento de Patologia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal



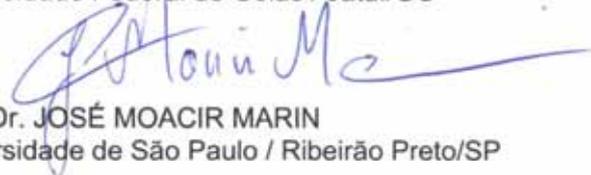
Prof. Dr. LUIZ AUGUSTO DO AMARAL

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal



Prof. Dr. ARIEL EURIDES STELLA

Universidade Federal de Goiás / Jataí/GO



Prof. Dr. JOSÉ MOACIR MARIN

Universidade de São Paulo / Ribeirão Preto/SP



Prof. Dr. OLIVEIRO CAETANO DE FREITAS NETO

Universidade Federal da Paraíba / Areia/PB

Data da realização: 27 de janeiro de 2015.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

CLARISSA ARAÚJO BORGES - nascida a 29 de dezembro de 1984 em Uberlândia - MG. Iniciou o curso de Ciências Biológicas, no ano de 2003, na Universidade Federal de Uberlândia, concluindo em dezembro de 2007. Em março de 2009 iniciou o curso de mestrado no Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agropecuária na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Universidade Estadual Paulista (FCAV-UNESP), concluindo em fevereiro de 2011. Em março de 2011 iniciou o curso de doutorado no mesmo programa.

Esse trabalho, assim como todas as conquistas da minha vida, eu dedico àqueles que me apoiam e acreditam nos meus sonhos, meus amados pais.

AGRADECIMENTOS

À Deus, dedico o meu agradecimento maior, pelas graças e oportunidades concedidas e porque é tudo em minha vida;

Aos meus queridos pais, Cíntia e Zacarias, por todo amor, dedicação, incentivo e apoio em tudo que precisei durante todos esses anos, à minha amada irmã Cássia por estar sempre presente mesmo que de longe, obrigada por torcer tanto pela minha felicidade e, principalmente, por fazer parte dela;

Aos meus familiares, por sempre estarem presentes e por me ajudarem, com compreensão, carinho e amor, a chegar ao fim desta etapa;

Ao meu orientador Prof. Dr. Fernando Antônio de Ávila, por ter me dado a oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa, pelo aprendizado durante este período e por acreditar no meu potencial;

À Prof. Dra. Subhashinie Kariyawasam por seus valiosos conselhos e por sua gentil acolhida na Pennsylvania State University;

Aos amigos Lívia, Vanessa, Leandro e Marita pela excelente relação pessoal que criamos, por me fazerem rir e suportar as dificuldades encontradas;

Ao João Quintana (*in memoriam*) pelo apoio técnico e amizade e à secretária Edna pelo apoio;

À FAPESP por ter financiado meus estudos e o projeto de pesquisa;

A todos que contribuíram para que eu trilhasse esse caminho...

...Meus mais sinceros agradecimentos!

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xi
LISTA DE FIGURAS.....	xii
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
3. OBJETIVOS.....	10
3.1. Objetivo geral.....	10
3.2. Objetivos específicos.....	10
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	11
4.1. Colheitas e procedimentos iniciais	11
4.2. Reação em cadeia da Polimerase (PCR).....	14
4.3. Detecção de genes de virulência adicionais.....	15
4.4. Teste de patogenicidade em pintainhos de um dia de idade.....	16
4.5. Tipagem filogenética.....	17
4.6. Sorotipagem.....	19
4.7. Eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE).....	19
4.8. Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos.....	20
4.9. Fluxograma do procedimento experimental.....	21

5. RESULTADOS.....	22
5.1. Isolados carreando genes de virulência relacionados a APEC.....	22
5.2. Virulência das estirpes.....	24
5.3. Tipagem filogenética.....	24
5.4. Sorotipagem.....	25
5.5. Isolados de <i>Escherichia coli</i> heterogêneos no PFGE.....	27
5.6. Suscetibilidade aos antimicrobianos.....	29
6. DISCUSSÃO.....	31
7. CONCLUSÕES.....	45
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 22.222/10 do trabalho de pesquisa intitulado "**Detecção e caracterização de STEC e EPEC em aves selvagens e pombos na cidade de Jaboticabal - SP**", sob a responsabilidade do Prof. Dr. Fernando Antonio de Ávila, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 22 de outubro de 2010.

Jaboticabal, 22 de outubro de 2010.

Prof. Dr. Jeffrey Frederico Lui
Presidente - CEUA

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AFEC - *Escherichia coli* isolada de fezes de aves saudáveis

APEC - *Escherichia coli* patogênica aviária

DNA - ácido desoxirribonucléico

ExPEC - *Escherichia coli* patogênica extraintestinal

EDTA - Ácido dietilenodiaminotetracético

FVs - Fatores de Virulência

ITU - Infecção do Trato Urinário

μL - Microlitro

mL - Mililitro

mM - Milimolar

MNEC - *Escherichia coli* associada à meningite neonatal

PBS - Tampão fosfato salino

PFGE - *Pulsed Field Gel Electrophoresis*

pb - Pares de base

PCR - Reação em cadeia da polimerase

TEB - Solução tampão Tris-EDTA-Borato

UPEC - *Escherichia coli* uropatogênica

UV - Ultra-violeta

V - Volt

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Tipos de aves e amostras colhidas nas diferentes regiões dos organismos das aves.....	12
Tabela 2. Taxonomia e amostragem das aves utilizadas para a colheita de amostras.....	13
Tabela 3. Iniciadores utilizados para amplificação dos genes em isolados de <i>E. coli</i> , condições das reações e amostras controle.....	18
Tabela 4. Frequência dos diversos genes de virulência nos 49 isolados de <i>E. coli</i> provenientes de aves selvagens e pombos-domésticos na cidade de Jaboticabal/SP ^a	22
Tabela 5. Nome popular das aves examinadas e sorotipo, virulência, grupo filogenético e perfil de virulência das estirpes de <i>E. coli</i>	25
Tabela 6. Número e porcentagem de resistência dos isolados frente a 17 antimicrobianos utilizados no teste de suscetibilidade, de acordo com o grupo de aves.....	29

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Local e armadilha utilizada para a captura dos pombos-domésticos de vida livre.....	12
Figura 2. Árvore dicotômica para determinação do grupo filogenético de estirpes de <i>E. coli</i> , utilizando os resultados da PCR dos genes <i>Chua</i> , <i>yjaA</i> e do fragmento de DNA TSPE4.C2.....	17
Figura 3. Fluxograma indicando os procedimentos adotados para se obter e caracterizar os isolados de <i>E. coli</i> contendo genes de virulência relacionados à APEC.....	21
Figura 4. Dendrograma mostrando relação de similaridade estabelecida por PFGE.....	28

DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE *Escherichia coli* POTENCIALMENTE PATOGÊNICAS EM AVES SELVAGENS E POMBOS-DOMÉSTICOS NA CIDADE DE JABOTICABAL-SP

RESUMO - *Escherichia coli* que causam doenças fora do intestino são conhecidas como *E. coli* patogênicas extraintestinais (ExPEC) e incluem *E. coli* uropatogênica (UPEC), isoladas de infecção do trato urinário, *E. coli* associada à Meningite Neonatal (MNEC), isoladas de humanos recém-nascidos e *E. coli* patogênica para aves (APEC), responsável pela colibacilose aviária. Esses patótipos possuem similaridades genéticas entre si, sugerindo que APEC tenha um potencial zoonótico. O presente trabalho teve como objetivo detectar e caracterizar estirpes de *E. coli* que possuem genes de virulência relacionados a APEC em aves selvagens e pombos-domésticos, tanto de cativeiro quanto de vida livre, aparentemente saudáveis. Das 500 amostras, foram obtidos 49 isolados que foram analisados por PCR quanto à presença de genes de virulência, submetidos ao teste de patogenicidade *in vivo*, ao teste de suscetibilidade a antimicrobianos, tiveram a relação epidemiológica estabelecida por PFGE e os sorotipos e grupos filogenéticos identificados. Os genes de virulência e alguns antígenos somáticos e flagelares encontrados nos isolados foram anteriormente associados a estirpes de APEC de alta virulência e também foram detectados em ExPEC humanas. A maior parte dos isolados pertencem aos grupos filogenéticos B1 e B2, previamente descritos como grupos que albergam isolados patogênicos oriundos de animais e os que causam infecções extraintestinais, respectivamente, além disso, esses grupos possuíam os isolados com maior número de genes de virulência e de alta virulência, enquanto a maioria dos isolados do grupo D foram não virulentos. Os pombos-domésticos de cativeiro tiveram o maior número de isolados multirresistentes aos antimicrobianos (100,0%), seguido pelas aves selvagens domiciliadas (75,0%), aves selvagens de vida livre (53,3%) e pombos-domésticos de vida livre (26,3%). A análise de similaridade por PFGE mostrou alta heterogeneidade entre os isolados, mesmo entre os grupos de cada ave, indicando que não existem clones prevalentes nas *E. coli* desses animais. Os resultados mostraram que aves selvagens e pombos-domésticos são reservatórios de *E. coli* contendo genes de virulência relacionados a APEC e multirresistentes a antimicrobianos, sendo potencialmente patogênicas para humanos e outros animais, podendo transmitir esse patógeno ao contaminar o ambiente, representando um risco à saúde pública.

Palavras-chave: epidemiologia, ExPEC, multirresistência, patógenos zoonóticos, saúde pública

DETECTION AND CHARACTERIZATION OF POTENTIAL PATHOGENIC *Escherichia coli* IN WILD BIRDS AND URBAN PIGEONS IN JABOTICABAL – SP

ABSTRACT - *Escherichia coli* strains that cause disease outside the intestine are known as extraintestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC) and include uropathogenic *E. coli* (UPEC), isolated from urinary tract infections, neonatal-meningitis *E. coli* (NMEC), isolated from human neonates and avian pathogenic *E. coli* (APEC), responsible for colibacillosis in birds. These pathotypes shows similarities that suggest that the avian strains potentially have zoonotic properties. The aim of this study was to detect and characterize *E. coli* strains possessing virulence genes related to APEC in wild birds and pigeons, both captivity and free-living, apparently healthy. Of 500 samples collected, there were 49 isolates obtained that were analyzed by PCR for the presence of virulence genes, submitted to pathogenicity test in one day old chicks, to antimicrobial susceptibility test, serotyping, phylogenetic typing and PFGE. Virulence genes, somatic and flagellar antigens found in the isolates were previously associated to high pathogenic APEC and were also detected in human extraintestinal infections strains. Most of the isolates belonged to phylogenetic groups B1 and B2, previously described as groups that harbor pathogenic isolates from animals and the ones that cause extraintestinal infections, respectively. Furthermore, these groups had isolates with the highest number of virulence genes and highly pathogenic, while most strains of group D were no pathogenic. The captivity pigeons showed more multidrug-resistant isolates (100.0%), followed by domestic wild birds (75.0%), free-living wild birds (53.3%) and free-living pigeons (26.3%). The isolates showed high heterogeneity by PFGE, indicating that there were not *E. coli* prevalent clones among these birds. The results showed that wild birds and pigeons are reservoirs of multidrug-resistant *E. coli* harboring virulence genes related to APEC, being potentially pathogenic for humans and other animals, being able to transmit this pathogen by contaminate the environment, posing a risk to public health.

Keywords: epidemiology, ExPEC, multidrug resistance, public health, zoonotic pathogens

1. INTRODUÇÃO

Escherichia coli (*E. coli*) é um habitante regular da microbiota do trato gastrointestinal de muitos animais, atuando de maneira importante na manutenção da fisiologia intestinal. No entanto, algumas estirpes podem causar doenças em humanos e animais, como as *Escherichia coli* patogênicas extraintestinais (ExPEC), responsáveis por causar infecções do trato urinário (UPEC), meningite neonatal (MNEC) e colibacilose aviária (APEC), levando a significativa morbidade e mortalidade. Esses patótipos possuem similaridades genéticas entre si, portanto é possível que isolados de APEC possuam potencial zoonótico.

O compartilhamento do mesmo habitat por pombos-domésticos, animais selvagens e humanos resulta em um risco à saúde pública. Sabe-se que as aves selvagens e os pombos-domésticos são reservatórios de microrganismos patogênicos, incluindo *E. coli*, podendo disseminá-los no ambiente ou mesmo transmití-los para humanos e outros animais. Os sinais clínicos causados por ExPEC podem se desenvolver muitos dias ou mesmo semanas após a colonização do intestino, o que dificulta a identificação de fontes desse microrganismo, portanto potenciais reservatórios ambientais de microrganismos de importância para a saúde pública necessitam ser investigados.

A migração das aves selvagens se constitui em um mecanismo de disseminação de microrganismos a grandes distâncias dos locais aonde o patógeno foi adquirido. Apesar de muitas aves selvagens e dos pombos-domésticos não serem migratórios, eles podem disseminar patógenos no ambiente. Ainda não está claro se as aves sinantrópicas, em especial os pombos-domésticos (*Columba livia*) e se também aves selvagens, agiriam como reservatórios de ExPEC. No Brasil, ainda são poucos os estudos realizados sobre o risco que essas aves representam quanto à disseminação desses patógenos para seres humanos e/ou outros animais.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Escherichia coli é uma bactéria Gram-negativa, pertencente à família *Enterobacteriaceae*, e coloniza o trato gastrointestinal de mamíferos e aves. Normalmente a *E. coli* e seus hospedeiros coexistem com benefícios mútuos, e essas estirpes comensais dificilmente causam doenças, exceto em hospedeiros imunocomprometidos ou com o trato gastrointestinal lesionado (SOKJA; CARNAGHAM, 1961; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

Algumas estirpes de *E. coli* têm sido envolvidas em doenças que acometem humanos e animais. A capacidade de causar doença se dá devido à aquisição de fatores de virulência (FV), que são definidos como estruturas ou produtos que contribuem para que a bactéria consiga se instalar e provocar a doença, são codificados geneticamente e podem ser transferidos entre diferentes estirpes, surgindo novas combinações, sendo que somente as combinações eficazes dos FV são capazes de causar doenças em organismos saudáveis (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

A aquisição e a perda de elementos genéticos móveis, como plasmídios e transposons, têm um papel crucial na formação do genoma de bactérias patogênicas. Por meio da transferência horizontal de genes, novas características se disseminam para microrganismos receptores (SHAMES et al., 2009). As ilhas de patogenicidade (PAIs), que são grandes aglomerados de genes de virulência, podem ser encontradas em plasmídios ou integradas no cromossomo bacteriano, no entanto, não são encontradas em bactérias não patogênicas. Esses elementos genéticos móveis as tornam capazes de se adaptar a vários hospedeiros e de colonizar, multiplicar e causar danos diversos (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

A célula de *E. coli* é composta por estruturas antigênicas que contribuem para a caracterização dos sorotipos, baseados na identificação de antígenos somáticos (O, *Öhne*) relacionados aos polissacarídeos da parede celular, na identificação dos antígenos capsulares (K, *Kapsel*) relacionados com polissacarídeos capsulares, dos antígenos flagelares (H, *Hauch*) relacionados a proteínas dos flagelos e antígenos fimbriais “F”, importantes no processo de adesão e colonização do hospedeiro (FRANCO; LANDGRAF, 1996; FERREIRA; KNOBL, 2009). O antígeno “O” identifica

o sorogrupo da estirpe, enquanto o sorotipo é baseado nos antígenos O, H e algumas vezes no antígeno K. Existem amostras auto-aglutinantes, que não podem ser sorotipadas devido à perda parcial ou total da cadeia do polissacarídeo (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

Ao longo da escala evolutiva, houve a formação de diferentes clones de *E. coli* devido à aquisição ou eliminação de elementos genéticos. Portanto, esses clones descendem de grupos filogenéticos distintos. De acordo com Clermont, Bonacorsi e Bingen (2000), as estirpes de *E. coli* podem ser classificadas em quatro grupos filogenéticos, denominados A, B1, B2 e D. No grupo B2, predominam os isolados que causam infecções extraintestinais e menos frequentemente no grupo D. O grupo B1 agrega os isolados patogênicos animais, enquanto que no grupo A, predominam os isolados comensais (HERZER et al., 1990; CLERMONT; BONACORSI; BINGEN, 2000). Uma variedade de fatores de virulência associados com infecções extraintestinais está distribuída entre as estirpes dos quatro grupos, onde as do grupo B2, e, em menor grau, do grupo D apresentam maior frequência e diversidade desses fatores (JOHNSON; RUSSO, 2005).

As linhagens de *E. coli* são classicamente distribuídas em três grupos principais, de acordo com critérios clínicos e genéticos: estirpes comensais, patogênicas intestinais ou diarreiogênicas (DEC) e patogênicas extraintestinais (ExPEC) (RUSSO; JOHNSON, 2000). As DEC são geralmente divididas em seis patótipos: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) ou *E. coli* Shigatoxigênica (STEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) e *E. coli* difuso-aderente (DAEC) (NATARO; KAPER, 1998).

As estirpes de ExPEC são genicamente e epidemiologicamente distintas das estirpes comensais e patogênicas intestinais. Elas não produzem doença entérica, entretanto, podem colonizar assintomaticamente o trato intestinal de até 20% dos indivíduos saudáveis (JOHNSON et al., 2002). Sua denominação reflete o sítio de isolamento e não as características que definiriam um patótipo, especificamente com relação ao conjunto de fatores de virulência que possuem. Assim, as *E. coli* isoladas de infecção urinária são denominadas UPEC (*E. coli* uropatogênica), as isoladas de meningites são conhecidas como MNEC (*E. coli* associada à meningite neonatal) e

as isoladas de colibacilose aviária são chamadas de APEC (*E. coli* patogênica aviária) (JOHNSON; RUSSO, 2002a).

No entanto, *E. coli* isolada de um determinado sítio pode causar infecções em outros sítios do hospedeiro ou mesmo em hospedeiros diversos, por exemplo, algumas amostras de UPEC podem causar meningite neonatal e vice-versa e também ExPEC isoladas de humanos parecem poder causar infecções em animais domésticos e aves e vice-versa (JOHNSON et al., 2001; JOHNSON; RUSSO, 2002b; MOULIN-SCHOULER et al., 2007). Essas faltas de congruências levaram os autores Russo e Johnson (2000) a proporem a denominação de ExPEC (*E. coli* patogênica extraintestinal), com o propósito de englobar todas as estirpes de *E. coli* patogênicas extraintestinais, independentemente do hospedeiro e do sítio que foi isolada.

Em humanos, as ExPEC são a causa mais comum de infecções adquiridas no trato urinário (ITU) e a bactéria Gram-negativa mais frequentemente associada a infecções da corrente sanguínea (septicemia), tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento. São também causadoras de meningite neonatal, infecções intra-abdominais, pneumonia, diversas infecções dos tecidos moles e osteomielite (RILEY, 2014). Ademais, infecção causada por ExPEC é uma das principais causas de morbidade e mortalidade, principalmente em pacientes imunocomprometidos e que são submetidos a técnicas invasivas, o que resulta em um significativo aumento dos custos na área da saúde (RUSSO; JOHNSON, 2003).

Nos animais, as ExPEC estão relacionadas à infecções do trato urinário de cães e gatos, piometras, pneumonias e também às doenças sistêmicas em aves (JOHNSON et al., 2001; MOULIN-SCHOULER et al., 2007; SURA et al., 2007). As APEC (*E. coli* patogênica aviária), relacionadas a infecções extraintestinais em aves, estão presentes na microbiota intestinal e outras superfícies mucosas de aves domésticas e selvagens, podendo também ser isoladas do ambiente de criação das aves. Estirpes de APEC são responsáveis por perdas significativas na indústria aviária, sendo que o termo colibacilose engloba um grande número de doenças existentes, dentre as quais a septicemia, celulite, pericardite, perihepatite, onfalite, peritonite, infecções do trato respiratório e síndrome da cabeça inchada. Para alguns autores a ocorrência dessas infecções requer fatores predisponentes como

condições ambientais e infecções primárias, bacterianas ou virais, o que faz com que se acredite que linhagens APEC atuem como agentes patogênicos secundários (DHO-MOULIN; FAIRBROTHER, 1999).

Os mecanismos de virulência de APEC têm sido continuamente estudados e considerados multifatoriais. Os mais frequentemente mencionados são os de adesão (*pap*), de produção de colicina (*cva*), de presença de aerobactina (*iut*), de resistência sérica (*iss*), sideróforos (*iroN*), proteína de membrana externa (*ompT*), hemolisina putativa (*hlyF*) e hemaglutinina temperatura-sensível (*tsh*) (RODRIGUEZ-SIEK et al., 2005a; JOHNSON et al., 2008). A adesão da bactéria à superfície celular é a primeira etapa para a instalação de um processo infeccioso. As bactérias patogênicas são capazes de aderir às células quando possuem uma estrutura de superfície específica, denominada “pili” ou “fimbria” (BRITO et al., 2003; RODRIGUEZ-SIEK et al., 2005a).

A fimbria tipo I é amplamente encontrada estando relacionada à adesão ao trato respiratório superior. Ela seria necessária para a colonização inicial do epitélio respiratório, enquanto outros fatores como motilidade e produção de colicina V seriam responsáveis pela manutenção da infecção e pelo desenvolvimento de lesão na traqueia. Já as adesinas fimbriais P foram inicialmente descritas em linhagens de *E. coli* associadas à infecções do trato urinário de humanos, contudo, estirpes de APEC também apresentam o gene responsável por codificar essa fimbria. As funções da fimbria P em aves de produção são geralmente relacionadas à capacidade de aderir a órgãos internos e proteção contra heterófilos. Ela é codificada pelo operon *pap*, um grupo de 11 genes, que está localizado no cromossomo bacteriano (CAMPOS et al., 2005).

Análises feitas por Kariyawasam et al. (2006) demonstraram que o operon *pap* foi encontrado na linhagem APEC-O1, causadora de colicépticemia, em uma região do genoma que porta genes de patogenicidade adquiridos horizontalmente, ou seja, em uma PAI. Assim, os autores sugerem que a presença do operon *pap* em uma PAI pode demonstrar que a fimbria P, possivelmente, estaria envolvida na mudança de linhagens não virulentas em linhagens virulentas. A adesina fimbrial curli está relacionada à adesão de linhagens de APEC. Embora a função dessas fimbrias ainda não esteja elucidada, acredita-se que possam estar relacionadas à

adesão e à colonização nos estágios iniciais da infecção (OLSEN; JONSSON; NORMARK, 1989).

A expressão de adesinas, a produção de sideróforos e a capacidade de resistir à ação microbicida do soro têm sido consideradas fundamentais para a patogenia da colibacilose, por conferir resistência aos componentes do sistema complemento e a capacidade de sequestrar íon ferro da corrente sanguínea e tecidos dos hospedeiros (FERREIRA; KNOBL, 2009). A capacidade de um patógeno invadir e se multiplicar é influenciada pela disponibilidade de ferro, essencial para todas as células vivas. *E. coli* utiliza o ferro no transporte de oxigênio, na síntese de DNA e no transporte de elétrons (NEILANDS; BINDERREIF; MONTGOMERIE, 1985).

Apesar de o ferro ser encontrado em abundância nos tecidos e fluidos corporais este metal permanece ligado a glicoproteínas ou está na forma insolúvel. A bactéria, por sua vez, possui sistemas especiais que captam o ferro via sideróforos (NEILANDS; BINDERREIF; MONTGOMERIE, 1985). Os genes *fyuA* (“ferric yersiniabactin uptake”) e *irp2* (“iron repressible protein”) que codificam proteínas envolvidas na aquisição de ferro, foram encontrados com alta frequência em linhagens de APEC (RODRIGUEZ-SIEK et al., 2005a; EWERS et al., 2007). A aerobactina é um sideróforo utilizado por *E. coli* para captação e transporte de ferro, sendo portanto importante durante a colonização intestinal, de outros tecidos e desenvolvimento da celulite, visto que o íon ferro é altamente restrito no tecido subcutâneo (BRAUN, 2003).

Existe uma serino-protease autotransportadora, secretada por APEC, que causa a aglutinação dos eritrócitos de aves. A expressão desta proteína é regulada pela temperatura, sendo ativada a 26°C e inativada a 42°C, sendo por isso denominada Tsh (“temperature sensitive haemagglutinin”) (PROVENCE; CURTISS III, 1994). O gene *tsh* está localizado em plasmídios de alto peso molecular, principalmente no plasmídio ColV (RODRIGUEZ-SIEK et al., 2005a). O fato desse gene ser, frequentemente, encontrado em isolados de APEC, levaram Ewers et al. (2004) a proporem a sua utilização como marcador molecular desse patótipo.

A resistência das bactérias aos efeitos bactericidas do sistema complemento do soro do hospedeiro é mediada por estruturas de superfície da bactéria tais como

cápsula, lipopolissacarídeos, produtos do plasmídio ColV e outras proteínas de membrana (WOOLEY et al., 1998). O fator Iss (“increased serum survival”), codificado pelo gene *iss* está fortemente associado à virulência de APEC, estando, significativamente, mais presente nestas linhagens do que em linhagens de *E. coli* isoladas de aves saudáveis (RODRIGUEZ-SIEK et al., 2005a). O gene *iss*, assim como o gene *tsh*, está localizado em uma ilha de patogenicidade (PAI) do plasmídio ColV (JOHNSON et al., 2006).

As colicinas são substâncias relacionadas à resistência sérica, produzidas por linhagens de *E. coli* com a função de inibir a multiplicação de outras linhagens da mesma espécie ou espécies relacionadas, sendo classificadas em tipo V, A, B, Ia, Ib, Ic, K, N, E1, E2, E3 e DF13 (LIOR, 1994). São encontradas principalmente em bactérias patogênicas relacionadas a infecções extraintestinais em humanos e animais (JEFFREY et al., 2002). Os genes da biossíntese da aerobactina são denominados *iucA*, *iucB*, *iucC* e *iucD* e estão localizados em um único operon. Esses genes têm sido encontrados em plasmídios capazes de codificar a resistência a certos antimicrobianos como os plasmídios R e ColV (VIDOTTO et al., 1991; GOES; GAZIRI; VIDOTTO, 1993).

O tratamento das infecções associadas à ExPEC vem se tornando cada vez mais complexo pela emergência e disseminação da resistência aos antimicrobianos recomendados, tais como fluoroquinolonas, β -lactâmicos e cotrimoxazol (GIUFRÈ et al., 2012). A resistência aos antimicrobianos é um dos fatores mais preocupantes relacionados à saúde coletiva mundial, pois seu desenvolvimento e disseminação estão acontecendo mais rápido que a conscientização sobre o controle do uso de antimicrobianos e o desenvolvimento de novas drogas. O uso indevido e a administração de antimicrobianos em doses abaixo das indicadas são fatores que podem provocar o aumento da população bacteriana resistente (ANSARI; MALIK, 2009; ASM, 2009).

A administração de antimicrobianos em animais com a finalidade de conter infecções bacterianas e como promotores do crescimento também podem selecionar estirpes resistentes tanto de bactérias patogênicas quanto daquelas que fazem parte da microbiota normal, sendo considerado o fator primordial capaz de favorecer a

seleção e a disseminação de microrganismos resistentes aos antimicrobianos, tanto na medicina humana como na medicina veterinária (BENSKIN et al., 2009).

Pouco se sabe sobre a frequência de bactérias resistentes aos antimicrobianos em pombos-domésticos e em aves selvagens (NASCIMENTO et al., 2003; SILVA et al., 2009). Apesar dessas aves não serem constantemente expostas aos antimicrobianos, elas podem ser infectadas com bactérias resistentes por meio do contato com outros animais, que podem servir como veiculadores desses agentes, uma vez que o isolamento de bactérias resistentes tem sido descrito nessas aves, especialmente nas migratórias. Inclusive aquelas mantidas como animais de estimação podem ser reservatórios em potencial para a transferência de bactérias resistentes a drogas. Além de se tornar um problema para conservação de populações de animais selvagens, a disseminação de estirpes resistentes a antimicrobianos pode ter implicações para a saúde pública, a qual depende da frequência de contato com o humano, com os animais de produção e com os alimentos (BENSKIN et al., 2009; SILVA et al., 2009).

Alguns estudos demonstraram que linhagens APEC e linhagens de *E. coli* patogênicas extraintestinais de origem humana compartilham características de virulência. Em um trabalho realizado por Rodriguez-Siek et al. (2005b) demonstrou-se que linhagens de colibacilose aviária e de *E. coli* isoladas de infecções urinárias de humanos (ITU) apresentaram sobreposição de características como sorogrupos, grupos filogenéticos e genótipos de virulência.

Ewers et al. (2007) isolaram linhagens da traqueia, sacos aéreos, pericárdio, baço, fígado e sangue de aves doentes que apresentaram perfil de virulência e antígenos somáticos iguais aos encontrados em linhagens de *E. coli* provenientes de humanos associadas a diferentes infecções extraintestinais. Esses estudos sugerem que APEC e ExPEC humanas podem encontrar desafios similares no momento do estabelecimento da infecção e que compartilham conteúdos de genes de virulência e capacidade patogênica semelhantes. Essas similaridades indicam que APEC pode atuar como causa de infecção ou como reservatório de genes de virulência para linhagens de ExPEC humanas, constituindo-se em um possível perigo zoonótico.

O contato entre aves selvagens e pombos-domésticos com os seres humanos e outros animais tem se tornado comum, podendo tanto as aves representar uma

fonte de infecção para o ser humano, como estirpes de origem humana podem atingir esses animais (HERDT et al., 1994). Alguns estudos mostraram que aves selvagens e pombos-domésticos podem ser portadores de *E. coli* associada a doenças em humanos, como as STEC pertencentes ao sorogrupo O157 e EPEC (FOSTER et al. 2006; SANTANIELLO et al. 2007; FAROOQ et al., 2009; SILVA et al., 2009). Entretanto, poucos são os trabalhos sobre *E. coli* portadora de genes relacionados a APEC nessas aves, com isso, o seu papel como veiculadores desse patógeno pode estar subestimado.

Um estudo mais detalhado envolvendo amostras de aves selvagens e pombos-domésticos é de grande importância, pois essas aves podem ser portadoras desse agente patogênico, sendo fonte de infecção de difícil detecção, podendo estar envolvidas na epidemiologia dessa doença atuando como veículos de transmissão em eventos como fluxos migratórios ou mesmo localmente no seu ambiente, representando um problema importante para a saúde pública e defesa sanitária animal (KRUSE et al., 2004; DUTTA et al., 2013).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

O objetivo geral do presente trabalho consistiu em detectar e caracterizar fenotipicamente e genotipicamente estirpes de *E. coli* contendo genes de virulência relacionados à *E. coli* patogênica aviária (APEC) em aves selvagens e pombos-domésticos.

3.2. Objetivos específicos

3.2.1. Caracterizar os isolados de *E. coli* pela pesquisa de vários genes de virulência a fim de verificar potencial zoonótico;

3.2.2. Determinar se a virulência dos isolados, por meio do teste *in vivo*, apresenta correlação com as associações de genes de virulência;

3.2.3. Determinar o agrupamento filogenético dos isolados;

3.2.4. Estabelecer relação epidemiológica dos isolados por PFGE;

3.2.5. Determinar os sorotipos dos isolados;

3.2.6. Caracterizar o perfil de resistência dos isolados, frente a diferentes drogas antimicrobianas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Colheitas e procedimentos iniciais

Foram colhidas 208 amostras de 90 aves selvagens de vida livre, 66 amostras de 33 aves selvagens domiciliadas e 26 amostras de 10 pombos-domésticos de cativeiro atendidos no Setor de Medicina de Animais Selvagens do Hospital Veterinário da FCAV-UNESP, no período de junho de 2010 a setembro de 2012. Também foram colhidas 200 amostras de 100 pombos-domésticos de vida livre capturados no Setor de gado de leite, da mesma instituição, no período de fevereiro a abril de 2012, totalizando 500 amostras oriundas de 233 aves, sendo que todos os animais estavam aparentemente saudáveis. O local e o tipo de armadilha utilizada para a captura dos pombos-domésticos de vida livre estão disponíveis na Figura 1. As aves foram marcadas com tinta nos pés para evitar a captura do mesmo animal mais de uma vez. As amostras colhidas nas diferentes regiões dos organismos das aves estão dispostas na Tabela 1. As amostras fecais foram colhidas da cloaca, as amostras orofaríngeas da orofaringe, utilizando-se suabes estéreis e as amostras de fígado e intestino foram provenientes das aves que morreram no hospital veterinário. Todas as amostras foram imediatamente colocadas em tubos contendo 5 mL de caldo infusão de cérebro e coração (BHI broth) e mantidas em caixa térmica com gelo até o laboratório. Os tubos contendo as amostras foram incubados aerobicamente a 37°C “overnight”. A Tabela 2 mostra a taxonomia e amostragem de aves utilizadas no presente trabalho.



Figura 1. Local (setor de gado de leite) e armadilha (seta vermelha) utilizada para a captura dos pombos-domésticos de vida livre.

Tabela 1. Tipos de aves e amostras colhidas nas diferentes regiões dos organismos das aves.

Tipos de aves	Amostras				
	Cloaca	Orofaringe	Fígado	Intestino	Total
Aves selvagens de vida livre	90	90	14	14	208
Aves selvagens domiciliadas	33	33	0	0	66
Pombos-domésticos de vida livre	100	100	0	0	200
Pombos-domésticos de cativoiro	10	10	3	3	26
Total	233	233	17	17	500

Tabela 2. Taxonomia e amostragem das aves utilizadas para a colheita de amostras.

Ordem	Família	Espécie		Quantidade
		Nome popular	Nome científico	
Accipitriformes	Accipitridae	Gavião-carijó	<i>Rupornis magnirostris</i>	2
Anseriformes	Anatidae	Cisne-coscoroba	<i>Coscoroba coscoroba</i>	1
Cariamiformes	Cariamidae	Seriema	<i>Cariama cristata</i>	3
Cathartiformes	Cathartidae	Urubu-de-cabeça-preta	<i>Coragyps atratus</i>	2
Charadriiformes	Charadriidae	Quero-quero	<i>Vanellus chilensis</i>	2
Columbiformes	Columbidae	Pomba asa-branca	<i>Patagioenas picazuro</i>	2
		Pombo-doméstico	<i>Columba livia</i>	110
		Rolinha	<i>Columbina talpacoti</i>	12
Falconiformes	Falconidae	Falcão-de-coleira	<i>Falco femoralis</i>	1
		Carcará	<i>Polyborus plancus</i>	5
		Falcão-quiriquiri	<i>Falco sparverius</i>	2
		Gavião-carrapateiro	<i>Milvago chimachima</i>	1
Galliformes	Cracidae	Jacu	<i>Penelope sp</i>	1
Gruiformes	Rallidae	Frango-d'água comum	<i>Gallinula chloropus</i>	1
Passeriformes	Fringillidae	Canário do reino	<i>Serinus canaria</i>	2
	Passeridae	Pardal	<i>Passer domesticus</i>	2
	Thraupidae	Sanhaço	<i>Thraupis sp.</i>	2
	Turdidae	Sabiá-laranjeira	<i>Turdus rufiventris</i>	1
	Tyrannidae	Bentevizinho-do-brejo	<i>Philohydor lictor</i>	3
Pelecaniformes	Ardeidae	Garça-branca	<i>Ardea alba</i>	1
Piciformes	Picidae	Pica-pau-do-campo	<i>Colaptes campestris</i>	1
	Ramphastidae	Tucano-toco	<i>Ramphastos toco</i>	5
Psittaciformes	Cacatuidae	Calopsita	<i>Nymphicus hollandicus</i>	12
	Psittacidae	Maritaca	<i>Aratinga leucophthalma</i>	14
		Periquito-rei	<i>Eupsittula aurea</i>	2

		Papagaio-verdadeiro	<i>Amazona aestiva</i>	21
		Periquito-de-encontro-amarelo	<i>Brotogeris chiriri</i>	5
		Papagaio-do-mangue	<i>Amazona amazonica</i>	3
		Agapornis	<i>Agapornis SP.</i>	1
		Papagaio-chauá	<i>Amazona rhodocorytha</i>	1
		Ararajuba	<i>Guaruba guarouba</i>	1
		Jandaia-mineira	<i>Aratinga auricapillus</i>	1
Strigiformes	Strigidae	Coruja-buraqueira	<i>Athene cunicularia</i>	5
		Coruja-orelhuda	<i>Asio clamator</i>	1
	Tytonidae	Coruja-da-igreja	<i>Tyto furcata</i>	2
Tinamiformes	Tinamidae	Perdiz	<i>Rhynchotus rufescens</i>	2

4.2. PCR para estabelecimento do patótipo e obtenção de isolados

Após o período de incubação, uma alíquota da cultura foi estocada em freezer -80 °C, utilizando 750 µL de cultura e 750 µL de glicerol 30,0% e o restante foi utilizado para fazer a extração do DNA por lise térmica. Descrevendo rapidamente, 1 mL de cada cultura incubada “overnight” foi centrifugado, ressuspendido em 1 mL de PBS, centrifugado novamente, resuspendido com 0,5 mL de água estéril Mili-Q e colocado em água fervente por 10 minutos. O sobrenadante foi centrifugado e usado para a realização de uma PCR de triagem para os genes *iroN*, *ompT*, *iss*, *iutA*, *hlyF* e *cvaC*, que estão relacionados ao patótipo APEC. A extração do DNA assim como os procedimentos de PCR foram realizados de acordo com o protocolo do laboratório de referência para *E. coli* (EcL – Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal). disponível em http://www.apzec.ca/en/APZEC/Protocols/APZEC_PCR_en.aspx com pequenas modificações. A PCR foi realizada com soluções contendo 2 mM de cada dNTP (Fermentas, Europa) 3,6µL de 10X DreamTaq Green Buffer (que contém 20 mM de MgCl₂), 1,25 pmol de cada iniciador, 1 unidade de DreamTaq Green DNA Polymerase (Fermentas, Europa), 4 µL de DNA molde e água para completar 20 µL.

Dois conjuntos de iniciadores foram usados para a PCR, um para *iroN*, *ompT*, *iss*, *iutA* e o outro para *hlyF* e *cvaC*. Os pares de iniciadores, as temperaturas de anelamento e os controles positivos estão descritos na Tabela 3. Os ciclos consistiram de um estágio inicial a 95°C por 2 minutos, seguidos de 25 ciclos, cada um contendo desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento no T_m específico de cada iniciador por 30 segundos, e extensão a 72°C por 30 segundos. O ciclo de extensão final foi a 72°C por 7 minutos. Os produtos de PCR foram visualizados por coloração com Safe DNA Gel Stain (Invitrogen, EUA), após eletroforese em gel de agarose. Todas as PCRs foram realizadas utilizando-se o controle negativo (EcL10600) e controles positivos (Tabela 3). As amostras que não apresentaram nenhum gene da triagem foram descartadas e as positivas para pelo menos um dos genes foram semeadas em placas contendo ágar MacConkey e incubadas a 37°C por 24 horas. Dez colônias típicas de *E. coli* de cada placa foram repicadas em placas contendo ágar BHI, formando dois “pools” (A e B) com cinco colônias cada um e as placas foram incubadas “overnight” a 37°C. Uma PCR com os genes da triagem foi realizada para cada colônia individual do “pool” positivo para pelo menos um dos genes. As colônias positivas na PCR foram estocadas como culturas puras no freezer -80°C e utilizadas nos outros testes. Esta é uma metodologia utilizada no EcL.

4.3. Detecção de genes de virulência adicionais

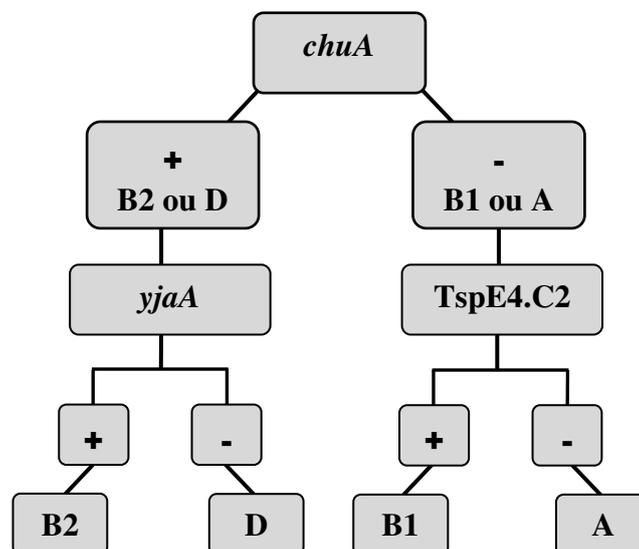
Adicionalmente, todos os isolados foram submetidos a novas PCRs para a detecção de mais 14 genes de virulência, seguindo os ciclos e o protocolo do EcL citados anteriormente. As temperaturas de anelamento estão descritas para cada par de iniciador na Tabela 3. Foram realizadas quatro PCRs duplex para os genes *irp2* e *fyuA*; *tsh* e *sitA*; *traT* e *iucC*; *fimH* e *iucD*; uma PCR triplex para os genes *papGI*, *papGII* e *papGIII* e três PCRs simples para *cnf1*, *papC* e *sfa*.

4.4. Teste de patogenicidade em pintainhos de um dia de idade

O teste foi conduzido no galpão experimental da Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento de Bastos do Instituto Biológico. As aves foram alojadas em gaiolas de arame galvanizado e receberam ração comercial esterilizada e água à vontade durante todo o período experimental. O teste foi realizado de acordo com a metodologia descrita por KNÖBL (2005) e MONROY et al. (2005). Pintinhos machos de postura comercial com um dia de idade, foram inoculados com 0,1 mL de cada cultura bacteriana, no saco aéreo torácico esquerdo. Para a preparação do inóculo foi semeada uma colônia de cada estirpe bacteriana em 10 mL de caldo BHI (Oxoid CM0225), incubando-se por 18 horas a 37°C e em seguida diluindo a mesma numa proporção de 1:10. A concentração do inóculo foi padronizada em 10^7 unidades formadoras de colônias.mL⁻¹ (UFC.mL⁻¹). Para cada estirpe e também para os controles positivo e negativo, foram utilizados grupos de 10 aves. *E. coli* isolada de frangos de corte com doença respiratória crônica (DRC) – EC55 (sorogrupo O1, *iss+* *papC+* *iucD+* *cva/cvi+*) pertencente à coleção de culturas de *E. coli* do Laboratório de Ornitopatologia da USP, foi utilizada como controle positivo para a virulência. As aves usadas como controle negativo foram inoculadas com caldo BHI e em seguida foram mantidas em observação durante 10 dias. De acordo com o índice de mortalidade, as estirpes foram classificadas em altamente virulentas (mortalidade ≥ 80%), intermediária virulência (mortalidade > 50% e < 80%), baixa virulência (mortalidade ≤ 50%) e não virulenta (mortalidade zero). Todas as aves que morreram antes dos 10 dias foram necropsiadas e as que sobreviveram até o final do teste foram primeiramente eutanasiadas e depois necropsiadas, para se avaliar alteração macroscópica.

4.5. Tipagem filogenética

Os isolados foram classificados em quatro grupos filogenéticos de *E. coli* (A, B1, B2 ou D), utilizando-se uma PCR triplex para *chuA*, *yjaA* e o fragmento de DNA TspE4.C2 (CLERMONT; BONACORSI; BINGEN, 2000). Cada reação de amplificação foi conduzida em volume de 20 μ L contendo: 4 μ L de DNA molde; 2,5 μ L de solução de dNTPs (2mM); 1,25 μ L de cada iniciador a 10 μ M; 0,2 μ L da enzima Taq DNA polimerase (5U/ μ L) ; 2,5 μ L de solução tampão para a reação de PCR com MgCl₂ (10X) e 6,0 μ L de água Mili-Q. Esta mistura foi submetida a um termociclador a 94°C por 5 minutos (desnaturação); seguido de 30 ciclos de 94°C por 30 segundos (desnaturação), 55°C por 30 segundos (pareamento) e 72°C por 30 segundos (extensão). O último ciclo foi realizado a 72°C por 10 minutos para completa extensão da Taq DNA polimerase. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese como citado anteriormente. A classificação dos grupos filogenéticos foi realizada de acordo com a árvore dicotômica (Figura 2).



Fonte: adaptado de Clermont, Bonacorsi e Bingen (2000)

Figura 2. Árvore dicotômica para determinação do grupo filogenético de estirpes de *E. coli*, utilizando os resultados da PCR dos genes *chuA*, *yjaA* e do fragmento de DNA TSPE4.C2.

Tabela 3. Iniciadores utilizados para amplificação dos genes em isolados de *E. coli*, condições das reações e amostras controle.

Genes	Sequência de iniciadores (5' – 3')	Amplicon (pb)	Temperatura de anelamento (°C)	Controles positivos	Referências
Aquisição de ferro					
<i>iroN</i>	F - AAGTCAAAGCAGGGGTTGCCCG R - GATCGCCGACATTAAGACGCAG	667	58° C	ECL 13256	Rodriguez-Siek et al. (2005a)
<i>lrp2</i>	F - AAGGATTGCTGTTACCGGAC R - TCGTCGGGCAGCGTTTCTTCT	287	55° C	ECL 13316	Rodriguez-Siek et al. (2005a)
<i>fyuA</i>	F - TGATTAACCCCGCGACGGGAA R - CGCAGTAGGCACGATGTTGTA	787	55° C	ECL 13316	Johnson; Stell (2000)
<i>iutA</i>	F - GGCTGGACATCATGGAACTGG R - CGTCGGGAACGGGTAGAATCG	302	59° C	ECL 13256	Johnson; Stell (2000)
<i>iucC</i>	F - CGCCGTGGCTGGGGTAAG R - CAGCCGGTTCACCAAGTATCACTG	541	58° C	ECL 13316	Skyberg et al. (2003)
<i>iucD</i>	F - TACCGGATTGTC ATATGC AGACCG T R - AATATCTTCTCCAGTCCGGAGAA G	602	63° C	ECL 13316	Siqueira et al. (2009)
<i>sitA</i>	F - AGGGGGCACAACTGATTCTCG R - TACCGGGCCGTTTCTGTGC	608	56° C	ECL 13316	Runyen-Janecky et al. (2003).
Protectinas/resistência ao soro					
<i>iss</i>	F - CAGCAACCCGAACCACTTGATG R - AGCATTGCCAGAGCGGCAGAA	323	57° C	ECL 13256	Rodriguez-Siek et al. (2005a)
<i>traT</i>	F - GGTGTGGTGCGATGAGCACAG R - CACGGTTCAGCCATCCCTGAG	290	58° C	ECL 13316	Johnson; Stell (2000)
Adesinas					
<i>tsh</i>	F - GGGAAATGACCTGAATGCTGG R - CCGCTCATCAGTCAGTACCAC	420	55° C	ECL 13316	Maurer et al. (1998)
<i>fimH</i>	F - TGCAGAACGGATAAGCCGTGG R - GCAGTCACCTGCCCTCCGGTA	508	63° C	ECL 13316	Siqueira et al. (2009)
<i>Sfa</i>	F - GCTGGGCAGCAAAGTATAACTCTC R - CATCAAGCTGTTTGTTCGTCGCCCG	750	76° C	FV 35	Siqueira et al. (2009)
<i>papGI</i>	F - CATGGCTGTTGTTCCCTAAACAT R - GGAATGTGGTGATTACTCAAAGG	696	63° C	J 96	Siqueira et al. (2009)
<i>papGII</i>	F - GGAATGTGGTGATTACTCAAAGG R - TCCAGAGACTGTTCAAGAAGGAC	562	63° C	FVL 2-lac-O4:H1	Siqueira et al. (2009)
<i>papGIII</i>	F - CATGGCTGTTGTTCCCTAAACAT R - TCCAGAGACTGTGCAGAAGGAC	421	63° C	J 96	Siqueira et al. (2009)
<i>papC</i>	F - GACGGCTGTACTGCAGGGTGTGGCG R - ATATCCTTTCTGCAGGGATGCAATA	328	60° C	ECL 13316	Siqueira et al. (2009)
Hemolisina					
<i>hlyF</i>	F - GGCCACAGTCGTTTAGGGTGCTTACC R - GGCGGTTTAGGCATTCCGATACTCAG	450	62° C	ECL 13256	Johnson et al. (2008)
Toxina					
<i>cnf1</i>	F - ATCTTATACTGGATGGGATCATCTTGG R - GCAGAACGACGTTCTTCATAAGTATC	633	57° C	J 96	Johnson; Stell (2000)
Variados					
<i>cvaC</i>	F - CACACACAAACGGGAGCTGTT R - CTTCCCGCAGCATAGTTCCAT	680	53° C	ECL 13256	Johnson; Stell (2000)
<i>ompT</i>	F - TCATCCCGGAAGCCTCCCTCACTACTAT R - TAGCGTTTGCTGCACTGGCTTCTGATAC	496	62° C	ECL 13256	Johnson et al. (2008)
Tipagem filogenética					
<i>ChuA</i>	F - GACGAACCAACGGTCAGGAT R - TGCCGCCAGTACCAAAGACA	270	55° C	ND	Clermont; Bonacorsi; Bingen (2000)
<i>YjaA</i>	F - TGAAGTGTGAGGAGACGCTG R - ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC	211	55° C	ND	Clermont; Bonacorsi; Bingen (2000)
<i>TspE4.C2</i>	F - GAGTAATGTGCGGGGCATTCA R - CGCGCCAACAAGTATTACG	152	55° C	ND	Clermont; Bonacorsi; Bingen (2000)

4.6. Sorotipagem

As estirpes foram sorotipadas no “*E. coli* Reference Center” (ECRC) da Universidade Estadual da Pensilvânia (University Park, EUA), pelo método de sorotipagem padrão (ORSKOV et al., 1977) e por PCR-RFLP (“Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism”) do gene *fliC* responsável pelos flagelos, com base no procedimento descrito por Machado et al. (2000).

4.7. Eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE)

A preparação dos “plugs” e digestão do DNA genômico com *Xba*I (Invitrogen, EUA) foi feita de acordo com o protocolo utilizado no “Center for Disease Control and Prevention” (Ribot et al., 2006). A estirpe de *Salmonella* Braenderup H9812 (ATCC BAA-664) foi utilizada como referência de peso molecular. As condições de eletroforese foram: tempo inicial de 2,2 segundo, tempo final de 54,2 segundos em um gradiente de 6 V cm⁻¹ e um ângulo de 120°. Os géis foram submetidos a eletroforese por 23h. A similaridade dos fragmentos foi comparada usando-se o coeficiente de Dice a 1% de tolerância e 0,5% de otimização e o dendrograma foi construído com o método de agrupamento UPGMA, usando-se o programa BioNumerics versão 7.1 (Matemática Aplicada, Sint-Martens-Latem, Bélgica).

4.8. Suscetibilidade aos antimicrobianos

O Teste de sensibilidade aos antimicrobianos foi realizado pelo método de difusão de disco (CLSI, 2009). Os antimicrobianos testados foram ácido nalidíxico (30µg), amoxicilina + ácido clavulânico (30µg), amicacina (30µg), ampicilina (10µg), cefalotina (30µg), cefoxitina (30µg), ceftiofur (30µg), ceftriaxona (30µg), ciprofloxacina (5µg), cloranfenicol (30µg), estreptomicina (10µg), gentamicina, (10µg), canamicina (30µg), nitrofurantoína (300µg), norfloxacina (10µg), sulfametoxazol+trimetoprim (25µg) e tetraciclina (30µg). Para a realização desses testes as estirpes isoladas foram repicadas em tubos contendo 5 mL de caldo BHI e incubadas a 37°C até atingirem o padrão 0,5 de MacFarland. Após a incubação as culturas diluídas foram semeadas com o auxílio de suabes estéreis em placas contendo ágar Mueller-Hinton e, após aproximadamente 3 minutos, tempo necessário para a secagem da superfície do meio, os discos contendo os antimicrobianos foram colocados. A leitura foi realizada após 18h de incubação a 37°C através da medida dos halos de inibição, com a utilização de régua milimetrada. Os diâmetros obtidos em milímetros foram comparados com os indicados pelo guia CLSI (2009).

4.9. Fluxograma do procedimento experimental

A Figura 3 descreve de forma resumida o procedimento experimental desse trabalho.

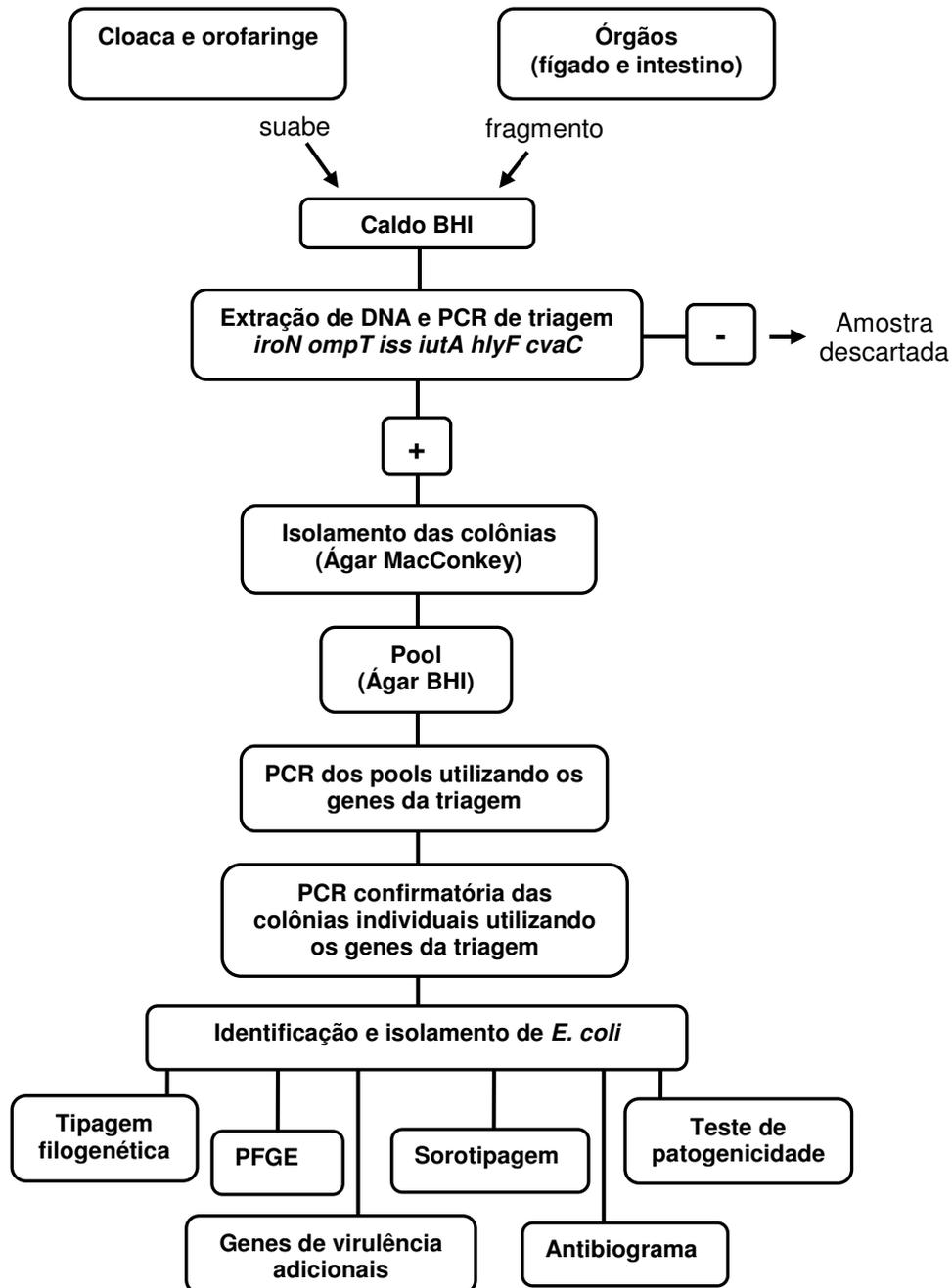


Figura 3. Fluxograma indicando os procedimentos adotados para se obter e caracterizar os isolados de *E. coli* contendo genes de virulência relacionados à APEC.

5. RESULTADOS

5.1. Isolados carreando genes de virulência relacionados à APEC

Um total de 500 amostras de aves selvagens e pombos-domésticos foram submetidas à PCR de triagem para detecção dos genes relacionados à APEC (*cvaC*, *iroN*, *iss*, *iutA*, *ompT* e *hlyF*), das quais 146 amostras foram positivas para pelo menos um desses genes. Após a triagem, 49 isolados foram obtidos, sendo quatro de aves selvagens domiciliadas, 15 de aves selvagens de vida livre, 11 de pombos-domésticos de cativeiro e 19 de pombos-domésticos de vida livre. Os isolados foram submetidos a uma nova PCR para a detecção dos demais genes de virulência: *traT*, *iucC*, *sitA*, *tsh*, *irp2*, *fyuA*, *fimH*, *iucD*, *papGI*, *papGII*, *papGIII*, *papC*, *cnf1* e *sfa*. A frequência de cada gene está disponível na Tabela 4 e o perfil de virulência de cada isolado pode ser visto na Tabela 5.

Tabela 4. Frequência dos diversos genes de virulência nos 49 isolados de *E. coli* provenientes de aves selvagens e pombos-domésticos na cidade de Jaboticabal/SP^a.

Isolados ^b	Genes de virulência													
	<i>iroN</i>	<i>irp2</i>	<i>fyuA</i>	<i>iutA</i>	<i>iucD</i>	<i>iucC</i>	<i>sitA</i>	<i>iss</i>	<i>traT</i>	<i>hlyF</i>	<i>tsh</i>	<i>fimH</i>	<i>cvaC</i>	<i>ompT</i>
1C	+						+	+	+	+				+
2C	+						+	+	+	+				+
3C		+	+				+	+						
3T		+	+				+	+						
4C	+	+	+				+	+						
5T	+			+	+	+	+	+	+	+				+
6C							+	+	+	+				+
7C	+						+	+	+	+				+
8C	+						+	+	+	+				+
9C	+	+	+	+			+	+	+	+			+	+
10C		+	+				+	+	+					
10T		+	+				+	+	+					
11T		+	+				+	+	+					

12C1									+						+
12C2									+		+				
13C									+						
14F		+	+				+	+							
14I		+	+				+	+							
15F	+						+	+	+		+	+			+
%	42,0	47,4	47,4	10,5	5,3	5,3	84,2	94,7	63,1	42,2	5,3	5,3	5,3		47,4

Isolados	Genes de virulência													
	<i>iroN</i>	<i>irp2</i>	<i>fyuA</i>	<i>iutA</i>	<i>iucD</i>	<i>iucC</i>	<i>sitA</i>	<i>iss</i>	<i>traT</i>	<i>hlyF</i>	<i>tsh</i>	<i>fimH</i>	<i>cvaC</i>	<i>ompT</i>
16I	+						+	+	+	+	+	+		+
16T	+	+	+				+							
17I	+						+	+	+	+				+
17C		+	+				+	+						
17T	+						+	+	+					+
18C	+	+	+	+	+	+	+	+		+			+	+
18T	+						+	+	+	+				+
19C	+	+	+				+							
19T	+						+	+	+	+				+
20T	+						+	+	+	+				+
21C	+						+	+	+					+
22C1	+						+	+	+	+	+			+
22C2								+						
23C								+				+		
24C	+						+	+						+
25C								+	+			+		
26C		+	+				+	+	+		+			
27C								+						
28C								+	+			+		
29C							+	+	+					
30C								+						
31C	+						+	+		+				+
32C	+			+		+	+	+	+					+
33T		+	+	+			+	+	+	+	+	+		
34C								+						
35C								+						
36C								+						
37C								+						
38C		+	+				+	+	+		+			
39C		+	+				+	+	+					
%	46,7	26,7	26,7	10,0	6,7	3,3	66,7	93,3	53,3	30,0	16,7	16,7	3,3	40,0

^a Todos os isolados foram negativos para *papGI*, *papGII*, *papGIII*, *papC*, *cnf1* e *sfa*

^b C - cloaca; T - orofaringe; F - fígado; I - intestino

5.2. Virulência das estirpes

O teste de patogenicidade revelou 11 (22,4%) estirpes de *E. coli* de alta virulência (6 de aves selvagens/5 de pombos-domésticos), nove (18,4%) de intermediária virulência (3 de aves selvagens/6 de pombos-domésticos), 16 (32,6%) de baixa virulência (8 de aves selvagens/8 de pombos-domésticos) e 13 (26,5%) estirpes não virulentas (2 de aves selvagens/11 de pombos-domésticos). No decorrer do teste, todas as aves do controle positivo morreram, enquanto as aves do controle negativo permaneceram vivas até o final. As lesões que apresentaram maior frequência foram aerossaculite, ocasionalmente perihepatite e peritonite com depósito de fibrina e enterite. Tanto os sinais clínicos como as lesões macroscópicas ocorreram com maior frequência em aves inoculadas com as estirpes classificadas como de alta e de intermediária virulências. Apenas quatro isolados, todos não virulentos no teste (8C, 12C2, 36C e 39C) não causaram lesões nas aves inoculadas. A virulência de cada isolado pode ser vista na Tabela 5.

5.3. Tipagem Filogenética

Os isolados das aves selvagens domiciliadas pertenceram aos grupos filogenéticos B1 e B2, que apresentaram a frequência de 50,0% cada um. Enquanto que os isolados das aves selvagens de vida livre tiveram 40,0% de frequência no grupo B1, 40,0% no grupo B2, 13,3% no grupo D e 6,6% no grupo A. Em relação aos isolados dos pombos-domésticos de cativeiro, 63,3% pertenceram ao grupo filogenético B1, 27,3% ao grupo B2, 9,1% ao grupo A e nenhum ao grupo D. Enquanto os isolados dos pombos-domésticos de vida livre apresentaram frequência de 58,0% no grupo D, 21,0% no grupo B2, 21,0% no grupo A e nenhum no grupo B1. A maior parte dos isolados não virulentos pertencia ao grupo D e foi proveniente dos pombos-domésticos de vida livre. Na Tabela 5 pode-se observar o grupo filogenético de cada isolado.

5.4. Sorotipagem

Dos 49 isolados submetidos à sorotipagem, 38 (77,5%) foram tipáveis para os antígenos somáticos, sendo identificados 20 sorogrupos, enquanto 36 (73,5%) foram tipáveis para os antígenos flagelares, sendo identificados 12 antígenos. A Tabela 5 contém os sorotipos dos isolados.

Tabela 5. Nome popular das aves examinadas e sorotipo, virulência, grupo filogenético e perfil de virulência das estirpes de *E. coli*.

Aves selvagens Domiciliadas					
Isolados*	Nome Popular	Sorotipo*	Virulência*	Filogenia	Perfil de virulência
1C	Papagaio-verdadeiro	ONT:H14	B	B1	<i>iss+ iroN+ ompT+ hlyF+ sitA+ traT+</i>
2C	Papagaio-verdadeiro	O79:H14	I	B1	<i>iss+ iroN+ ompT+ hlyF+ sitA+ traT+</i>
3C	Papagaio-verdadeiro	O75:H14	B	B2	<i>iss+ sitA+ irp2+ fyuA+</i>
3T	Papagaio-verdadeiro	O75:H2	B	B2	<i>iss+ sitA+ irp2+ fyuA+</i>
Aves selvagens de vida livre					
Isolados	Nome Popular	Sorotipo	Virulência	Filogenia	Perfil de virulência
4C	Carcará	O32:H6	I	B2	<i>iss+ sitA+ irp2+ fyuA+</i>
5T	Carcará	ONT:H9	B	B1	<i>iss+ iroN+ ompT+ iutA+ hlyF+ iucC+ sitA+ traT+ iucD+</i>
6C	Coscoroba	ONT: H34	B	B1	<i>iss+ iroN+ ompT+ hlyF+ sitA+ traT+</i>
7C	Sabiá-laranjeira	O138:HNT	A	B1	<i>iss+ iroN+ ompT+ hlyF+ sitA+ traT+</i>
8C	Falcão-quiriquiri	O106:HNT	NV	A	<i>iss + iroN+ ompT+ hlyF+ sitA+ traT+</i>
9C	Ararajuba	O11:H48	A	D	<i>iss+ iroN+ ompT+ iutA+ hlyF+ cvaC+ iucC+ sitA+ traT+ irp2+ fyuA+</i>
10C	Maritaca	O2: HNT	A	B2	<i>iss+ sitA+ traT+ irp2+ fyuA+</i>
10T	Maritaca	O2: HNT	A	B2	<i>iss+ sitA+ traT+ irp2+ fyuA+</i>
11T	Maritaca	O2: HNT	A	B2	<i>iss+ sitA+ traT+ irp2+ fyuA+</i>

12C1	Rolinha	O152:H7	B	B1	<i>ompT+ traT+</i>
12C2	Rolinha	O106:HNT	NV	B1	<i>iss+ hlyF+</i>
13C	Rolinha	O1:H45	B	D	<i>iss+</i>
14F	Carcará	O83:H6	A	B2	<i>iss+ iucC+ irp2+ fyuA+</i>
14I	Carcará	O83:H6	I	B2	<i>iss+ iucC+ irp2+ fyuA+</i>
15F	Maritaca	O83:H5	B	B1	<i>iss+ iroN+ ompT+ sitA+ traT+ tsh+ fimH+</i>

Pombos-domésticos de cativeiro

Isolados	Nome Popular	Sorotipo	Virulência	Filogenia	Perfil de virulência
16I	Pombo-doméstico	O153:H51	A	B1	<i>iss+ iroN+ ompT+ hlyF+ sitA+ traT+ tsh+ fimH+</i>
16T	Pombo-doméstico	ONT:HNT	I	B2	<i>iss+ iroN+ ompT+ hlyF+ sitA+ traT+</i>
17I	Pombo-doméstico	ONT:H51	I	B1	<i>iroN+ sitA+ traT+ irp2+ fyuA+</i>
17C	Pombo-doméstico	O54:H5	B	B2	<i>iss+ sitA+ irp2+ fyuA+</i>
17T	Pombo-doméstico	O153:H51	I	B1	<i>iss+ iroN+ ompT+ sitA+ traT+</i>
18C	Pombo-doméstico	ONT:HNT	A	B1	<i>iss+ iroN+ ompT+ iutA+ hlyF+ cvaC+ iucC+ sitA+ iucD+ irp2+ fyuA+</i>
18T	Pombo-doméstico	ONT:H51	A	B1	<i>iss+ iroN+ ompT+ hlyF+ sitA+ traT+</i>
19C	Pombo-doméstico	O97: HNT	NV	B2	<i>iroN+ sitA+ irp2+ fyuA+</i>
19T	Pombo-doméstico	ONT:H9	NV	A	<i>iss+ iroN+ ompT+ hlyF+ sitA+ traT+</i>
20T	Pombo-doméstico	ONT:H51	B	B1	<i>iss+ iroN+ ompT+ hlyF+ sitA+ traT+</i>
21C	Pombo-doméstico	O153:H51	B	B1	<i>iss+ iroN+ ompT+ sitA+ traT+</i>

Pombos-domésticos de vida livre

Isolados	Nome Popular	Sorotipo	Virulência	Filogenia	Perfil de virulência
22C1	Pombo-doméstico	O7:H40	A	A	<i>iss+ iroN+ ompT+ hlyF+ sitA+ traT+ tsh+</i>
22C2	Pombo-doméstico	O106:HNT	B	D	<i>iss+</i>
23C	Pombo-doméstico	O166:H15	NV	D	<i>iss+ fimH+</i>
24C	Pombo-doméstico	O100:H40	A	A	<i>iss+ iroN+ ompT+ sitA+</i>
25C	Pombo-doméstico	O51:HNT	NV	D	<i>iss+ traT+ fimH+</i>

26C	Pombo-doméstico	O83:H6	B	B2	<i>iss+ sitA+ traT+ tsh+ irp2+ fyuA+</i>
27C	Pombo-doméstico	O166:H15	NV	D	<i>iss+</i>
28C	Pombo-doméstico	O68:H45	NV	D	<i>iss + traT+ fimH+</i>
29C	Pombo-doméstico	O68:HNT	NV	D	<i>iss+ sitA+ traT+</i>
30C	Pombo-doméstico	O78:H34	B	D	<i>iss+</i>
31C	Pombo-doméstico	O11:HNT	NV	A	<i>iss+ iroN+ ompT+ hlyF+ sitA+</i>
32C	Pombo-doméstico	ONT:H40	NV	A	<i>iss+ iroN+ ompT+ iutA+ iucC+ sitA+ traT+</i>
33T	Pombo-doméstico	O83:H6	I	B2	<i>iss+ iutA+ hlyF+ sitA+ traT+ tsh+ fimH+ irp2+ fyuA+</i>
34C	Pombo-doméstico	O73:H45	B	D	<i>iss+</i>
35C	Pombo-doméstico	O68:H45	I	D	<i>iss+</i>
36C	Pombo-doméstico	O166:HNT	NV	D	<i>iss+</i>
37C	Pombo-doméstico	O166:H6	B	D	<i>iss+</i>
38C	Pombo-doméstico	O83:HNT	I	B2	<i>iss+ sitA+ traT+ tsh+ irp2+ fyuA+</i>
39C	Pombo-doméstico	ONT:H8	NV	B2	<i>iss+ sitA+ traT+ irp2+ fyuA+</i>

* C – cloaca, T – orofaringe, F – fígado, I – intestino, NT – não tipável, A – alta, B – baixa, I – intermediária, NV – não virulenta.

5.5. Isolados de *Escherichia coli* foram heterogêneos no PFGE

Dentre as 49 estirpes isoladas, três não foram tipáveis utilizando-se a enzima *Xba*I. As 46 estirpes geraram 42 perfis diferentes de PFGE, também chamados de pulsotipos. Apenas três pulsotipos foram compartilhados por mais de um isolado, sendo eles 35C, 36C e 37C, 14F e 14I e 16I e 17I. Todos os outros isolados foram agrupados em pulsotipos únicos, demonstrando um grau elevado de heterogeneidade entre as *E. coli* das aves examinadas. O dendrograma gerado por PFGE apresentou sete “clusters” e é mostrado na Figura 4.

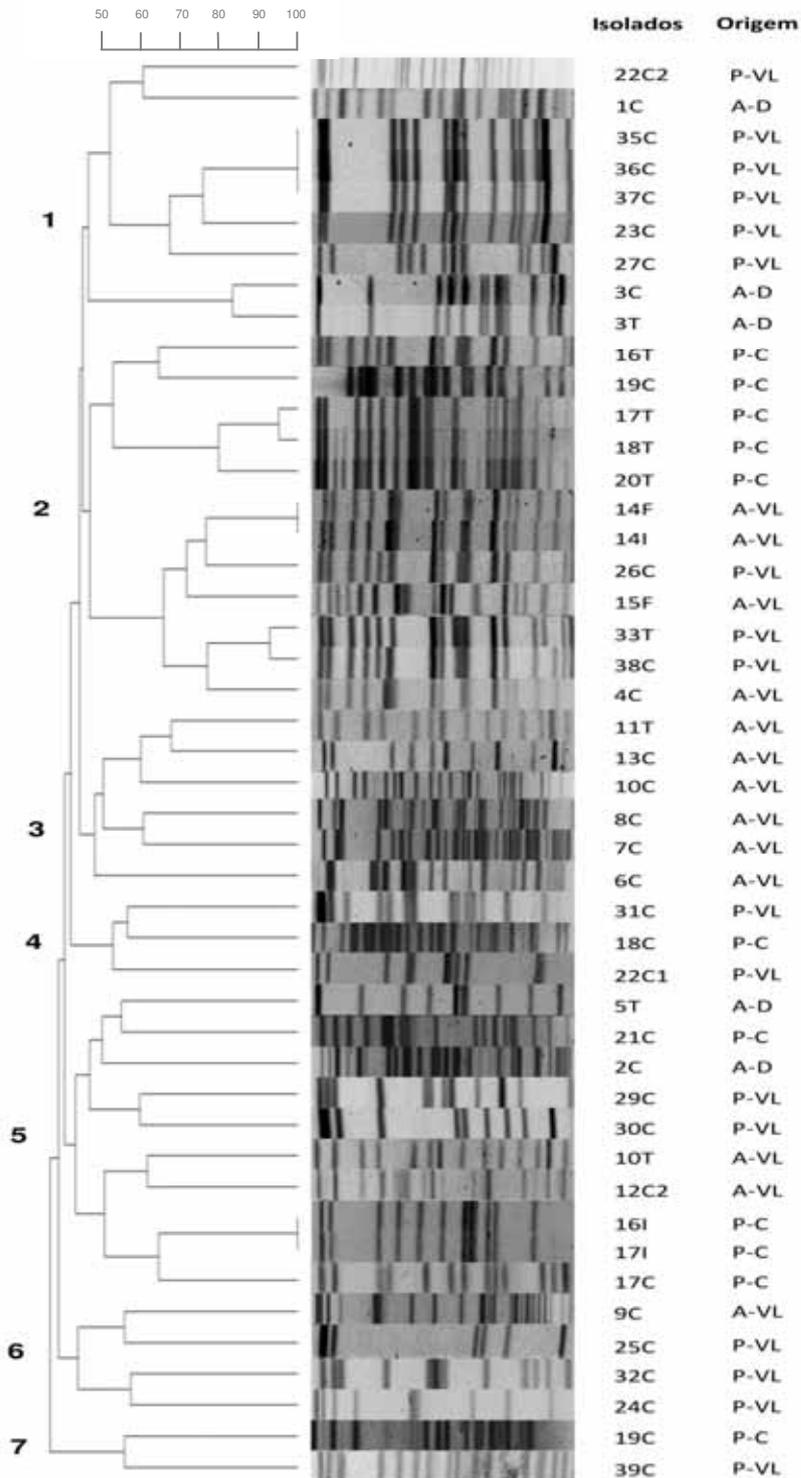


Figura 4. Dendrograma mostrando relação de similaridade estabelecida por PFGE. C – Cloaca, T – Orofaringe, F – fígado, I – intestino, P-VL – pombo de vida livre, P-C – pombo de cativeiro, A-VL – ave selvagem de vida livre, A-D – ave selvagem domiciliada.

5.6. Suscetibilidade aos antimicrobianos

Todos os isolados de *E. coli* foram testados quanto à suscetibilidade a diferentes agentes antimicrobianos de importância humana e veterinária, usando o método de difusão em disco (CLSI, 2009). Resistência a múltiplos antimicrobianos (três ou mais classes de antimicrobianos) foi encontrada em 75,0% dos isolados de aves selvagens domiciliadas, em 53,3% dos isolados de aves selvagens de vida livre, em 100,0% dos isolados de pombos-domésticos de cativeiro e em 26,3% dos isolados de pombos-domésticos de vida livre. O número e a porcentagem de isolados resistentes aos 17 antimicrobianos utilizados no teste de suscetibilidade, de acordo com o grupo de aves, podem ser vistos na Tabela 6.

Tabela 6. Número e porcentagem de resistência dos 49 isolados frente a 17 antimicrobianos utilizados no teste de suscetibilidade, de acordo com o grupo de aves.

Antimicrobianos	Origem dos Isolados							
	Aves selvagens de vida livre ^a (n=15)		Aves selvagens domiciliadas ^b (n=4)		Pombos de vida livre ^c (n=19)		Pombos de cativeiro (n=11)	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Ácido nalidíxico	7	46,6	3	75,0	0	0	11	100,0
Amicacina	4	26,6	1	25,0	12	63,1	5	45,4
Amoxicilina+ácido clavulânico	2	13,3	1	25,0	0	0	4	36,4
Ampicilina	4	26,6	0	0	2	10,5	5	45,4
Cefalotina	8	53,3	3	75,0	9	47,4	7	63,6
Cefoxitina	3	20	1	25,0	0	0	4	36,4
Ceftiofur	0	0	0	0	2	10,5	2	18,2
Ceftriaxona	1	6,6	1	25,0	0	0	4	36,4
Ciprofloxacina	4	26,6	2	50,0	0	0	9	81,8

Cloranfenicol	0	0	1	25,0	1	5,3	1	9,1
Estreptomicina	13	86,6	4	100,0	10	52,6	8	72,7
Gentamicina	2	13,3	2	50,0	1	5,3	3	27,3
Canamicina	6	40,0	1	25,0	5	26,3	2	18,2
Nitrofurantoína	4	26,6	1	25,0	2	10,5	5	45,4
Norfloxacina	2	13,3	2	50,0	0	0	9	81,8
Sulfametoxazol+ Trimetoprim	5	33,3	2	50,0	3	15,8	3	27,3
Tetraciclina	7	46,6	3	75,0	3	15,8	10	90,9

^a Todos os isolados de aves selvagens de vida livre foram sensíveis ao ceftiofur e cloranfenicol;

^b Todos os isolados de aves selvagens domiciliadas foram sensíveis a ampicilina e ceftiofur;

^c Todos os isolados de pombos-domésticos de vida livre foram sensíveis ao ácido nalidíxico, amoxicilina + ácido clavulânico, cefoxitina, ceftriaxona, ciprofloxacina e norfloxacina.

6. DISCUSSÃO

Aves selvagens podem ser portadoras de patógenos zoonóticos, e serem disseminadoras de doenças, sem necessariamente apresentarem qualquer sinal clínico (ACHA; SZYFRES, 2003). Além disso, essas aves podem estar infestadas por vetores artrópodes, que facilitam a disseminação e dispersão de patógenos, principalmente tratando-se de aves migratórias, situações que podem mostrar-se de grande importância para a saúde pública, para a conservação da vida silvestre e em aspectos econômicos (CLEAVELAND et al., 2001; REED et al., 2003).

O pombo-doméstico (*Columba livia*) é uma das aves mais conhecidas por sua proximidade com o ser humano, como as cidades oferecem abrigo e alimentação em abundância, a população de pombos é cada vez maior e diversos são os problemas associados à proliferação dessas aves (NUNES, 2003). Uma das preocupações relacionadas aos Columbiformes é o seu potencial em disseminar patógenos tanto para outros animais como para seres humanos, pois estudos relataram que eles podem ser reservatórios de pelo menos 70 diferentes microrganismos patogênicos (HAAG-WACKERNAGEL; MOCH, 2004).

Existem poucos estudos epidemiológicos sobre zoonoses bacterianas, especificamente a *E. coli*, envolvendo estas aves. Entre março de 2011 e março de 2012, foi investigada a prevalência de bactérias da família *Enterobacteriaceae* em amostras cloacais de aves passeriformes e psitacídeos que foram apreendidas no comércio ilegal no Rio de Janeiro. Dentre as bactérias mais frequentemente isoladas estavam *Escherichia coli*, seguida de *Enterobacter* spp e outras enterobactérias (MATIAS, 2014). *Escherichia coli* tem sido isolada de amostras de fezes de aves marinhas como gaivotas, também de patos selvagens e urubus (REED et al., 2003; EWERS et al., 2009b; RADHOJANI et al., 2012). Em um estudo realizado em Juiz de Fora - MG, entre maio de 2007 e maio de 2008, foi relatado que 12,1% das amostras de fezes de pombos-domésticos continham *E. coli* patogênica (SILVA et al., 2009) e na Alemanha, outro estudo demonstrou que pombos podem ser reservatórios de *E. coli* associada a doença em humanos (SONNTAGET et al., 2004).

Alguns dos isolados encontrados nesse trabalho apresentaram características típicas de ExPEC humana e animal, sendo capazes de causar aerossaculite, peritonite e perihepatite em pintainhos de um dia.

Os perfis de virulência encontrados nos isolados virulentos e não virulentos das aves selvagens e dos pombos-domésticos incluem os genes que codificam ColV (*cvaC*), salmochelin (*iroN*), proteína de resistência sérica (*iss*), aerobactina (*iucC*), receptor férrico de aerobactina (*iutA*), operon *sit* (*sitA*), transferência de proteína (*traT*) e hemaglutinina temperatura sensível (*tsh*), que são conhecidos por sua localização frequente ou exclusivas em grandes plasmídios R transmissíveis, como pTJ100 em APEC (JOHNSON; RUSSO, 2002a; JOHNSON et al., 2006). Esses genes foram claramente associados com linhagens de APEC no trabalho de ZHAO et al. (2009). Além desses genes, outros como *ompT* e *hlyF* também foram os mais associados a estirpes de APEC com alta virulência por Johnson et al. (2008).

Os genes *iucD*, *fimH*, *fyuA* e *irp2* também foram detectados nos isolados deste trabalho, o mesmo foi relatado em estudos realizados com amostras orofaríngeas de fragatas do litoral paulista (SAVIOLLI, 2010), em amostras do trato respiratório de aves selvagens aparentemente saudáveis (IKUNO et al., 2008), em amostras cloacais e de órgãos de psitacídeos com enterite e septicemia (PRIOSTE et al., 2013). Contudo, todos esses genes de virulência também foram regularmente detectados em AFEC ("Avian fecal *E. coli*"), que são estirpes isoladas de fezes de aves saudáveis (RODRIGUEZ-SIEK et al., 2005a; EWERS et al., 2009a).

A frequência de isolados positivos para o gene *iss* nos isolados das aves selvagens (94,7%) e dos pombos-domésticos (93,3%), foi maior que aquela observada em estudos com amostras do trato respiratório de aves selvagens na cidade de São Paulo e com amostras de fezes e órgãos de aves selvagens com enterite e septicemia (26,6% e 29,0%, respectivamente) (IKUNO et al., 2008; KNÖBL et al., 2011). No entanto, porcentagem similar foi encontrada em isolados de APEC provenientes de frangos e perus (RODRIGUEZ-SIEK et al., 2005a). A resistência ao soro pela *E. coli* está bem descrita e tem sido relacionada à patogênese; é conferida por um conjunto de fatores, combinando efeitos do LPS (lipopolissacarídeo), produção de aerobactina, cápsula, antígeno O e proteínas de membrana (WOOLEY et al., 1998; LA RAGIONE; WOODWARD, 2002). Esses

fatores auxiliam na permanência da bactéria no hospedeiro, impedindo que ela seja destruída pelos sistemas de defesa, embora esse processo ainda não esteja completamente elucidado (BARBIERI, 2010).

No presente estudo, o gene *traT* estava presente em 63,1% dos isolados das aves selvagens e em 53,3% dos isolados dos pombos-domésticos, estando de acordo com a prevalência de 65,0% em isolados de patos selvagens (EWERS et al., 2009b). Rodriguez-Siek et al. (2005b) encontraram esse gene em 78,0% dos isolados de APEC e destacaram que o gene *traT* estava associado com o gene *cvaC* nas estirpes de APEC. Ambos os genes fazem parte do mecanismo de resistência a efeitos bactericidas do soro, e normalmente estão associados a aves com quadros de septicemia. Mais especificamente, o gene *cvaC* está relacionado à produção de colicinas, e está inserido em plasmídios conhecidos como Col fatores (ColV). A colicina V é encontrada principalmente em estirpes virulentas extraintestinais, causando doenças em humanos e animais (LIOR, 1994). No entanto, apenas 5,3% dos isolados de aves selvagens e 3,3% dos isolados de pombos-domésticos continham o gene *cvaC*.

E. coli com propriedades invasivas apresentam sistemas especializados e com elevada afinidade para aquisição de ferro, denominados sideróforos, os quais possibilitam a multiplicação bacteriana em ambientes com baixa concentração deste metal (DHO-MOULIN; FAIRBROTHER, 1999). Vários genes relacionados à aquisição de ferro como *fyuA*, *irp2*, *iucC*, *iucD*, *iutA*, *iroN* e *sitA* foram detectados nesse trabalho. O segundo gene mais prevalente dentre os isolados foi o *sitA*, encontrado em 84,2% dos isolados das aves selvagens e em 66,7% dos isolados dos pombos-domésticos, resultados semelhantes ao encontrado em isolados de APEC (86,4%) e AFEC (42,7%) provenientes de frangos e perus (RODRIGUEZ-SIEK et al., 2005a).

O gene *iroN* estava presente em 42,0% e 46,7% dos isolados de aves selvagens e pombos-domésticos, respectivamente, enquanto *fyuA* e *irp2* foram detectados conjuntamente, sendo 47,4% em aves selvagens e 26,7% em pombos-domésticos. Um estudo realizado na Alemanha com patos selvagens relatou resultado compatível com os dados desse trabalho, onde os genes *fyuA* e *irp2* foram positivos em 53,3% e 51,6% dos isolados, respectivamente, porém o gene *iroN* foi

menos prevalente encontrado em apenas 11,0% dos isolados (EWERS et al., 2009b).

Diversos estudos relatam que um número elevado de estirpes de APEC possuem e expressam o sistema aerobactina-aquisição de ferro (*iut*), enquanto que nas estirpes não patogênicas a frequência do gene codificador da aerobactina é menor (DHOMOULIN; FAIRBROTHER, 1999). Esse fato está de acordo com os dados desse trabalho, pois o gene *iutA* foi detectado em dois (10,5%) isolados das aves selvagens e em três (10,0%) isolados dos pombos-domésticos que apresentaram virulência no teste *in vivo*, com exceção de um isolado que foi não virulento. Os genes *iucC* e *iucD*, que estão localizados no mesmo operon, foram menos prevalentes, sendo que ambos foram detectados em 5,3% dos isolados de aves selvagens e em 3,3% e 6,7% dos isolados de aves selvagens e dos pombos-domésticos, respectivamente. SAVIOLLI (2010) relatou num trabalho realizado com fragatas saudáveis do litoral paulista a detecção de *iucD* em 13,1% dos isolados.

O gene *tsh*, que codifica um produto importante nos primeiros estágios da infecção, pode auxiliar no processo de adesão de *E. coli* no presente estudo. O *tsh* foi detectado em 5,3% dos isolados das aves selvagens e em 16,7% nos isolados dos pombos-domésticos, resultado semelhante ao das aves selvagens foi encontrado em ararajubas saudáveis, que apresentaram 8,7% dos isolados de *E. coli* positivos para *tsh* (PRIOSTE et al., 2013). Apesar da baixa frequência, nenhum isolado não virulento foi positivo para esse gene, que é frequentemente encontrado em isolados patogênicos e raramente encontrado em comensais (DELICATO et al., 2003). O gene *ompT* também possui um papel importante nas infecções extraintestinais, pois ele codifica a protease OmpT, que cliva as colicinas A, E1, E2, E3, além disso, há evidências de que esse gene possa contribuir para a invasão de células endoteliais humanas (HUANG et al., 2001). No presente trabalho, *ompT* esteve positivo em 47,4% dos isolados das aves selvagens e em 40,0% dos isolados dos pombos-domésticos, frequência mais baixa que a observada por Rodriguez-Siek et al. (2005a), que detectou esse mesmo gene em 70,5% dos isolados de APEC.

No presente estudo, o gene *fimH* foi detectado em 5,3% dos isolados das aves selvagens e em 16,7% dos isolados de pombos-domésticos. Embora tenha sido relatado o importante papel desta fímbria na colonização inicial da traqueia das

aves, facilitando posteriormente a manifestação de outros fatores de virulência (POURBAKHSI et al., 1997), esse gene tem sido encontrado com a mesma frequência em isolados de aves saudáveis e de aves doentes (RODRIGUEZ-SIEK et al., 2005b; MOULIN-SCHOULEUR et al., 2006).

O gene *hlyF* que codifica a hemolisina putativa aviária, foi detectado quase na mesma frequência em isolados de APEC (78,2%) e de AFEC (86,5%) de frangos nos Estados Unidos (JOHNSON et al., 2008), frequência mais alta que a observada nos isolados desse trabalho, que foi de 42,2% em aves selvagens e 30,0% em pombos-domésticos. Apesar de possuir ação hemolítica, a função de *hlyF* na patogênese da colibacilose permanece desconhecida (JOHNSON et al., 2008).

Assim como neste trabalho, KNÖBL et al. (2011) não obtiveram positividade para os genes *sfa*, relacionado à adesão, e *cnf1*, que codifica uma toxina, em *E. coli* isoladas de psitacídeos com colibacilose. A presença desses genes parece ser mais comum em isolados de ExPEC humana do que de APEC (RODRIGUEZ-SIEK et al., 2005b; KNÖBL et al., 2012). Corroborando com o presente estudo, Prioste et al. (2013) pesquisando *E. coli* em ararajubas saudáveis, não obtiveram isolados positivos para o gene *papC*, codificador de fímbrias tipo P, comumente encontrado em estirpes de UPEC, no entanto também é encontrado em estirpes de origem aviária, onde está relacionado à colonização de órgãos internos de aves doentes (MELLATA et al., 2003).

O gene *papG* também codifica fímbrias tipo P, sendo o alelo *papGII* o mais predominante em estirpes aviárias, seguido por *papGIII* e *papGI* (VANDEMAELE et al., 2003). No entanto, nenhum desses alelos foi encontrado nos isolados do presente estudo. Resultado semelhante foi relatado por Rodriguez-Siek et al. (2005a), que não encontrou nenhum isolado de APEC e AFEC provenientes de frangos e perus positivos para *papGI*, nenhum isolado de AFEC positivo para *papGIII* e obteve baixa frequência desse gene em isolados de APEC (0,7%). Porém, *papGII* foi positivo em 40,6% e 11,5% dos isolados de APEC e AFEC respectivamente, o que está de acordo com o relatado por Vandemaele et al. (2003).

Embora alguns genes sejam mais frequentes em isolados de APEC, EWERS et al. (2009a) relataram que um considerável número de isolados de aves saudáveis foram indistinguíveis dos isolados de surtos de colibacilose, por conterem várias

associações de genes diretamente ligados a infecções extraintestinais em aves, concordando com os resultados encontrados nesse trabalho, onde muitos isolados apresentaram perfil de virulência similar àqueles observados em APEC e outras ExPEC oriundas de humano e animal (RODRIGUEZ-SIEK et al., 2005b; EWERS et al., 2007). Além disso, esses isolados não são provenientes de aves com colibacilose, sugerindo que esses genes podem não ser úteis como marcadores para o patótipo APEC ou que o intestino de aves selvagens e pombos-domésticos poderia servir como reservatório para *E. coli* causadora de infecções extraintestinais (VANDEKERCHOVE et al., 2005).

As 49 estirpes encontradas no presente trabalho apresentaram genes de virulência, devendo ser consideradas como uma parte da microbiota intestinal que constitui um grupo de agentes infecciosos que podem frequentemente ser disseminados para o meio ambiente (EWERS et al., 2009b). Além disso, com exceção das estirpes 8C, 12C2, 36C e 39C, todas causaram lesões extraintestinais macroscópicas como aerossaculite, perihepatite e peritonite nas aves inoculadas no teste *in vivo*, incluindo as estirpes que não causaram mortalidade no teste, sendo assim consideradas ExPEC, isso ressalta a importância das aves selvagens e dos pombos-domésticos como portadores desse patógeno.

Apesar da maioria dos isolados ter apresentado vários genes de virulência, nove tiveram apenas um gene, o *iss*, sendo que oito desses isolados foram provenientes dos pombos-domésticos de vida livre e um proveniente de uma rolinha, também da família dos Columbiformes. Seis desses isolados apresentaram virulência no teste de patogenicidade, sugerindo que o gene *iss* possua um papel importante na patogênese da doença.

As associações de genes de virulência encontradas nesse trabalho também foram detectadas em ExPEC humanas (RODRIGUES-SIEK et al., 2005b; EWERS et al., 2007) e alguns autores demonstraram que amostras de *E. coli* de origem aviária e de infecções extraintestinais humanas, como infecção urinária, meningite neonatal e septicemia, apresentaram perfis de virulência muito próximos, não podendo ser distinguidas filogeneticamente e nem em ensaios experimentais *in vivo*. As estirpes humanas podem causar infecção em aves, assim como estirpes de origem aviária podem causar infecções em modelos experimentais de mamíferos, indicando que

aves selvagens e pombos-domésticos albergam patógenos com potencial zoonótico, que podem transferir genes de virulência para outras estirpes de ExPEC (EWERS et al., 2007; MOULIN-SCHOULER et al., 2007).

A microbiota intestinal de psitacídeos saudáveis é composta principalmente ou exclusivamente por bactérias Gram-positivas, por isso, foi sugerido que a presença de bactérias Gram-negativas no intestino dessas aves deva ser considerada como contaminação ambiental ou indicação de doença (HOEFER, 1997). Existe uma controvérsia sobre a importância de se isolar as bactérias Gram-negativas, em particular a *E. coli*, das fezes desses animais, pois as frequências de *E. coli* nas fezes de aves saudáveis variam entre as diversas espécies de psitacídeos, porém a maior incidência de *E. coli* foi observada em amostras de aves doentes ou em tecido intestinal de aves mortas (DORRESTEIN et al., 1985; MARIETTO-GONCALVES et al., 2010).

Dos isolados de aves selvagens do presente estudo, 47,4% foram provenientes de psitacídeos e representaram 66,7% dos isolados de alta virulência das aves selvagens, indicando que essas aves podem ser fonte de infecção de *E. coli* patogênica, sendo um risco para humanos e outros animais, principalmente porque os psitacídeos são consideradas as aves mais comumente mantidas em cativeiro no mundo todo (LIGHTFOOT; NACEWICZ, 2009). É provável que os psitacídeos analisados tenham se infectado com *E. coli* através da alimentação humana, mostrando que há uma troca de patógenos entre seres humanos e aves selvagens.

Além de possuírem associações de genes de virulência, muitos isolados apresentaram multirresistência aos antimicrobianos testados. Neste trabalho, 53,3% dos isolados das aves selvagens de vida livre e 75,0% dos isolados de aves selvagens domiciliadas apresentaram multirresistência aos antimicrobianos, resultado diferente do encontrado em *E. coli* provenientes da cloaca de várias espécies de aves selvagens (HASAN et al., 2012; CAMARDA et al., 2006; GUENTHER et al., 2010), as quais não apresentaram multirresistência aos antimicrobianos. Dentre os isolados de aves selvagens, a maior resistência foi observada para estreptomicina, cefalotina, ácido nalidíxico e tetraciclina. O trabalho realizado por Radhouani et al. (2012) em fezes de urubu obteve porcentagem

semelhante ao do presente estudo em relação à resistência dos isolados a estreptomicina e tetraciclina, enquanto um trabalho realizado com várias espécies de aves selvagens na Alemanha obteve isolados resistentes a cefalotina (GUENTER et al., 2010).

As três estirpes multirresistentes das aves selvagens domiciliadas (1C, 2C, 3T) foram isoladas da cloaca e da orofaringe, sendo que uma das estirpes apresentou seis genes de virulência e resistência a 12 antimicrobianos, enquanto os outros dois isolados apresentaram quatro e seis genes de virulência, sendo resistentes a sete antimicrobianos, ressaltando que esses genes foram previamente detectados em doenças extraintestinais humanas e que os isolados apresentaram virulência no teste *in vivo*. Em cativeiro é provável que aves selvagens já tenham recebido antimicrobianos para tratar infecções, somando-se a isso existe a presença de outros animais como roedores, insetos, outras espécies de aves e animais domésticos e, portanto, existe a possibilidade de transmissão de *E. coli* multirresistente (SAIDENBERG, 2008). Esses dados mostram a importância da educação sobre o contato adequado entre os proprietários e os animais selvagens domiciliados, levando em consideração que há possibilidade da transmissão direta de patógenos potencialmente zoonóticos através das fezes e secreção oronasal, principalmente porque existe o hábito das aves pegarem comida na boca dos donos.

De acordo com Corrêa e Passos (2001), além do risco dentro do próprio domicílio, os animais selvagens ao serem encaminhados às clínicas veterinárias, zoológicos e centros de triagem, também expõem os profissionais e tratadores a um risco contágio. O aumento de animais selvagens como animais de companhia tem preocupado órgãos ambientais e setores de saúde pública. Espécies animais exóticas possuem patógenos pouco estudados que podem promover a chamada poluição patogênica, ocasionando surtos de enfermidades zoonóticas em humanos (SCHLOEGEL et al., 2005). Além disso, pode-se deduzir que se o animal domiciliado é infectado com agentes patogênicos, outros animais da mesma espécie, mesmo no ambiente natural, podem se infectar e transmitir o agente no ambiente.

Os isolados das aves selvagens de vida livre também apresentaram multirresistência aos antimicrobianos e associações de genes de virulência, sendo

que alguns desses isolados chegaram a apresentar resistência variando de sete a 13 antimicrobianos. Além disso, 40% dos isolados dessas aves foram altamente virulentos no teste *in vivo*. O hábito alimentar parece ser o principal fator que influencia a exposição dessas aves às enterobactérias. No caso de aves de rapina e daquelas que se alimentam de carcaça em decomposição, como o carcará e o falcão-quiriquiri, há uma maior exposição a bactérias entéricas e a outros patógenos presentes no intestino de suas presas. Enquanto que as espécies que forrageiam no solo podem ingerir alimento contaminado de várias formas pela via fecal-oral (BENSKIN et al., 2009). Além disso, a expansão de áreas urbanas e da agropecuária, que leva ao desmatamento e à perda de habitat de espécies selvagens, aumenta o contato desses animais com ambientes contaminados com resíduos humanos, como a água, podendo ocorrer a introdução e transferência de bactérias resistentes a drogas para outros animais do meio selvagem (DASZAK, 2000).

Em relação aos pombos-domésticos de cativeiro, 100,0% dos isolados foram multirresistentes, com mais da metade mostrando resistência variando de oito a quinze antimicrobianos. Essa taxa de multirresistência foi mais alta que a relatada por um estudo realizado em Bangladesh, também com *E. coli* provenientes de fezes de pombos-domésticos de cativeiro, onde 61,0% das estirpes foram multirresistentes (HASAN et al., 2014). O isolado 18C do presente trabalho é de grande importância para a saúde pública, pois além de ter apresentado o maior número de genes de virulência e de ter sido resistente à maior quantidade de antimicrobianos, se mostrou altamente virulento no teste *in vivo*. O maior índice de resistência foi observado para o ácido nalidíxico, em 100,0% dos isolados, seguido da tetraciclina, com 90,0%, da ciprofloxacina e norfloxacina, ambas com 82,0%. Níveis de resistências mais baixos foram encontrados em um estudo realizado em Bangladesh com fezes de pombos-domésticos de cativeiro, onde 69,0% dos isolados de *E. coli* foram resistentes a tetraciclina, 47,0% ao ácido nalidíxico, 38,0% a ampicilina, cloranfenicol e sulfametoxazol+trimetoprim e 27,0% à ciprofloxacina (HASAN et al., 2014).

Os pombos-domésticos de cativeiro, assim como algumas aves selvagens estudadas nesse trabalho, mantêm contato constante com humanos, e provavelmente já receberam antimicrobianos como tratamento ou prevenção de

doenças. A alta taxa de isolados multirresistentes pode ser um reflexo do uso abusivo desses medicamentos na sociedade e mostra o perigo que essas aves representam para a saúde pública. Segundo Collignon et al. (2009), o uso intensivo das fluoroquinolonas no tratamento de infecções em humanos e animais tem levado à disseminação da resistência bacteriana, além disso, Gordon e Cowling (2003) estudando prevalência de *E. coli* em vertebrados na Austrália, comprovaram que aves que mantêm contato ou vivem próximas aos locais habitados por humanos têm maior possibilidade de albergar *E. coli* do que aves que vivem afastadas deste tipo de instalações. Esses dados enfatizam a importância do contato correto entre esses animais com o ser humano

Os pombos-domésticos de vida livre foram as aves que apresentaram o menor número de isolados multirresistentes (26,3%), apresentando resistência variando de três a seis antimicrobianos. A amicacina foi o antimicrobiano mais prevalente com 63,0% dos isolados positivos, seguido da estreptomicina com 52,6% e cefalotina com 47,4%, sendo que todos os isolados foram sensíveis ao ácido nalidíxico, ciprofloxacina, norfloxacin, cefoxitina, ceftriaxona e amoxicilina+ácido clavulânico. Não há muitos relatos científicos para comparação, mas em um estudo realizado com fezes frescas de pombos-domésticos de vida livre foi isolada *E. coli* com resistência à amicacina (36,8%), ampicilina (7,8%) e sulfametoxazol+trimetoprim (3,9%), sendo todos os isolados suscetíveis à ceftriaxona assim como o relatado nesse trabalho (SILVA et al., 2009).

Os pombos de vida livre do presente estudo têm como moradia um galpão do setor de gado leiteiro na UNESP - Jaboticabal. Apesar dessas aves não terem contato muito próximo com humanos, como os pombos que habitam praças e igrejas, elas coletam seus alimentos em diferentes fontes, como áreas de uso doméstico, campos e instalações agrícolas com bovinos, como as do presente trabalho, podendo haver transferência de patógenos altamente virulentos e multirresistentes entre esses animais. O fato dos pombos de vida livre se alimentarem no chão e pousarem em locais elevados requer um deslocamento constante do ponto de pouso até a região mais inferior e para isso precisam bater suas asas, o que aumenta e favorece a suspensão de partículas secas, contendo pó, fezes ressecadas destas aves e, porventura, agentes patogênicos, podendo

haver transmissão desses patógenos de forma indireta, através da inalação das excretas contaminadas (SCHULLER, 2003).

Os dados indicam que tanto as espécies sinantrópicas, quanto as espécies que vivem em áreas mais rurais e aves de rapina parecem desempenhar um papel como portadoras de *E. coli* altamente virulentas e multirresistentes a antimicrobianos. Aparentemente, *E. coli* oriundas de fontes humanas e animais podem dispersar-se no ambiente, e através de alimentos contaminados, podem entrar e colonizar o trato intestinal das aves (LITERAK et al., 2007). Consequentemente, essas aves podem transmitir agentes patogênicos por meio das fezes, contaminando fontes de água, grãos e sementes destinados ao consumo animal, além de alimentos destinados ao consumo humano (SIMPSON, 2002; COLE et al., 2005). Os resultados do presente trabalho são preocupantes tanto para o setor avícola quanto para a saúde pública, pois especula-se que ExPEC humana resistente a antimicrobianos teria se originado das aves, por meio do contato direto com esses animais e do consumo de produtos avícolas (MANGES; JOHNSON, 2012).

Considerando-se os grupos filogenéticos, a maior parte dos isolados das aves selvagens domiciliadas, das aves selvagens de vida livre e dos pombos-domésticos de cativeiro pertencem aos grupos B1 e B2. Esses resultados estão de acordo com Herzer et al. (1990), que propuseram que o grupo B1 seria composto por isolados patogênicos provenientes de animais e também com Clermont, Bonacorsi e Bingen (2000) que afirmam que no grupo B2 predominam os isolados que causam infecções extraintestinais. Em relação aos isolados dos pombos-domésticos de vida livre, mais da metade pertencem ao grupo filogenético D, e o restante aos grupos A e B2, sendo que 42,0% desses isolados foram não virulentos no teste in vivo. Esses resultados não concordam com Herzer et al. (1990), que afirmam que o grupo filogenético D alberga isolados virulentos. No entanto, resultados similares foram encontrados nos Estados Unidos em isolados de APEC de frangos e perus, onde a maior parte foi classificada com sendo pertencente aos grupos A e D (RODRIGUEZ-SIEK et al., 2005b).

Estudos que sugerem que os grupos clonais patogênicos são principalmente derivados do grupo filogenético B2, e, em menor medida, do grupo D, e que esses

grupos apresentam uma grande variedade de genes de virulência (PICARD et al., 1999; JOHNSON; RUSSO, 2005). No entanto, nesse trabalho os isolados do grupo B1 foram os que apresentaram a maior quantidade de genes de virulência, com 73,3% dos isolados albergando de seis a onze genes, enquanto apenas 20,0% os isolados do grupo B2 continham de seis a nove genes. Além disso, 61,5% dos isolados do grupo D apresentaram apenas um gene de virulência e 46,1% foram não virulentos no teste de patogenicidade. Porém, o isolado 9C do grupo D se destaca por conter o maior número de genes de virulência e ter sido classificado como altamente virulento no teste *in vivo*. Com base nesses resultados, pode-se inferir que não existe um grupo que compreenda exclusivamente isolados patogênicos animais, humanos ou comensais, mas que os grupos apresentam combinações desses isolados, justificando a hipótese de que estirpes contendo genes relacionados a APEC devam ser consideradas agentes zoonóticos em potencial.

Os sorogrupos O1, O2 e O78 são os mais associados com estirpes de APEC (DHO-MOULIN; FAIRBROTHER, 1999), no entanto, no presente trabalho foram encontrados isolados possuindo outros sorogrupos que causaram lesões nos pintinhos inoculados no teste de patogenicidade, indicando que há uma grande diversidade antigênica entre estirpes que possuem genes de virulência relacionados a APEC. Dos vinte sorogrupos identificados nos isolados desse estudo, quatro coincidem com sorogrupos encontrados em psitacídeos com enterite e septicemia (KNÖBL et al., 2011), dois com sorogrupos encontrados em isolados de *E. coli* shigatoxigênica (STEC) de pombos-domésticos na Itália (MORABITO et al., 2001), cinco com os encontrados em *E. coli* isoladas de pombos-domésticos na Índia (DUTTA et al., 2013), onze com sorogrupos de APEC e cinco com sorogrupos em comum entre APEC e ExPEC humana encontrados por Maluta et al. (2014). Esses dados indicam que a sorotipagem não é uma técnica particularmente útil na definição de APEC, devido à diversidade de sorotipos encontrados em isolados desse patótipo e à sobreposição de sorogrupos não só entre APEC e AFEC, mas também entre APEC e outras *E. coli* patogênicas extraintestinais e intestinais (EWERS et al., 2007; RODRIGUEZ-SIEK et al., 2005b).

Os sorogrupos O1 e O2 e os antígenos flagelares H5 e H7 foram identificados em isolados de aves selvagens de vida livre e de pombos-domésticos de cativeiro,

esse fato é de grande relevância, pois alguns estudos mostraram que grupos clonais de *E. coli* como O1:K1:H7, O18:K1:H7, O45:K1:H7, O2:K1:H7 e O16:H5 apresentaram potencial zoonótico e já foram implicados em várias doenças humanas, como infecção do trato urinário, meningite neonatal e septicemia, além de alguns clones apresentarem multirresistência a antimicrobianos (WEISSMAN et al., 2006; JOHNSON et al., 2007; MOULIN-SCHOULEUR et al., 2007; DAHBI et al., 2013; MORA et al., 2013). Além disso, 68,4% dos isolados das aves selvagens e 40,0% dos isolados de pombos-domésticos apresentaram sorogrupos que também já foram implicados com essas doenças humanas (e.g. O7, O11, O32, O75, O68, O75, O83, O153), sugerindo que há uma possível transferência entre as estirpes aviárias e humanas (RODRIGUEZ-SIEK et al., 2005b; EWERS et al., 2007).

Os resultados do PFGE demonstraram uma alta heterogeneidade entre os isolados, o que é semelhante ao relatado em outros estudos (HUSSEIN et al., 2013; KEMMETT et al., 2013). Em geral, os pulsotipos se agruparam de acordo com o grupo de aves a que pertenciam e também de acordo com os grupos filogenéticos, embora tenham existido exceções. Pulsotipos de isolados provenientes de diferentes pombos-domésticos de vida livre apresentaram altas similaridades (35C, 36C, 37C com 100% de similaridade; 33T e 38C com 93% de similaridade), ocorrendo o mesmo com pulsotipos de pombos-domésticos de cativeiro (16I e 17I com 100% de similaridade; 17T e 18T com 95% de similaridade), uma possível explicação seria o contato constante e próximo dessas aves que resulta em uma transmissão de certos clones frequentes.

É interessante notar que alguns pulsotipos com mais de 80,0% de similaridade, apresentaram em comum genes de virulência, grupo filogenético e sorotipo, porém distinta virulência no teste de patogenicidade, sugerindo que genes ainda não identificados possam estar envolvidos em doenças extraintestinais ou ainda, que a presença da sequência de DNA associada a um gene de virulência não significa que o mesmo está sendo expresso. Este fato mostra que há a necessidade de se investigar além da presença dos genes, a expressão dos mesmos. Também foram encontradas estirpes do mesmo animal, isoladas da cloaca e da orofaringe, apresentando mais de 80,0% de similaridade e perfil de virulência, sorotipo e virulência idênticos, indicando que a *E. coli* pode ter migrado do intestino para outros

sítios corpóreos, apoiando os achados de Kemmett et al. (2013), sobre o intestino das aves ser reservatório de ExPEC.

Os resultados do presente trabalho demonstraram que aves selvagens e pombos-domésticos, tanto de vida livre quanto de cativeiro, são reservatórios de ExPEC multirresistentes e altamente virulentas, representando um risco a saúde pública, principalmente por estas aves viverem em grande proximidade com os seres humanos e outros animais. Torna-se relevante ressaltar que animais portadores são uma importante fonte de infecção, já que a bactéria pode ser excretada juntamente com a fezes intermitentemente por meses ou anos. Portanto, estudos de *E. coli* em animais que possam servir como reservatórios e disseminadores desse patógeno, contribuem para a adoção de medidas profiláticas eficazes, como controle populacional dos pombos-domésticos, por meio da redução de alimentos disponíveis a essas aves, restrição de locais de nidificação e eliminação dos ovos em incubação nos ninhos.

7. CONCLUSÕES

- As estirpes de *Escherichia coli* isoladas de aves selvagens e pombos-domésticos apresentaram associações de genes de virulência previamente detectados em ExPEC humanas e animais, conferindo um potencial zoonótico;
- Através do ensaio de infecção experimental pôde-se constatar que tanto estirpes não virulentas quanto as de alta, intermediária e baixa virulências apresentaram associações de genes de virulência, sendo que duas estirpes que apresentaram a maior quantidade de genes de virulência foram altamente virulentas; algumas estirpes de baixa e intermediária virulências continham apenas o gene *iss*;
- A análise filogenética mostrou que a maioria dos isolados pertencia aos grupos B1 e B2, sendo estes também os grupos que continham a maior parte dos isolados de alta virulência e com maior número de genes de virulência, enquanto o grupo D continha a maioria dos isolados não virulentos;
- A análise de similaridade por PFGE mostrou alta heterogeneidade entre os isolados, mesmo entre os tipos de aves, indicando que existem poucos clones prevalentes nas *E. coli* dessas aves;
- Sorogrupos e antígenos flagelares encontrados no presente trabalho já foram implicados em doenças extraintestinais humanas e animais, sendo que muitos deles pertenciam a isolados altamente virulentos;
- Os pombos-domésticos de cativeiro e os pombos-domésticos de vida livre apresentaram o maior e o menor número de isolados multirresistentes, respectivamente. Estirpes não virulentas ou de baixa virulência apresentaram multirresistência. Nenhuma das estirpes apresentou sensibilidade a todos os antimicrobianos testados;

- Aves selvagens e pombos-domésticos podem ser colonizados por ExPEC altamente virulentas e multirresistentes.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHA, P. N.; SZYFRES, B. **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales**, 3ª ed., Washington: Organización Panamericana de la Salud, 2003. p. 989.

AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY (ASM). Antibiotic Resistance: an ecological perspective on an old problem. Washington (DC): **American Academy of Microbiology (US)**; 2009 Sep. 32p.

ANSARI, M. I.; MALIK, A. Genotoxicity of agricultural soils in the vicinity of industrial area. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 673, p. 124-132, 2009.

BARBIERI, N. L. Resistência a Antibióticos, Prevalência dos Fatores Associados à Virulência, Tipagem Filogenética e Perfil Filogenético de Isolados de *Escherichia coli* Patogênica Aviária (APEC). **Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular)** - Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Porto Alegre, 2010.

BENSKIN, C. M.; WILSON, K.; JONES, K.; HARTLEY, I. R. Bacterial pathogens in wild birds: a review of the frequency and effects of infection. **Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society**, v. 84, p. 349-73, 2009.

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

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

CAMARDA, A.; CIRCELLA, E.; PENNELLI, D.; MADIO, A.; BRUNI, G.; LAGRATA, V.; MARZANO, G.; MALLIA, E.; CAMPAGNARI, E. Wild Birds as biological indicators of environmental pollution: biotyping and antimicrobial resistance patterns of *Escherichia coli* isolated from Audouin's gulls (*Larus Audouinii*) living in the Bay of Gallipoli (Italy). **Italian Journal of Animal Science**, v. 5, p. 287-290, 2010.

CAMPOS, T. A.; STEHLING, E. G.; FERREIRA, A.; PESTANA DE CASTRO, A. F.; BROCCHI, M.; DIAS DA SILVEIRA, W. Adhesion properties, fimbrial expression and PCR detection of adhesin-related genes of avian *Escherichia coli* strains. **Veterinary Microbiology**, v. 106, p. 275-285, 2005.

CLEAVELAND, S.; LAURENSEN, M. K.; TAYLOR, L. H. Diseases of humans and their domestic mammals: pathogen characteristics, host range and the risk of emergence. **Philosophical Transactions of the Royal Society Biological Sciences**, London, v. 356, p. 991-999, 2001.

CLERMONT, O.; BONACORSI S.; BINGEN E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 4555-4558, 2000.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARD INSTITUTE. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. CLSI document MO2-A10**. Wayne: Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI), 2009. 179 p.

COLE, D.; DRUM, D. J. V.; STALLKNECHT, D. E.; WHITE, D. G.; LEE, M. D.; AYERS, S.; SOBSEY, M.; MAURER, J. J. Freelifving Canada geese and antimicrobial resistance. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, p. 935-938, 2005.

COLLIGNON, P.; POWERS, J. H.; CHILLER, T. M.; KIDARA-KANE, A.; AARESTRUP, F. M. . World Health Organization ranking of antimicrobials according to their importance in human medicine: a critical step for developing risk management strategies for the use of antimicrobials in food production animals. **Clinical Infectious Diseases**, v. 49, p.132-141, 2009.

CORRÊA, S. H. R.; PASSOS, E. C. Wild animals and public health. In: FOWLER, M. E.; CUBAS, Z. S. **Biology, medicine, and surgery of South American wild animals**. Ames: Iowa University Press, 2001. p. 493-499.

DAHBI, G.; MORA, A.; LÓPEZ, C.; ALONSO, M. P.; MAMANI, R.; MARZOA, J.; BLANCO, J. Emergence of new variants of ST131 clonal group among extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* producing extended-spectrum β -lactamases. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 42, p. 347-351, 2013.

DASZAK, P.; CUNNINGHAM, A. A.; HYATT, A. D. Emerging infectious diseases of wildlife – threats to biodiversity and human health. **Science**, v. 287, p. 443-449, 2000.

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

DHO-MOULIN, M.; FAIRBROTHER, J. M. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). **Veterinary Research**, v. 30, p. 299-316, 1999.

DORRESTEIN, G. M.; BUITELAAR, M. N.; VAN DER HAGE, M. H.; ZWART P. Evaluation of a bacteriological and mycological examination of psittacine birds. **Avian Diseases**, p. 951-962, 1985.

DUTTA, P.; BORAH, M. K.; SARMAH, R.; GANGIL, R. Isolation, histopathology and antibiogram of *Escherichia coli* from pigeons (*Columba livia*). **Veterinary World**, v. 6, p. 91-94, 2013.

EWERS, C.; ANTAO, E. M.; DIEHL, I.; PHILIPP, H. C.; WIELE, R. L. H. Intestine and Environment of the Chicken as Reservoirs for Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* Strains with Zoonotic Potential. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, p. 184-192, 2009a.

EWERS, C.; GUENTHER, S.; WIELER, L.H.; SCHIERACK, P. Mallard ducks – a waterfowl species with high risk of distributing *Escherichia coli* pathogenic for humans. **Environmental Microbiology Reports**, v. 1, p. 510–517, 2009b.

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

EWERS, C.; LI, G.; WILKING, H.; KIEßLING, S.; ALT, K.; ANTÁO, E. M.; LATURNUS, C.; DIEHL, I.; GLODDE, S.; HOMEIER, T.; BÖHNKE, U.; STEINRUCK, H.; PHILIPP, H. C.; WIELER, L. H. Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: how closely related are they? **International Journal of Medical Microbiology**, v. 297, p. 163-176, 2007.

FAROOQ, S.; HUSSAIN, I.; MIR, M. A.; BHAT, M. A.; WANI, S. A. Isolation of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* and Shiga toxin 1 and 2f-producing *Escherichia coli* from avian species in India. **Letters in applied microbiology**, v. 48, p. 692-697, 2009.

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

FOSTER, G.; EVANS, J.; KNIGHT, H. I.; SMITH, A. W.; GUNN, G. J.; ALLISON, L. J.; SYNGE, B. A.; PENNYCOTT, T. W.). Analysis of feces samples collected from a wild-bird garden feeding station in Scotland for the presence of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, p. 2265-2267, 2006.

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

GIUFRÈ, M.; GRAZIANI, C.; ACCOGLI, M.; LUZZI, I.; BUSANI, L.; CERQUETTI, M. *Escherichia coli* of human and avian origin: Detection of clonal groups associated with fluoroquinolone and multidrug resistance in Italy. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, p. 860-867, 2012.

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

GORDON, M. D.; COWLING, A. The distribution and genetic structure of *Escherichia coli* in Australian vertebrates: host and geographic effects. **Microbiology**, v. 149, p. 3575-3586, 2003.

GUENTHER, S.; GROBBEL, M.; LÜBKE-BECKER, A.; GOEDECKE, A.; FRIEDRICH, N. D.; WIELER, L. H.; EWERS, C. Antimicrobial resistance profiles of *Escherichia coli* from common European wild bird species. **Veterinary Microbiology**, v. 144, p. 219-225, 2010.

HAAG-WACKERNAGEL, D.; MOCH, H. Health hazards posed by feral pigeons. **Journal of Infection**, v. 48, p. 307-313, 2004.

HASAN, B.; ISLAM, K.; AHSAN, M.; HOSSAIN, Z.; RASHID, M.; TALUKDER, B.; ABUL KASHEM, M. Fecal carriage of multi-drug resistant and extended spectrum β -lactamases producing *E. coli* in household pigeons, Bangladesh. **Veterinary Microbiology**, v. 168, p. 221-224, 2014.

HASAN, B.; SANDEGREN, L.; MELHUS, Å.; DROBNI, M.; HERNANDEZ, J.; WALDENSTRÖM, J.; ALAM, M.; OLSEN, B. Antimicrobial Drug-Resistant *Escherichia coli* in Wild Birds and Free-range Poultry, Bangladesh. **Emerging Infectious Diseases**, v. 18, p. 2055, 2012.

HERDT, P.; DUCATELLE, R.; HAEREBROUCK, F.; DERRIESE, C. A.; GROOTE, B. D. E.; ROELS, S. An unusual outbreak of *Streptococcus bovis* septicemia in racing pigeons (*Columba livia*). **The Veterinary Record**, v. 134, p. 42-43, 1994.

HERZER, P. J.; INOUE, S.; INOUE, M.; WHITTAM, T. S. Phylogenetic distribution of branched RNA-linked multicopy single-stranded DNA among natural isolates of *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 172, p. 6175-6181, 1990.

HOEFER H. L. Diseases of the gastrointestinal tract. In: ALTMAN R. B.; CLUBB, S. L.; DORESTEIN, G. M.; QUESENBERY K. (Eds), **Avian Medicine and Surgery**. Saunders Company, Philadelphia, 1997. p. 419-453.

HUANG, S. H.; WAN, Z. S.; CHEN, H. M.; JONG, A. Y. OmpT contributing to *Escherichia coli* invasion of human endothelial cells. In: Program and abstracts of the 101st general meeting of the American Society for Microbiology (Orlando, FL). **Washington, DC: American Society for Microbiology**, 2001. p. 54.

HUSSEIN, A. H. M.; GHANEM, I. A. I.; EID, A. A. M.; ALI, M. A.; SHERWOOD, J. S.; L, G.; NOLAN, L. K.; LOGUE, C. M. Molecular and phenotypic characterization of *Escherichia coli* isolated from broiler chicken flocks in Egypt. **Avian Diseases**, v. 57, p. 602-611, 2013.

IKUNO, A. A.; GAMA N. M. S. Q.; GUASTALLI E. A. L.; GUIMARÃES, M. B.; FERREIRA V. C. A. Características de isolados de *Escherichia coli* provenientes de aves silvestres quanto a genes de virulência e resistência a antibióticos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 18., 2008, Gramado, **Anais**...Disponível em <http://www.sovergs.com.br/conbravet2008/anais/cd/resumos/R1269-1.pdf> Acesso: 25 mar. 2014.

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

JOHNSON, J. R.; OWENS, K. L.; CLABOTS, C.R.; WEISSMAN, S.J.; CANNON, S. B.. Phylogenetic relationships among clonal groups of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* as assessed by multi-locus sequence analysis. **Microbes and Infection**, v. 8, p. 1702-1713, 2006.

JOHNSON, J. R.; RUSSO, T. A. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: “the other bad *E. coli*”. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 139, p. 155-62, 2002a.

JOHNSON, J. R.; RUSSO, T. A. Molecular epidemiology of extraintestinal pathogenic (uropathogenic) *Escherichia coli*. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 295, p. 383-404, 2005.

JOHNSON, J. R.; RUSSO, T. A. Uropathogenic *Escherichia coli* as agents of diverse non-urinary tract extraintestinal infections. **Journal of Infectious Diseases**, v. 186, p. 859-864, 2002b.

JOHNSON, J. R.; STELL, A. L. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise, **The Journal of Infectious Diseases**, v. 181, p. 261-272, 2000.

JOHNSON, J. R.; STELL, A. L.; DELAVARI, P.; MURRAY, A. C.; KUSKOWSKI M. A.; GAASTRA, W. Phylogenetic and pathotypic similarities between *Escherichia coli* isolates from urinary tract infections in dogs and extraintestinal infection in humans. **Journal of Infectious Diseases**, v. 183, p. 897-906, 2001.

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

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

JOHNSON, T. J.; SIEK, K. E.; JOHNSON, S. J.; NOLAN, L. K. DNA sequence of a ColV plasmid and prevalence of selected plasmid-encoded virulence genes among avian *Escherichia coli* strains. **Journal of Bacteriology**, v. 188, p. 745-758, 2006.

JOHNSON, T. J.; WANNEMUEHLER, Y.; DOETKOTT, C.; JOHNSON, S. J.; ROSENBERGER, S. C.; NOLAN, L. K. Identification of minimal predictors of avian pathogenic *Escherichia coli* virulence for use as a rapid diagnostic tool. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, p. 3987-3996, 2008.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, p. 123-140, 2004.

KARIYAWASAM, S.; JOHNSON, T. J.; NOLAN, L. K. The pap operon of avian pathogenic *Escherichia coli* strain O1:K1 is located on a novel pathogenicity island. **Infection and Immunity**, v. 74, p. 744-749, 2006.

KEMMETT, K.; HUMPHREY, T.; RUSHTON, S.; CLOSE, A.; WIGLEY, P.; WILLIAMS, N. J. A longitudinal study simultaneously exploring the carriage of APEC virulence associated genes and the molecular epidemiology of faecal and systemic *E. coli* in commercial broiler chickens. **PLoS ONE**, v. 8, p. e67749, 2013.

KNÖBL, T. **Caracterização epidemiológica molecular e de virulência de *Escherichia coli* *sfa+* isoladas de aves**. 2005. 100f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2005.

KNÖBL, T.; MICKE MORENO, A.; PAIXÃO, R., GOMES, T. A. T.; VIEIRA, M. A. M.; SILVA L. D.; FERREIRA, A. J. P. Prevalence of Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC) Clone Harboring *sfa* Gene in Brazil. **The Scientific World Journal**, 2012.

KNÖBL, T.; SAIDENBERG, A.; MORENO, A. M.; GOMES, T. A.; VIEIRA, M. A.; LEITE, D. S.; BLANCO, J. E.; FERREIRA, A. J. Serogroups and virulence genes of *Escherichia coli* isolated from psittacine birds. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, p. 916-921, 2011.

KRUSE, H.; KIRKEMO, A.; HANDELAND, K. Wildlife as source of zoonotic infections. **Emerging infectious diseases**, v. 10, p. 2067-2072, 2004.

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

LIGHTFOOT, T.; NACEWICZ, C. L. Comportamento de Psitacídeos. In: BAYS, T. B.; LIGHTFOOT, T.; MAYER, J. (Org.). **Comportamento de Animais Exóticos de Companhia: aves, répteis e mamíferos**. São Paulo: Roca, 2009. p. 43-87.

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

LITERAK, I.; VANKO, R.; DOLEJSKA, M.; CIZEK, A.; KARPISKOVA, R.; Antibiotic resistant *Escherichia coli* and *Salmonella* in Russian rooks (*Corvus frugilegus*) wintering in the Czech Republic. **Letters in Applied Microbiology**, v. 45, p. 616-621, 2007.

MACHADO, J.; GRIMONT, F.; GRIMONT, P. A. Identification of *Escherichia coli* flagellar types by restriction of the amplified *fliC* gene. **Research in Microbiology**, v. 151, p. 535-546, 2000.

MALUTA, R. P.; LOGUE, C. M.; CASAS, M. R. T.; MENG, T.; GUASTALLI, E. A. L.; ROJAS, T. C. G.; MONTELLI, A. C.; SADATSUNE, T.; RAMOS, M. C.; NOLAN, L. K.; SILVEIRA, W. D. Overlapped Sequence Types (STs) and Serogroups of Avian Pathogenic (APEC) and Human Extra-Intestinal Pathogenic (ExPEC) *Escherichia coli* Isolated in Brazil. **PLoS one**, v. 9, p. e105016, 2014.

MANGES A. R.; JOHNSON J. R. Food-borne origins of *Escherichia coli* causing extraintestinal infections. **Clinical Infectious Diseases**, v. 55, p. 712-719, 2012.

MARIETTO-GONCALVES, G. A.; ALMEIDA, S. M.; LIMA, E. T.; ANDREATTI FILHO R. L. Detecção de *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. em microbiota intestinal de Psittaciformes em fase de reabilitação e soltura. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 47, p. 185-189, 2010.

MATIAS, C. A. R. **Isolamento e caracterização de enteropatógenos bacterianos em aves provenientes do tráfico de animais selvagens no estado do Rio de Janeiro - Brasil: riscos para a saúde pública**. 2014. 134 f. Tese (Doutorado em Saúde Pública e Meio Ambiente) - Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Rio de Janeiro, 2014.

MAURER J. J.; BROWN T. P.; STEFFENS W. L.; THAYER S. G.; The occurrence of ambient temperature regulated adhesins, curli, and the temperature-sensitive hemagglutinin tsh among avian *Escherichia coli*. **Avian Diseases**, v. 42, p. 106-118, 1998.

MELLATA, M. Human and avian extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: Infections, zoonotic risks, and antibiotic resistance trends. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 10, p. 916-932, 2013.

MONROY, M. A. R.; KNÖBL, T.; BOTTINO, J. Á.; FERREIRA, C. S. A.; FERREIRA, A. J. P. Virulence characteristics of *Escherichia coli* isolates obtained from broiler breeders with salpingitis. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, Oxford, v. 28, p. 1-15, 2005.

MORA, A.; VISO, S.; LÓPEZ, C.; ALONSO, M. P.; GARCÍA-GARROTE, F.; DABHI, G.; MAMANI, R.; HERRERA, A.; MARZOA, J.; BLANCO, M.; BLANCO, J. E.; MOULIN-SCHOULER, M.; SCHOULER, C.; BLANCO, J. Poultry as reservoir for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* O45: K1: H7-B2-ST95 in humans. **Veterinary Microbiology**, v. 167, p. 506-512, 2013.

MORABITO, S.; DELL'OMO, G.; AGRIMI, U.; SCHMIDT, H.; KARCH, H.; CHEASTY, T.; CAPRIOLI, A. Detection and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in feral pigeons. **Veterinary Microbiology**, v. 82, p. 275-283, 2001.

MOULIN-SCHOULEUR M.; RÉPÉRANT M.; LAURENT S.; BRÉE A.; MIGNON-GRASTEAU S.; GERMON P.; RASSCHAERT D.; SCHOULER C. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains of avian and human origin: link between phylogenetic relationships and common virulence patterns. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, p. 3366-3376, 2007.

MOULIN-SCHOULEUR, M.; SCHOULER, C.; TAILLIEZ, P.; KAO, M. R.; BRÉE, A.; GERMON, P.; BLANCO, J. Common virulence factors and genetic relationships between O18:K1:H7 *Escherichia coli* isolates of human and avian origin. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, p. 3484-3492, 2006.

NASCIMENTO, A. M. A.; CURSINO, L.; GONÇALVES-DORNELAS, H.; REIS, A.; CHARTONE-SOUZA E.; MARINI, M. A. Antibiotic-resistant gram-negative bacteria in birds from the Brazilian Atlantic Forest. **The Condor**; v. 105, p. 358-361, 2003.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. A comprehensive review of the pathogenesis, epidemiology, diagnosis and clinical aspects of diarrhoeagenic *E. coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, p. 142-201, 1998.

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

NUNES, V. F. P. Pombos urbanos: o desafio de controle. **Biológico**, v. 65, p. 89-92, 2003.

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

ORSKOV, I.; ORSKOV, F.; JANN, B.; JANN, K. Serology, chemistry, and genetics of O and K antigens of *Escherichia coli*. **Bacteriological Reviews**, v. 41, p. 667-710, 1977.

PICARD, B.; GARCIA, J. S.; GOURIOU, S.; DURIEZ, P.; BRAHIMI, N.; BINGEN, E.; ELION, J.; DENAMUR, E. The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection. **Infection and Immunity**, v. 67, p. 546-553, 1999.

POURBAKHS, S. A.; DHO-MOULIN, M.; BRÉE, A.; DESAULTELS, C.; DOIZE, B.M.; FAIRBROTHER, J. M. Localization of the in vivo expression of P and F1fimbriae in chickens experimentally inoculated with pathogenic *Escherichia coli*. **Microbial Pathogenesis**, v. 22, p. 331-341, 1997.

PRIOSTE, F. E. S.; CUNHA, M. P. V.; TEIXEIRA, R. H. F.; ZWARGG, T.; DI-CHIACCHIO, R. G.; MELVILLE, P. A.; BENITES, N. R.; SINHORINI, J.; MATUSHIMA, E. R.; KNÖBL, T. Similaridade genética entre APEC e cepas de *Escherichia coli* isoladas de Guaruba guarouba em um estudo com psitacídeos hígidos de cativeiro. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 50, p. 145-151, 2013.

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

RADHOUANI, H.; POETA, P.; GONÇALVES, A.; PACHECO, R.; SARGO, R.; IGREJAS, G. Wild birds as biological indicators of environmental pollution: antimicrobial resistance patterns of *Escherichia coli* and enterococci isolated from common buzzards (*Buteo buteo*). **Journal of Medical Microbiology**, v. 61, p. 837-843, 2012.

REED, K. D.; MEECE, J. K.; HENKEL, J. S.; SHUKLA, S. K. Birds, migration and emerging zoonoses: West Nile Virus, Lyme Disease, Influenza A and enteropathogens. **Clinical Medicine and Research**, v. 1, p. 5-12, 2003.

RIBOT, E. M.; FAIR, M. A.; GAUTOM, R.; CAMERON, D. N.; HUNTER, S. B.; SWAMINATHAN, B.; BARRETT, T.J. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, Salmonella, and Shigella for PulseNet. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 3, p. 59-67, 2006.

RILEY, L. W. Pandemic lineages of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, p. 380-390, 2014.

RODRIGUEZ-SIEK, K. E.; GIDDINGS, C. W.; DOETKOTT, C.; JOHNSON, T. J.; NOLAN, L. K. Characterizing the APEC pathotype. **Veterinary Research**, v. 36, p. 241-256, 2005a.

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

RUNYEN-JANECKY, L. J.; REEVES, S. A.; GONZALES, E. G.; PAYNE S. M.; Contribution of the *Shigella flexneri* Sit, luc, and Feo iron acquisition systems to iron acquisition in vitro and in cultured cells. **Infection and Immunity**, v. 71, p. 1919-1928, 2003.

RUSSO, T. A.; JOHNSON, J. R. Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: focus on an increasingly important endemic problem. **Microbes and Infection**, v. 5, p. 449-456, 2003.

RUSSO, T. A.; JOHNSON, J. R. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. **Journal of Infectious Diseases**, v. 181, p. 1753-1754, 2000.

SAIDENBERG, A. B. S. **Detecção de fatores de virulência de *Escherichia coli* isoladas de psitacídeos com diferentes manifestações clínicas**. 2008. 91 f. Dissertação (mestrado Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

SANTANIELLO, A.; GARGIULO, A.; BORRELLI, L.; DIPINETO, L.; CUOMO, A.; SENSALE, M.; FONTANELLA, M.; CALABRIA, M.; MUSELLA, V.; MENNA, L. F.; FIORETTI, A. Survey of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157: H7 in urban pigeons (*Columba livia*) in the city of Napoli, Italy. **Italian Journal of Animal Science**, v. 6, p. 313-316, 2007.

SAVIOLLI, J. Y. **Pesquisa e caracterização de *Escherichia coli* patogênica (*E. coli* produtora de toxina Shiga – STEC; *E. coli* aviária patogênica - APEC) de fragatas (*Fregata magnificens*) da Costa do Estado de São Paulo**. 2010. 83 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

SCHLOEGEL, L. M.; DASZAK, P.; NAVA, A. Medicina da Conservação: buscando causas e soluções práticas para doenças infecciosas emergentes. **Natureza e Conservação**, v. 3, p. 29-41, 2005.

SCHULLER, M. **Pesquisa de protozoários e helmintos de interesse médico presentes nas excretas de pombo-doméstico (*Columba livia domestica*)**. 2003. 93 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Saúde Pública Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

SHAMES, S. R.; AUWETER, S. D.; FINLAY, B. B. Co-evolution and exploitation of host cell signaling pathways by bacterial pathogens. **The international journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 41, p. 380-389, 2009.

SILVA, V. L.; NICOLI, J. R.; NASCIMENTO, T. C.; DINIZ, C. G. Diarrheagenic *Escherichia coli* Strains Recovered from Urban Pigeons (*Columba livia*) in Brazil and Their Antimicrobial Susceptibility Patterns. **Current Microbiology**, v. 59, p. 302-308, 2009.

SIMPSON, V.R. Wild animals as reservoirs of infectious diseases in the UK. **British Veterinary Journal**, v. 163, p. 128-146, 2002.

SIQUEIRA, A. K.; RIBEIRO M.G.; LEITE, D.S.; TIBA, M.R.; MOURA C.; LOPES M.D. Virulence factors in *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infection and pyometra cases and from feces of healthy dogs. **Research in Veterinary Science**, v. 86, p. 206-210, 2009.

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

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

SONNTAG, A. K.; ZENNER, E.; KARCH, H.; BIELASZEWSKA, M. Pigeons as a possible reservoir of Shiga toxin 2f-producing *Escherichia coli* pathogenic to humans. **Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift**, v. 118, p. 464-470, 2004.

SURA, R.; VAN KRUININGEN, H. J.; DEBROY, C.; HINCKLEY, L. S.; GREENBERG, K. J.; GORDON, Z.; FRENCH, R. A. Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*-Induced Acute Necrotizing Pneumonia in Cats. **Zoonoses and Public Health**, v. 54, p. 307-313, 2007.

VANDEKERCHOVE, D.; VANDEMAELE, F.; ADRIAENSEN, C.; ZALESKA, M.; HERNALSTEENS, J. P.; DE BAETS, L.; BUTAYE, P.; VAN IMMERSSEEL, F.; WATTIAU, P.; LAEVENS, H.; MAST, J.; GODDEERIS, B.; PASMANS, F. Virulence-associated traits in avian *Escherichia coli*: comparison between isolates from colibacillosis-affected and clinically healthy layer flocks. **Veterinary Microbiology**, v. 108, p. 75-87, 2005.

VANDEMAELE, F. J.; MUGASA, J. P.; VANDEKERCHOVE, D.; GODDEERIS, B. M. Predominance of the *papGII* allele with high sequence homology to that of human isolates among avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). **Veterinary microbiology**, v. 97, p. 245-257, 2003.

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

WEISSMAN, S. J.; CHATTOPADHYAY, S.; APRIKIAN, P.; OBATA-YASUOKA, M.; YAROVA-YAROVAYA, Y.; STAPLETON, A.; SOKURENKO, E. V. Clonal analysis reveals high rate of structural mutations in fimbrial adhesins of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v. 59, p. 975- 988, 2006.

WOOLEY, R. E.; GIBBS, P. S.; BROWN, T. P.; GLISSON, J. R.; STEFFENS, W. L.; MAURER, J. J. Colonization of the chicken trachea by an avirulent avian *Escherichia coli* transformed with plasmid pHK11. **Avian Disease**, v. 42, p.194-198, 1998.

ZHAO, L.; GAO, S.; HUAN, H.; XU, X.; ZHU, X.; YANG, W.; GAO, Q.; LIU, X. Comparison of virulence factors and expression of specific genes between uropathogenic *Escherichia coli* and avian pathogenic *E. coli* in a murine urinary tract infection model and a chicken challenge model. **Microbiology**, v. 155, p. 1634-1644, 2009.