

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**CARACTERIZAÇÃO DE *Escherichia coli* PATOGÊNICA
PARA AVES (APEC) ISOLADAS DE GALINHAS DE
ANGOLA (*Numida meleagris*)**

**Mariana Monezi Borzi
Mestre em Microbiologia Agropecuária**

2019

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**CARACTERIZAÇÃO DE *Escherichia coli* PATOGÊNICA
PARA AVES (APEC) ISOLADAS DE GALINHAS DE
ANGOLA (*Numida meleagris*)**

Discente: Mariana Monezi Borzi

Orientador: Prof. Dr. Fernando Antonio de Ávila

Coorientadora: Dra. Marita Vedovelli Cardozo

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

B739c Borzi, Mariana Monezi
Caracterização de Escherichia coli patogênica para aves (APEC) isoladas de galinhas de angola (Numida meleagris) / Mariana Monezi Borzi. -- Jaboticabal, 2019
53 p. : il., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal
Orientador: Fernando Antonio de Ávila
Coorientadora: Marita Vedovelli Cardozo

1. colibacilose. 2. fatores de virulência. 3. multi-resistência.
4. potencial zoonótico. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: CARACTERIZAÇÃO DE *Escherichia coli* PATOGENICA PARA AVES (APEC)
ISOLADAS DE GALINHAS DE ANGOLA (*Numida meleagris*)

AUTORA: MARIANA MONEZI BORZI

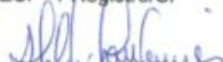
ORIENTADOR: FERNANDO ANTONIO DE ÁVILA

COORIENTADORA: MARITA VEDOVELLI CARDOZO

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


Prof. Dr. FERNANDO ANTONIO DE ÁVILA
Departamento de Patologia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Profa. Dra. LILIAN CRISTINA MAKINO
UNESP / Registro/SP


Prof. Dr. HÉLIO JOSÉ MONTASSIER
Microbiologia / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Profa. Dra. CAROLINE PETERS FIGATTO DE NARDI
Instituto Federal de São Paulo / Matão/SP


Prof. Dr. MANOEL VICTOR FRANCO LEMOS
Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 04 de junho de 2019

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

MARIANA MONEZI BORZI – Nascida em agosto de 1990, natural de Taquaritinga – São Paulo, Brasil, filha de Maria de Fatima Monezi Borzi e José Carlos Borzi. Graduou-se em Ciências Biológicas (Licenciatura e Bacharelado) pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista (FCAV – UNESP) no ano de 2012. Concluiu o curso de Mestrado em Microbiologia Agropecuária pela mesma instituição no ano de 2015, sob orientação do Prof. Dr. Hélio José Montassier, com bolsa do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Cnpq). No mesmo ano, ingressou no curso de Doutorado do mesmo programa, sob orientação do Prof. Dr. Fernando Antonio de Ávila, com bolsa da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).
E-mail: mmborzi@gmail.com.

“Não há saber mais ou saber menos: há saberes diferentes”.

Paulo Freire
Educador, pedagogo e filósofo brasileiro.

Dedico este trabalho aos meus pais por terem me proporcionado o privilégio de apenas estudar, sem maiores preocupações.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e da inteligência e por me guiar nos momentos de dificuldade.

Aos meus pais, Fatima e José, pelo amor, apoio e incentivo em todas as minhas escolhas. Por terem feito o melhor que poderiam fazer, me proporcionado o privilégio de apenas estudar, sem maiores preocupações. E a toda minha família pelas orações a mim dedicadas.

Ao Prof. Dr. Fernando Antonio de Ávila, grande amigo e orientador, pela confiança, disposição e por seus ensinamentos valiosos que enriqueceram a minha caminhada para um dia me tornar uma pesquisadora e professora de excelência tal como ele.

À Marita Vedovelli Cardozo, grande amiga e co-orientadora, pelos momentos de amizade, descontração, ajuda nos trabalhos de campo e bancada e principalmente pelos seus ensinamentos.

À amiga Andressa de Souza Pollo pela paciência e ensinamentos durante uma das fases de execução deste trabalho.

Aos demais professores, amigos e funcionários do departamento de Microbiologia Agropecuária, que tornaram meus dias de estudos e pesquisas muito mais agradáveis. Em especial à Elisabete Schirato pela disposição em auxiliar sempre no que fosse necessário, nos trabalhos de bancada e nas coletas e pelas palavras amigas durante os momentos nos quais precisei.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Aos animais e aos seus proprietários que contribuíram para a realização deste trabalho.

Às demais pessoas que não foram citadas aqui e que colaboraram direta ou indiretamente para o sucesso deste trabalho.

Meus sinceros agradecimentos!

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	iv
ABSTRACT.....	v
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1 Galinha de angola.....	2
2.2 <i>Escherichia coli</i>	2
2.3 Isolados APEC e a Colibacilose aviária.....	5
2.4 Fatores de virulência para APEC.....	6
2.5 Potencial zoonótico de APEC.....	8
2.6 Resistência antimicrobiana.....	9
2.6.1 Resistência a β -lactâmicos.....	10
3. OBJETIVOS.....	10
3.1 Geral.....	10
3.2 Específicos.....	11
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	12
4.1 Coleta das amostras.....	12
4.2 Detecção de isolados potencialmente APEC e genes de virulência adicionais.....	12
4.3 Tipagem filogenética.....	13
4.4 Susceptibilidade antimicrobiana.....	14
4.5 Identificação sorológica.....	14
4.6 Teste de patogenicidade.....	14
4.7 Eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE).....	15
4.8 Multilocus sequence typing (MLST).....	15
5. RESULTADOS.....	16
5.1 Estabelecimento dos patótipos e detecção de genes associados a virulência (VAGs).....	16
5.2 Tipagem filogenética.....	17
5.3 Teste de suscetibilidade a antimicrobianos.....	20

5.4 Identificação sorológica	21
5.5 Patogenicidade.....	21
5.6 Eletroforese em campo pulsátil (PFGE).....	22
5.7 Multilocus sequence typing (MLST).....	22
6. DISCUSSÃO.....	22
7. CONCLUSÕES.....	27
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	28

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "**Detecção de *Escherichia coli* Patogênica para Aves (APEC), Shigatoxigênica (STEC) e Enteropatógena (EPEC) em Galinhas de Angola**", protocolo nº 19.008/16, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Fernando Antonio de Ávila, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de junho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 14 de dezembro de 2016.

Vigência do Projeto	02/02/2017 a 30/06/2017
Espécie / Linhagem	<i>Numida meleagris</i> (Galinha d'angola)
Nº de animais	100
Peso / Idade	1,5 kg
Sexo	Machos e fêmeas
Origem	Pequenas propriedades rurais de Jaboticabal-SP

Jaboticabal, 14 de dezembro de 2016.


Prof.ª Dr.ª Lizandra Amoroso
Coordenadora – CEUA

CARACTERIZAÇÃO DE *Escherichia coli* PATOGÊNICA PARA AVES (APEC) ISOLADAS DE GALINHAS DE ANGOLA (*Numida meleagris*)

RESUMO - *Escherichia coli* patogênica aviária (APEC) é o principal agente da colibacilose, responsável por perdas econômicas em todo o mundo. Na literatura não há um consenso sobre o que define exatamente um patótipo APEC e não se sabe o papel das galinhas de angola na transmissão de APEC para humanos e outros animais. O presente estudo teve como objetivo investigar a presença de APEC em amostras de fezes e orofaringe de galinhas de angola saudáveis e de vida livre, bem como pesquisar fatores de virulência e caracterizá-las filogeneticamente e de acordo com o sorotipo e perfil de resistência a antimicrobianos. Os isolados obtidos apresentaram alta frequência de genes associados à virulência (VAGs) sendo a maioria pertencente ao grupo filogenético B1 e os pertencentes aos grupos B2 e F estiveram associados a um maior número de VAGs. Além disso, grande parte dos isolados foram considerados de alta patogenicidade e apresentaram um perfil de multi resistência a antimicrobianos, incluindo a presença de genes β -lactamases de espectro estendido. Os sorogrupos O2, O51e H4 foram os mais encontrados, sendo o sorotipo O51: H14 o de maior prevalência. As análises PFGE e MLST revelaram uma elevada heterogeneidade entre os isolados associados a 16 *Sequence types* (ST). Os resultados demonstraram que as galinhas de angola saudáveis e de vida livre podem se constituir como fontes de infecção de ExPEC para outros animais que têm contato próximo com essas aves, incluindo seres humanos.

Palavras-chave: colibacilose, fatores de virulência, multi-resistência, potencial zoonótico

CHARACTERIZATION OF AVIAN PATHOGENIC *Escherichia coli* (APEC) ISOLATED FROM GUINEA FOWL (*Numida meleagris*)

ABSTRACT - Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC) is the main agent of colibacillosis, responsible for economic losses worldwide. In the literature there is no consensus on what exactly defines this pathotype and the role of guinea fowls in transmitting APEC to humans and other animals is unknown. The present study aimed to investigate the presence of APEC in feces and oropharynx samples from healthy and free-living guinea fowls, as well as to investigate virulence factors and characterize phylogenetically them and according to the serotype and antimicrobial resistance profile. The obtained isolates showed high frequency virulence associated genes (VAGs) being the majority belonging to the phylogenetic group B1 and those belonging to groups B2 and F were associated to a greater number of VAGs. In addition, most of the isolates were considered to be highly pathogenic and had a multi-resistant antimicrobial profile, including the presence of extended-spectrum β -lactamases. Serogroups O2, O51 and H4 were the most frequently found, with serotype O51:H14 being the most prevalent. The PFGE and MLST analyzes revealed a high heterogeneity among isolates associated with 16 Sequence types (ST). The results showed that healthy and free-living guinea fowls may be sources of ExPEC infection for other animals that have close contact with these birds, including humans.

Key words: colibacillosis, virulence factors, multi-resistance, zoonotic potential

1. INTRODUÇÃO

Cepas de *Escherichia coli* patogênica para aves (APEC) causam um grande número de enfermidades extra-intestinais em aves, de forma localizada ou como infecções sistêmicas, denominadas de colibacilose aviária, sendo responsáveis por perdas econômicas em todo o mundo (Dho-Moulin e Fairbrother, 1999; Huja et al, 2015). Fazem parte de um grupo de bactérias extra-intestinais patogênicas (ExPEC) que possuem também representantes associados a enfermidades em humanos, sendo geneticamente muito semelhantes entre si, o que faz questionar sobre o caráter zoonótico desta doença (Huja et al, 2015; LeStrange et al, 2017).

Embora apenas estirpes patogênicas possam causar enfermidades, sabe-se que, em situações que causam imunossupressão do hospedeiro, estirpes não patogênicas também podem ocasionar infecções (Ferreira e Knöbl, 2000; Won et al, 2009). Além disso, não somente as doentes, mas também as aves saudáveis podem eliminar no ambiente estirpes portadoras de genes de virulência (VAGs), tornando-se fontes de infecções para outros animais, incluindo os seres humanos (Ewers et al., 2004; Bélanger et al, 2011; Johnson et al, 2017). Outro aspecto relacionado à saúde humana é o uso indiscriminado de antibióticos na produção animal, o que leva à seleção de estirpes altamente resistentes que podem transferir genes de resistência para outras bactérias no ambiente como também para a microbiota normal de humanos (WHO, 2014; Fricke et al., 2009; Mendonça et al 2016).

Ainda não há uma evidência na literatura sobre o que define exatamente o patótipo APEC e o desenvolvimento de metodologias viáveis para o seu diagnóstico, visto que se constitui como um grupo muito heterogêneo de micro-organismos, em que diferentes isolados podem abrigar diferentes associações de fatores de virulência, cada um capaz de induzir colibacilose aviária (Schouler et al; 2012).

Aves de fundo de quintal e humanos dividem com frequência o mesmo ambiente, de forma que essas aves e também os seus produtos (carne e ovos), podem ser fontes de infecção de ExPEC para o homem (Mitchell et al., 2015). Como qualquer fonte de proteína de origem animal, as galinhas de angola podem ser possíveis vias de transmissão de micro-organismos patogênicos aos seres

humanos. Kilonzo-Nthenge (2008) e Adzitey et al. (2015) já encontraram, além de outras espécies bacterianas, *E. coli* em galinhas de angola, inclusive cepas com resistência a antimicrobianos, entretanto ainda não existem estudos específicos sobre estas aves como via de transmissão de linhagens APEC.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Galinha de angola

A galinha de angola (*Numida meleagris* - Linnaeus, 1758), também conhecida como guiné, galinha-do-mato, capote, capota, pintada ou fraca é uma ave da ordem Galliformes. De origem africana, foi introduzida no Brasil pelos portugueses e sua criação é atualmente difundida em todo o território nacional, principalmente na região Nordeste (Targino, 2015).

É uma ave rústica que pode ser criada pelo sistema extensivo, no qual possui liberdade para procriar, sem a intervenção do criador. Neste tipo de manejo, as aves tornam-se mais ariscas e seu aproveitamento econômico é pouco, uma vez que escondem seus ninhos. Entretanto, este tipo de criação traz benefícios visto que as galinhas de angola se alimentam de insetos, formigas, carrapatos, escorpiões, dentre outros, sendo importantes no controle biológico de pragas (Fabichak, 1997; Mallman et al, 2001). Por outro lado, sua criação intensiva tem se constituído como uma alternativa rentável à produção de carne de frango em países da América Latina bem como nos Estados Unidos, Canadá e países da Europa e África, visto que sua carne e ovos são muito apreciados em hotéis e restaurantes sofisticados, além de serem criadas como aves ornamentais em sítios e fazendas (Menezes et al, 2001; Kilonzo-Nthenge et al., 2008).

Bhogoju et al (2018) ao analisarem o perfil microbiano de galinhas de angola utilizando metagenômica evidenciaram que a família Enterobacteriaceae é a segunda mais encontrada na microbiota intestinal destas aves. Apesar de serem

bastante resistentes a doenças, sabe-se que até mesmo aves aparentemente saudáveis podem albergar micro-organismos que carregam genes de virulência, como por exemplo, isolados patogênicos de *E. coli* (Rodríguez-Siek et al., 2005; Dziva e Stevens, 2008).

2.2 *Escherichia coli*

A bactéria *E. coli* foi descrita pela primeira vez em 1884 pelo microbiologista alemão Theodor Escherich e por ele chamada de *Bacterium coli commune*. É o micro-organismo mais conhecido e utilizado em pesquisa biológica básica e nos métodos moleculares de investigação e manipulação da vida, visto que é de fácil cultivo laboratorial, não exigindo meios de cultura diferenciados ou condições especiais para o seu crescimento (Cooke, 1985; Blount, 2015).

Faz parte da família Enterobacteriaceae, sendo um típico bacilo gram-negativo, fermentadoras de lactose e produtores de indol, anaeróbias facultativas, com aproximadamente 0,5 µm de diâmetro e 1 a 3 µm de comprimento. São mesófilas, imóveis ou móveis quando há presença de flagelos peritríquios (Edwards e Ewing's, 1986).

Esta espécie bacteriana é uma das mais comuns do trato gastrointestinal de animais homeotérmicos, sendo considerada por muito tempo como um micro-organismo não patogênico. Entretanto, sabe-se atualmente que algumas cepas se constituem como importantes patógenos para os seres humanos e outros animais (Blount 2015; Vila et al, 2016).

Cepas de *E. coli* são classificadas como comensais, patogênicas intestinais (diarreicas ou não) e extraintestinais. As cepas comensais são adaptadas a conviverem pacificamente com o hospedeiro e geralmente não possuem características de virulência tais como as outras, causando enfermidades apenas quando há um comprometimento do sistema imune hospedeiro. São necessárias para a microbiota intestinal, pois auxiliam na digestão de alimentos e síntese e absorção de nutrientes. Em contrapartida, cepas patogênicas intestinais raramente

são encontradas em animais saudáveis, sendo divididas em seis grupos: enterotoxigênicas (ETEC), produtoras de shigatoxina/enterohemorrágicas (STEC/EHEC), enteropatogênicas (EPEC), enteroinvasivas (EIEC), enteroagregativas (EAEC) e de adesão difusa (DAEC), sendo todas patógenos obrigatórios (Ferreira e Knöbl, 2000; Russo e Jhonson, 2000; Robins-Browne et al, 2016).

As bactérias extra-intestinais patogênicas (ExPEC) constituem um grupo de patógenos facultativos relacionadas a infecções urinárias, peritonite, pneumonia, meningites neonatais, septicemias dentre outras enfermidades que podem ocasionar a morte dos hospedeiros (Kohler e Dobrindt, 2011; Tivendale, 2010; Russo e Jhonson, 2000; Robins-Browne et al 2016). Este grupo de micro-organismos é dividido em subpatótipos, os quais: *E. coli* uropatogênica (UPEC), *E. coli* associada à meningite neonatal (NMEC), *E. coli* causadora de septicemias (SPEC) e *E. coli* patogênica aviária (APEC), causadora da colibacilose aviária (Kohler e Dobrindt, 2011).

Cepas de *E. coli* também são classificadas conforme a sorotipagem, baseada na variação dos seus antígenos, sendo os somáticos (O) e os flagelares (H) os mais empregados para esta finalidade. O antígeno O é um oligossacarídeo constituinte do lipopolissacarídeo bacteriano (LPS), importante nos processos inflamatórios. Já o antígeno H é de natureza proteica e forma o flagelo bacteriano quando este está presente. Os antígenos capsulares (K) e fimbriais (P) também são utilizados na tipagem sorológica, porém com menor frequência (Cunha et al, 2013). A sorotipagem de *E. coli* tem aplicação na identificação preliminar dos subpatótipos e possíveis clones patogênicos relacionados a surtos no mundo todo (Robins-Browne et al, 2016).

Devido ao fato da *E. coli* apresentar um genoma bastante conservado em sua maior parte, a determinação da distância genética entre as linhagens com base em polimorfismos de nucleotídeos em genes comuns também é atualmente bastante empregada para a sua classificação. A técnica de *Multilocus sequence typing* (MLST) baseia-se na definição de Tipos de Sequência (STs), através de análises de combinações alélicas de genes superconservados, os chamados “housekeeping genes”, sendo de grande utilidade não somente para a definição de subtipos deste

patógeno como também no rastreamento de estirpes particulares em diferentes regiões do mundo (Robins-Browne et al, 2016).

A subtipagem de *E. coli* também é realizada através do esquema de Clermont (Clermont et al, 2000; 2013) que se constitui como outra importante ferramenta para a determinação do potencial patogênico das cepas (Logue et al, 2017). Existem 7 filogrupos (A, B1, B2, C, D, E e F) de acordo com o esquema mais atualizado de Clermont et al (2013). Amostras comensais, em sua grande maioria, são agrupadas nos grupos filogenéticos A e B1, já as amostras patogênicas extra-intestinais pertencem principalmente ao grupo B2 e, em menor grau, ao grupo D (Jhonson e Russo, 2002; Clermont et al, 2000; Rocha et al., 2017).

Para a determinação da relação epidemiológica entre as estirpes de *E. coli* emprega-se a técnica de Eletroforese em gel de Campo Pulsado (PFGE), padrão ouro em epidemiologia molecular. Esta técnica separa grandes fragmentos de DNA digeridos com endonucleases de restrição, através de sua reorientação a partir dos efeitos de campos elétricos alternados (ou pulsados) em gel de agarose "pulse field". Os padrões de macrorestrição são utilizados para agrupar e diferenciar *E. coli* patogênica (Barrett et al., 1994; Tenover et al, 1995).

2.3 Isolados APEC e a Colibacilose aviária

O Brasil é o segundo maior produtor e o primeiro exportador de carne de frango no mundo (ABPA, 2018). Desta forma, isolados APEC são de grande importância para o país, pois causam um conjunto de doenças em aves denominado de colibacilose aviária a qual acarreta prejuízos econômicos em toda a cadeia produtora de aves (Cunha et al, 2015).

A colibacilose aviária é causada pelo subpatótipo APEC e se manifesta de várias formas e caracteriza-se por infecções locais ou sistêmicas incluindo peritonite, aerossaculite, pericardite, salpingite (infecção do oviduto), onfalite (infecção do embrião), celulite (dermatite necrótica), doença respiratória crônica complicada,

síndrome da cabeça inchada, sinovite, colisepticemia dentre outros, sendo a última a forma mais grave de manifestação (Dziva e Stevens, 2008).

Infecções por APEC são multifatoriais e condições ambientais e de manejo inadequadas das aves tais como superpopulação, problemas com ventilação, acumulação excessiva de amônia no ambiente e a presença de agentes virais e verminoses podem levar ao desenvolvimento da colibacilose, visto que esses fatores afetam o sistema imune do hospedeiro e/ou lesionam seu epitélio respiratório que é a porta de entrada dos isolados de APEC (Ferreira e Knöbl, 2000; Barcelos, 2005; Won et al, 2009).

2.4 Fatores de virulência para APEC

Tendo em vista que o patótipo APEC é um grupo muito diversificado de microorganismos, há na literatura inúmeros trabalhos que procuram caracterizá-lo bem como desenvolver metodologias para seu diagnóstico molecular. Sabe-se que diferentes isolados podem abrigar diferentes associações de fatores de virulência, cada um capaz de ocasionar a colibacilose aviária e que alguns genes são mais associados a cepas patogênicas (Ewers et al, 2004; Johnson et al, 2006a; Johnson et al, 2006b; Johnson et al, 2008; Schouler et al; 2012).

A pesquisa destes genes relacionados à patogenicidade é realizada através de metodologias moleculares que buscam a detecção de genes relacionados à produção de adesinas, hemolisinas, toxinas, sistemas de aquisição de ferro e mecanismos de resistência às proteínas presentes no soro do hospedeiro (Rocha et al., 2008; Nakazato et al., 2009). Isto porque, para que estas cepas patogênicas sejam capazes de causar doenças no hospedeiro é necessário que elas consigam se aderir ao tecido que será colonizado por meio das adesinas, sobreviver às proteínas presentes no soro do hospedeiro e serem capazes de se multiplicar nos seus líquidos biológicos (sangue, por exemplo) através dos sistemas de aquisição de ferro, além de produzir toxinas contra o hospedeiro (Horn et al., 2012; Barbieri et al., 2013).

A adesão ao epitélio do trato respiratório das aves é o primeiro passo para o estabelecimento da infecção (Dho-Moulin e Fairbrother, 1999). Dentre as adesinas mais estudadas encontram-se as fimbrias, que são filamentos proteicos da superfície celular bacteriana (Dziva e Stevens, 2008). A Fímbria tipo 1 (F1) é um dos mais importantes fatores de virulência de isolados APEC, encontrada em mais de 70% das cepas (Barbieri et al, 2013), sendo codificada por um operon de nove genes (*fimA*, *fimB*, *fimC*, *fimD*, *fimE*, *fimF*, *fimG* e *fimH*). Destes, *fimH* é altamente conservado nestas cepas (Dho-Moulin e Fairbrother, 1999; Vandemaele et al, 2003; Klemm et al., 2010). Além desta, também existe a fímbria P, codificada pelo operon *pap* (*papA*, *papE*, *papF*, *papG*, *papH*, *papK*, *papC*, dentre outros) (Kawano et al, 2006).

Além das adesinas fimbriais, existem as não fimbriais, como a proteína com atividade hemaglutinante TSH (“temperature sensitive hemagglutinin”), responsável pela aglutinação de hemácias a 26°C e codificada pelo gene *tsh*, cuja frequência é maior em isolados patogênicos (Dho-Moulin e Fairbrother, 1999; Ewers et al, 2004).

Posteriormente à adesão ao tecido é necessário que a bactéria sobreviva às proteínas do sistema complemento do hospedeiro e ao processo de fagocitose (Nolan et al., 2003). Os genes *iss* (“increased serum survival”) e *traT* são codificados pelo plasmídeo ColV e são determinantes para a resistência sérica do micro-organismo (Gyles e Fairbrother, 2010; Johnson et al, 2008; Dziva e Stevens, 2008). O mesmo plasmídeo também codifica o gene *cvaC*, responsável pela produção de colicinas, que são substâncias que inibem o crescimento de outras espécies bacterianas (Lloubes et al., 2013).

Isolados APEC também podem ser capazes de produzir toxinas que, como o próprio nome diz, podem direta ou indiretamente serem tóxicas ao hospedeiro. Dentre elas, destacam-se a toxina termoestável EAST1, codificada pelo gene *astA*, a proteína vacuolizante *Vat*, codificada pelo gene *vat* e a α -hemolisina, codificada pelo gene *hlyA* (Parreira e Gyles, 2003; Oh et al., 2014). As hemolisinas destroem os eritrócitos do hospedeiro para a liberação de ferro e sua posterior captação pelo patógeno (Rocha et al., 2002).

Ouros sistemas de aquisição de ferro dos tecidos do hospedeiro, os chamados sideróforos, são de grande importância para a virulência bacteriana

(Gyles e Fairbrother, 2010). Os sideróforos são substâncias quelantes de ferro que permitem as bactérias crescerem em meios deficientes deste mineral (Monroy et al 2003). O sistema mais comumente encontrado em isolados APEC é a aerobactina, codificada por um operon também presente no plasmídeo CoIV. Este operon é composto pelos genes *iucABCD* e *iutA*, os quais são encontrados apenas em cepas virulentas (Dziva e Stevens, 2008; Ling et al., 2013). Os operons *iroBCDEN* e *sitABCD* e os genes *fyuA* (“ferric yersinia uptake – yersinabactin receptor”) e *irp2* (“iron repressible protein yersinabactin synthesis”) também são relacionados à captura de ferro do hospedeiro (Dziva e Stevens, 2008; Ling et al., 2013).

Existem outros fatores de virulência, como, por exemplo, a presença da protease OmpT. Codificada pelo gene *ompT*, esta protease participa da invasão de células endoteliais pelo micro-organismo e está relacionada a meningites neonatais em humanos (Huang et al., 2001; Hejair et al., 2017).

2.5 Potencial zoonótico de APEC

Embora isolados APEC sejam característicos de aves, alguns estudos já demonstraram que este subpatótipo compartilha até mesmo regiões genômicas idênticas com outras bactérias patogênicas e não patogênicas relacionadas a humanos, como por exemplo as do patótipo UPEC (Johnson et al, 2007; Cunha et al, 2015; Rodriguez-Siek et al., 2005). Além disso, mesmo que os isolados não apresentem os genes necessários para causar infecções em outros animais, eles possuem potencial para adquirir de outras cepas de *E.coli* presentes no meio ambiente (Tivendale, 2010; Kohler e Dobrindt, 2011; Le Strange et al 2017).

Pesquisas no mundo todo têm demonstrado que isolados ExPEC de humanos são capazes de causar doenças em aves e que certas infecções urinárias em humanos estão associadas à ingestão de aves contaminadas com isolados APEC bem como estes isolados podem levar à doenças no trato urinário, meningite neonatal e sepse em camundongos (Moulin-Schouleur et al., 2007; Zhao et al., 2009; Jakobsen et al., 2010; Tivendale et al., 2010; Le Strange et al 2017).

Todas essas informações tornam relevante o papel de cepas de APEC na saúde pública, pois as aves podem ser um veículo ou pelo menos, reservatórios de *E. coli* não somente patogênicas para humanos e outros animais como também resistentes a antimicrobianos (Menão et al., 2002; Johnson et al., 2007).

2.6 Resistência antimicrobiana

Antimicrobianos são substâncias que impedem o crescimento dos micro-organismos ou os matam diretamente, como por exemplo, os microbiostáticos e os microbicidas, respectivamente. O modo como agem contra os micro-organismos varia conforme sua classe: podem causar danos à membrana plasmática, inibir a síntese de proteínas, parede celular, ácidos nucleicos e outros compostos importantes para o metabolismo microbiano (Tortora, 2012).

O uso abusivo destas substâncias se dá a mais de 70 anos na agricultura, aquicultura e medicina humana e animal, expondo as populações bacterianas à pressão seletiva para sua adaptação no ambiente, o que induz ao surgimento de perfis de multi resistência antimicrobiana. Como consequência, estes medicamentos tornaram-se menos eficazes e alguns até mesmo ineficazes, causando impactos negativos na saúde pública (WHO, 2014; Hughes, 2014).

Os sistemas de produção atual de alimentos de origem animal dependem da utilização de grandes quantidades de antimicrobianos para o controle de doenças. Na avicultura, os antibióticos são comumente utilizados não somente para prevenir e/ou tratar infecções como também promover o crescimento dos animais (Aarestrup, 2005; Mellata, 2013).

Os produtos de origem animal, mesmo aqueles rotulados como “orgânicos”, podem ser um ameaça à saúde humana visto que carregam bactérias com perfis de resistência antimicrobiana (Johnson et al, 2017). Sabe-se que o isolamento de bactérias multi resistentes (resistentes a 3 ou mais classes de antibióticos) em carnes de aves é maior do que em outros tipos, sugerindo então que o uso indiscriminado de antibióticos na avicultura contribui significativamente para o

surgimento de resistência em isolados ExPEC de humanos (Mellata, 2013). Alimentos de origem animal e outros produtos são comercializados mundialmente. Assim, a ocorrência de resistência antimicrobiana em um país é um problema para todos os outros (Aarestrup, 2005).

2.6.1 Resistência a β -lactâmicos

Um dos mecanismos mais encontrados em bactérias gram-negativas como forma de resistência a antibióticos é a produção de enzimas β -lactamases, responsáveis por hidrolisar o anel β -lactâmico de antimicrobianos como penicilinas e cefalosporinas, tornando-os inativos. As β -lactamases de espectro estendido (ESBL) são enzimas capazes de hidrolisar o anel β -lactâmico de cefalosporinas de terceira geração (cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona) e muitas variantes ESBL são conhecidas, sendo comuns na família Enterobacteriaceae os tipos TEM, SHV e CTX-M (Sturenburg e Mack, 2003).

Genes que codificam ESBLs já foram encontrados em amostras bacterianas isoladas de fezes de aves saudáveis, em frangos de corte e em aves de vida selvagem (Mellata, 2013; Dutil et al., 2010; Bortolaia et al., 2010; Asai et al., 2011; Guenther et al., 2011) e podem ser transferidos verticalmente para outras espécies bacterianas (Fricke et al., 2009; Mellata, 2013). Ademais, micro-organismos produtores de ESBL são frequentemente resistentes a outras classes de antibióticos não β -lactâmicos, resultando em infecções de difícil tratamento (Sturenburg e Mack, 2003).

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Este trabalho teve como objetivo geral investigar a presença de APEC em amostras de fezes e orofaringe de galinhas de angola saudáveis e de vida livre, bem como pesquisar nos isolados fatores de virulência e caracterizá-las filogeneticamente e de acordo com o sorotipo e perfil de resistência a antimicrobianos, auxiliando na caracterização deste subpatótipo de *E. coli* estabelecendo o potencial destas aves de poderem contribuir para as infecções em humanos e outros animais.

3.2 Específicos:

- Detectar por meio de PCR isolados potencialmente APEC em galinhas de angola de vida livre e saudáveis na região de Jaboticabal-SP;
- Caracterizar os isolados potencialmente APEC através da pesquisa de genes de virulência;
- Determinar de sua patogenicidade por meio do teste *in vivo* em pintainhos de um dia de idade;
- Caracterizar o perfil de resistência antimicrobiana dos isolados potencialmente APEC;
- Detectar por meio de PCR a presença de genes de β -lactamases de espectro estendido (ESBL);
- Determinar os sorotipos dos isolados potencialmente APEC;
- Determinar o agrupamento filogenético dos isolados potencialmente APEC;
- Estabelecer relação epidemiológica dos isolados potencialmente APEC por Eletroforese em gel de Campo Pulsado (PFGE) e *Multilocus sequence typing* (MLST).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta das amostras

Foram utilizadas um total de 112 amostras de fezes, colhidas diretamente da cloaca e de orofaringe. Essas amostras foram coletadas de 56 galinhas de angola, de origem genética desconhecida e de diferentes faixas etárias, provenientes de 4 propriedades rurais no município de Jaboticabal – SP, Brasil. A maioria destas aves conviviam juntamente com outras espécies de aves, incluindo galinhas caipiras (*Gallus gallus*), pavões, gansos e patos como também animais domésticos (cachorros, gatos e coelhos).

As aves foram contidas manualmente para que as amostras fossem coletadas com auxílio de suabes estéreis, os quais foram colocados em tubos contendo 5 mL de caldo BHI (Brain Heart Infusion) e mantidos em caixa de isopor com gelo até o processamento em laboratório.

4.2 Detecção de isolados potencialmente APEC e genes de virulência adicionais

Os suabes inoculados em caldo BHI foram incubados a 37°C por 16 h para em seguida ser realizada uma Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) de triagem para a detecção dos genes *cvaC*, *iroN*, *iss*, *iutA*, *ompT* e *hlyF* (Kemmett et al, 2013). Os protocolos para a preparação do DNA *template* e PCR bem como os oligonucleotídeos iniciadores correspondentes para cada gene foram retirados do protocolo do Laboratório de referência para *Escherichia coli* (EcL) da Universidade de Montreal, disponível em http://www.apzec.ca/en/APZEC/Protocols/APZEC_PCR_en.aspx. As amostras positivas para pelo menos cinco dos genes citados acima foram usadas para se detectar os isolados de *E. coli* potencialmente APEC.

Estas amostras foram semeadas por esgotamento em placas contendo ágar MacConkey e incubadas a 37°C por 24 h. Dez colônias com características típicas de *E. coli* foram retiradas de cada placa e semeadas novamente em placas contendo BHI sólido. Estas placas foram divididas ao meio e as colônias semeadas formando dois conjuntos (A e B) com cinco colônias cada um e incubadas por 16 horas a 37°C. Em seguida, um conjunto de cada grupo foi transferido para tubos contendo caldo BHI, incubados por 16 h a 37°C, submetidos à extração de DNA e PCR para confirmação dos genes utilizados na triagem. O conjunto que apresentou resultado positivo para pelo menos um dos genes investigados foi selecionado e as cinco colônias que formavam este conjunto foram avaliadas individualmente da mesma forma como descrito anteriormente. Seguindo o recomendado por Kemmett et al. (2013), as amostras que foram positivas, durante essa última etapa, para pelo menos cinco dos genes citados na triagem, foram consideradas potencialmente APEC. As colônias positivas na PCR foram estocadas como culturas puras no freezer -80°C e utilizadas nos outros testes.

Todos os isolados potencialmente APEC encontrados foram submetidos a novas análises por PCR para a detecção de mais 11 genes de virulência (*sitA*, *tsh*, *traT*, *vat*, *astA*, *iucC*, *iucD*, *papC*, *irp2*, *fimH* e *fyuA*) de acordo com os protocolos do EcL citados anteriormente. A frequência das VAGs foram comparadas com o teste Fisher utilizando-se do *Prism for Windows version 6.01 (GraphPad Software)*. Associações foram consideradas estatisticamente significantes quando P-value foi < 0.05.

4.3 Tipagem filogenética

A identificação através de PCR dos produtos dos genes *chuA*, *yjaA*, *TspE4C2*, *arpA* e *trpA* foi realizada para todos os isolados conforme os protocolos e utilizando os oligonucleotídeos iniciadores descritos por Clermont et al. (2013).

4.4 Suscetibilidade antimicrobiana

O método de difusão em disco (CLSI 2015) foi utilizado para os testes de suscetibilidade dos isolados frente aos seguintes antimicrobianos: ampicilina (amp) - 10µg, cefalotina (cfl) - 30µg, estreptomicina (est) - 10µg, gentamicina (gen) - 10µg, ciprofloxacina (cip) - 5µg, cloranfenicol (clo) - 30µg, tetraciclina (tet) - 30µg, nitrofurantoína (nit) - 300µg, sulfametoxazol+trimetoprim (sut) - 25µg, ceftiofur (ctf) - 30µg, ceftriaxona (cro) - 30µg, amicacina (ami) - 30µg, cefoxitina (cfo) - 30µg, kanamicina (kan) - 30µg, amoxicilina + ácido clavulânico (amc) - 30µg, norfloxacin (nor) - 10µg e fosfomicina (fos) - 50µg.

Também foi pesquisado a presença de genes de beta-lactamase de espectro estendido (ESBL) através de PCR dos grupos *bla*_{CTX-M} 1, 2 e 9, *bla*_{TEM} e *bla*_{SHV} (Essack et al, 2001; Saladin et al, 2002; Dierikx et al, 2013).

4.5 Identificação sorológica

As estirpes de APEC foram sorotipadas através de soroaglutinação rápida (Orskov e Orskov, 1992) empregando anti-soros específicos produzidos a partir de cepas de referência contra o antígenos somáticos (O1-O181) e flagelares (H1-H56) produzidos no Centro de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz - São Paulo/SP, Brasil.

4.6 Teste de patogenicidade

A concentração do inóculo foi padronizada em 10^7 unidades formadoras de colônias/mL (UFC/mL). Foi inoculado 0,1 mL de cultura bacteriana, no saco aéreo torácico esquerdo de pintainhos de um dia de idade, conforme descrito por Monroy et al. (2005). O inóculo foi preparado a partir de uma colônia de cada estirpe

semeada em 10 mL de caldo BHI, incubando-se por 18 h a 37 °C e em seguida diluindo a cultura em uma proporção de 1:10. O controle positivo foi uma amostra de *E. coli* (sorogrupo O1) pertencente à coleção de culturas do Laboratório de Ornitopatologia da USP (Universidade de São Paulo, Brasil). O controle negativo apenas caldo BHI. Grupos de 10 pintainhos machos de linhagem de postura comercial foram utilizados para cada estirpe e também para os controles positivo e negativo. As aves foram observadas no período de 10 dias e as estirpes foram classificadas de acordo com o índice de patogenicidade, em alta (≥ 80 %), de mortalidade intermediária (> 50 % e < 80 %), baixa patogenicidade (≤ 50 %) e ausente (mortalidade zero) seguindo protocolo de Guastalli et al (2013).

4.7 Eletroforese em gel de Campo Pulsado (PFGE)

A técnica foi realizada de acordo com Ribot et al. (2006). Em resumo, foi realizada a preparação dos plugues e a digestão do DNA cromossomal com a enzima Xba I (Invitrogen®, EUA). Como referência de peso molecular foi utilizada a estirpe de *Salmonella* Braenderup H9812. A eletroforese ocorreu durante 23 h a 14°C, em gel de agarose Pulsifield Certified 1 %, com tempo inicial de 2,2 s, tempo final de 54,2 s em um gradiente de 6 V cm^{-1} e um ângulo de 120°. A semelhança dos fragmentos foi comparada usando-se o coeficiente de Dice a 1 % de tolerância e 0,5 % de otimização e o dendrograma foi calculado através do método de agrupamento neighbor joining, usando-se o programa BioNumerics versão 7.1 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Bélgica).

4.8 Multilocus sequence typing (MLST)

O conjunto de sete genes *housekeeping* (*adh*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA*, *recA*) amplificados por meio de PCR foram escolhidos com base no protocolo de

MLST para *E. coli* da Universidade de Warwick, USA (Wirth et al., 2006). Os oligonucleotídeos iniciadores específicos bem como as condições para a amplificação destes genes por meio de PCR estão disponíveis no endereço eletrônico: http://enterobase.warwick.ac.uk/species/ecoli/allele_st_search.

Para o sequenciamento dos produtos amplificados durante a PCR foi utilizado o kit Big Dye Terminator v3.1 (Applied Biosystems, Waltham, USA) em um sequenciador ABI 3100 (Applied Biosystems, Waltham, USA). As sequências foram analisadas pelo pacote de programas Phred/Phrap/Consed (Green, 1996; Ewing e Green, 1998; Gordon et al., 1998).

5. RESULTADOS

5.1 Estabelecimento dos patótipos e detecção de genes associados a virulência (VAGs)

Das 112 amostras coletadas e analisadas, foram obtidos 21 isolados, sendo 20 provenientes de cloaca e 1 da orofaringe, que apresentaram positividade para pelo menos cinco dos genes relacionados à APEC (*cvaC*, *hlyF*, *iss*, *iroN*, *ompT* e *iutA*). Estes mesmos isolados foram submetidos à PCR para a detecção dos genes de virulência adicionais. A frequência desses genes nos isolados de *E. coli* está descrita na Tabela 1.

Tabela 1. Relação da frequência de cada gene associado à virulência (VAGs) nos 21 isolados de *E. coli* potencialmente APEC.

Funções	VAGs	Frequência (%)
Adesinas	<i>fimH</i>	100,0%
	<i>papC</i>	4,8%
	<i>tsh</i>	71,4%
	<i>fyuA</i>	42,8%
	<i>iroN</i>	95,2%
Aquisição de ferro	<i>iucC</i>	61,9%
	<i>iucD</i>	80,9%
	<i>irp2</i>	42,8%
	<i>iutA</i>	85,7%
	<i>sitA</i>	100,0%
Hemolisina	<i>hlyF</i>	100,0%
Resistência sérica	<i>lss</i>	95,2%
	<i>traT</i>	100,0%
Toxinas	<i>astA</i>	9,5 %
	<i>vat</i>	14,3%
Outros	<i>cvaC</i>	90,4%
	<i>ompT</i>	100,0%

5. 2 Tipagem filogenética

A análise filogenética revelou que a maioria dos isolados (33,3%) pertence ao grupo filogenético B1, seguido pelos grupos A (19,0%), D (14,3%), B2 (9,5%), F (9,5%) e C (4,8%), sendo que os isolados 4 e 7 não foram tipados de acordo com esta filogenia (Figura 1). Os isolados dos grupos filogenéticos B2 e F estiveram associados a um maior número de fatores de virulência, exibindo uma média de 14,5 e 13,5 fatores de virulência por isolado, respectivamente (Tabela 2). Na Figura 1 pode-se observar o grupo filogenético de cada isolado.

Tabela 2. Distribuição dos 21 isolados potencialmente APEC em relação ao grupo filogenético e escore de virulência do total de cada grupo.

Grupo filogenético (nº - %)	Média FV/isolado^a
A (4,0 – 19,0%)	11,7
B1 (7,0 – 33,3%)	11,4
B2 (2,0 – 9,5%)	14,5
C (1,0 – 4,8%)	9,0
D (3,0 – 14,3%)	12,0
F (2,0 – 9,5%)	13,5
Não tipáveis (2,0 – 9,5%)	8,0

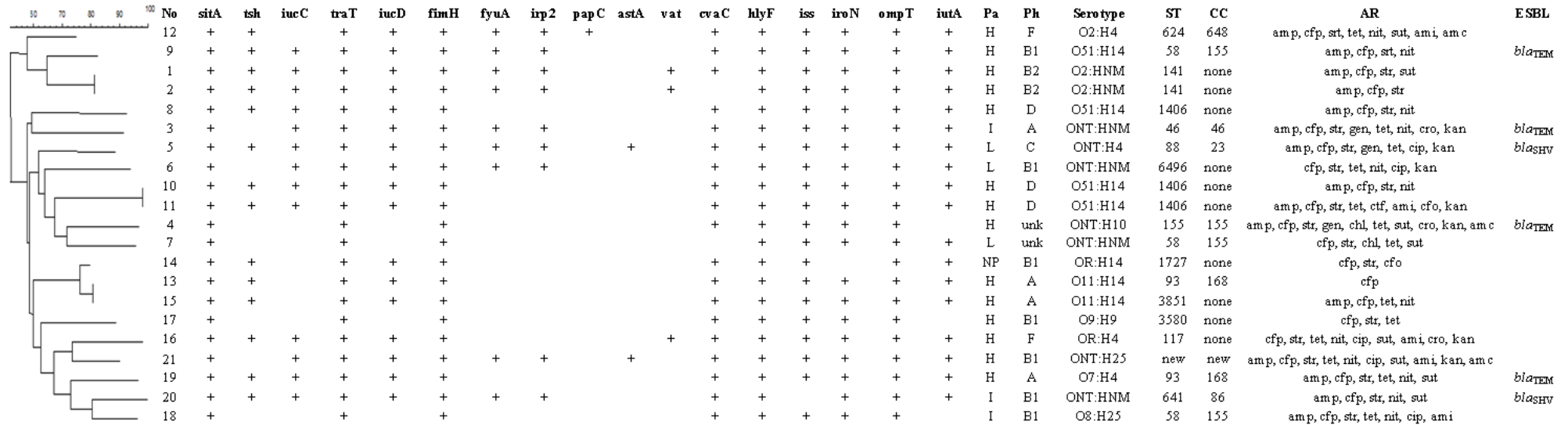


Figura 1. Associação entre a análise da diversidade genética por PFGE e indicadores de virulência dos 21 isolados APEC.
No: número do isolado; **Pa:** Patogenicidade; **Ph:** Filogenia; **Serotype:** Sorotipo; **H:** Alta; **I:** Intermediária; **NP:** Não patogênica; **L:** Baixa; **unk:** Desconhecida; **None:** nenhum; **New:** nova; **ST:** Sequence type; **CC:** complexo clonal; **AR:** Resistência Antimicrobiana; **amp:** ampicilina; **cep:** cefalotina; **str:** estreptomicina; **gen:** gentamicina; **cip:** ciprofloxacina; **chl:** cloranfenicol; **tet:** tetraciclina; **nit:** nitrofurantoina; **sut:** sulfamethoxazol + trimethoprim; **ctf:** ceftiofur; **cro:** ceftriaxona; **ami:** amicacina; **cfo:** cefoxitina; **kan:** canamicina; **amc:** amoxicilina + ácido clavulânico; **nor:** norfloxacina; **fos:** fosfomicina; **ESBL:** genes beta-lactamase de espectro estendido.

5. 3 Teste de suscetibilidade a antimicrobianos

Dos 21 isolados testados, somente um apresentou resistência para apenas um antimicrobiano. Os 20 isolados restantes apresentaram resistência a pelo menos 3 antimicrobianos e a maioria revelou perfil de multirresistência, sendo que 19 isolados apresentaram resistência para três ou mais classes de antimicrobianos, representando um percentual de 90,4%. Os maiores percentuais foram verificados com: cefalotina (100,0%), estreptomicina (90,5%), ampicilina (71,4%) e tetraciclina (61,9%), conforme ilustrado no gráfico 1. Em relação às classes, 42,8% dos isolados foram resistentes a penicilinas, 32,2% a cefalosporinas e 40,5% a aminoglicosídeos.

Genes ESBL foram encontrados nos isolados 3,4,9,19 e 21 (*bla_{TEM}*) e nos isolados 5 e 20 (*bla_{SHV}*).

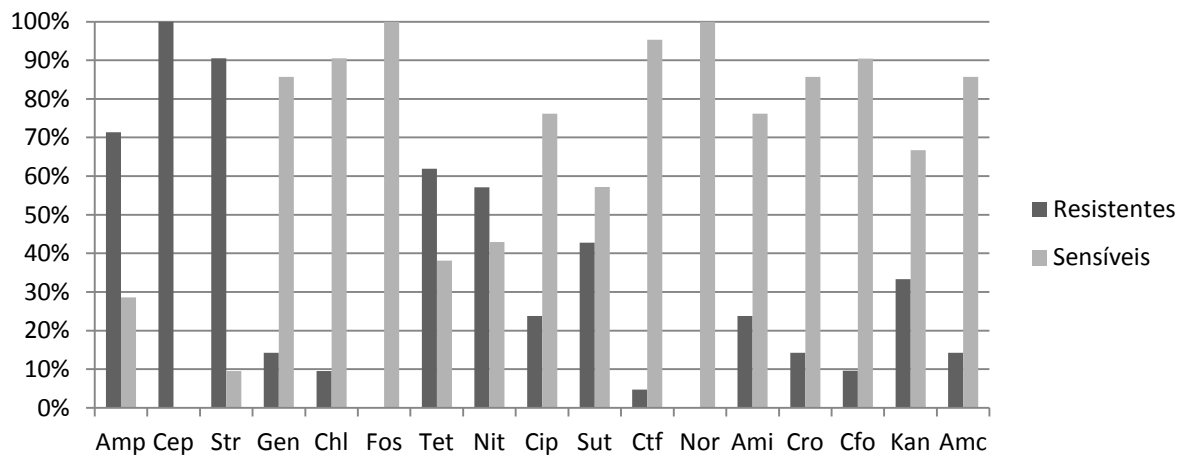


Gráfico 1. Número e porcentagem de resistência dos 21 isolados potencialmente APEC obtidos frente a 17 antimicrobianos utilizados no teste de suscetibilidade. **Amp:** ampicilina; **Cep:** cefalotina; **Str:** estreptomicina; **Gen:** gentamicina; **Cip:** ciprofloxacina; **Chl:** cloranfenicol; **Tet:** tetraciclina; **Nit:** nitrofurantoina; **Sut:** sulfamethoxazol + trimethoprim; **Ctf:** ceftiofur; **Cro:** ceftriaxona; **Ami:** amicacina; **Cfo:** cefoxitina; **Kan:** canamicina; **Amc:** amoxicilina + ácido clavulânico; **Nor:** norfloxacin; **Fos:** fosfomicina.

5. 4 Identificação sorológica

Para a determinação do sorogrupo, das 21 amostras analisadas, 13 foram tipáveis para o antígeno O (61,9%), das quais foram identificáveis 6 sorogrupos: O2 (14,3%), O51(19,0%), O11 (9,5%), O7 (3,2%), O8 (3,2%) e O9 (3,2%). Do restante, 7 (33,3%) não foram tipáveis (ONT) para este antígeno e 2 (9,5%) não puderam ser caracterizadas por serem cepas rugosas (OR).

O antígeno H, não pode ser determinado em 6 amostras (28,5%) por não possuírem flagelos (HNM). Dentre as estirpes analisadas, 16 (76,2%) foram tipáveis dos quais foram identificados 5 antígenos: H4 (28,5%), H14 (23,8%), H25 (9,5%), H9 (3,2%) e H10 (3,2%). Os sorotipos (O:H) de maior prevalência entre as estirpes foram: O51: H14 (19,0%) e não tipáveis ONT:HNM (19,0%). A distribuição das amostras entre os sorotipos está descrita na Figura 1.

5.5 Patogenicidade

O teste revelou 14 (66,6%) estirpes de alta patogenicidade isoladas de galinhas de angola, 3 (14,8%) estirpes de patogenicidade intermediária, 3 (14,8%) estirpes de baixa patogenicidade e uma (4,7%) estirpe não patogênica. A patogenicidade de cada isolado pode ser observada na Figura 1. No decorrer do teste, todas as aves do controle positivo morreram, enquanto as aves do controle negativo permaneceram vivas até o final. Tanto os sinais clínicos quanto as lesões macroscópicas ocorreram com maior incidência entre as aves inoculadas com as estirpes classificadas como de alta e intermediária patogenicidade. Nenhuma das VAGs foi estatisticamente significativa para diferenciar amostras de alta patogenicidade e patogenicidade intermediária de baixa patogenicidade ou ausente no teste Fisher.

5.6 Eletroforese em campo pulsátil (PFGE)

O dendrograma originado após análise revelou 2 grandes *clusters* e 3 subdivisões destes *clusters* (Figura 1). A maioria das amostras apresentou mais de 80,0% de similaridade entre si, porém, os 21 isolados potencialmente APEC geraram 18 pulsotipos diferentes, sendo que destes somente três foram compartilhados: 1 e 2, 10 e 11, 13 e 15.

5.7 Multilocus sequence typing (MLST)

Foram identificadas 16 Sequence types (ST): ST 624, ST 58, ST 141, ST 1406, ST 46, ST 88, ST 6496, ST 155, ST 1727, ST 93, ST 3851, ST 3580, ST 117, ST 83, ST 641 e uma ST nova, correspondente ao isolado 21.

6. DISCUSSÃO

Os mecanismos de virulência de *E. coli* patogênicas para aves (APEC) ainda não são completamente compreendidos e sabe-se que as cepas de APEC possuem diferentes perfis de virulência, relacionados com a espécie animal e a região na qual são obtidos os isolados (Delicato et al, 2003; Rodriguez-Siek et al, 2005; Johnson et al, 2006a; Jin et al., 2008). Vários estudos tentaram definir o patótipo APEC e os autores demonstraram que há genes que ocorrem com mais frequência, sendo alguns mais significativamente associados a cepas altamente patogênicas (Ewers et al, 2004; Johnson et al, 2006a; Johnson et al, 2006b; Johnson et al, 2008). Desta forma, no presente estudo, procurou-se caracterizar geneticamente cepas de *E. coli* isoladas de galinha de angola, considerando que não existem estudos

epidemiológicos sobre zoonoses bacterianas, especificamente a *E. coli*, envolvendo estas aves.

A Fímbria tipo 1 (F1) é um dos mais importantes fatores de virulência de APEC, sendo composta de subunidades proteicas, dentre as quais a menor é codificada pelo gene *fimH*, altamente conservado nestas cepas (Dho-Moulin e Fairbrother, 1999; Vandemaele et al, 2003). Neste estudo, *fimH* esteve presente em todos os isolados, o que revela o grande potencial virulento destas amostras visto que a adesão da bactéria ao epitélio do trato respiratório das aves é o primeiro passo para o estabelecimento da infecção (Dho-Moulin e Fairbrother, 1999).

Outro gene relacionado à adesão é o *tsh*, encontrado em 74,0% dos isolados. Este gene codifica uma proteína com atividade hemaglutinante, sensível à temperatura e sua incidência é muito maior em isolados patogênicos do que nos não patogênicos (DhoMoulin et al.,1997; Ewers et al., 2004). Janßen et al (2001), investigando isolados de aves com colibacilose, se depararam com uma quantidade significativa de cepas abrigando uma combinação deste gene com outros três envolvidos em sistemas para aquisição de ferro (*iucD*, *fyuA* e *irp2*), fato que, segundo eles, tornam estas cepas particularmente patogênicas. Em nossos achados, *iucD* apresentou-se em 80,9% e ambos os genes *fyuA* e *irp2* em 42,8% das amostras potencialmente APEC. Outros genes relacionados à aquisição de ferro foram o *iutA* (85,7%), *iroN* (95,2%) e *sitA* (100%), também mais relacionados a amostras altamente patogênicas (Schouler et al., 2012; Borges et al., 2017).

A sobrevivência do micro-organismo no soro do hospedeiro (resistência sérica) tem um papel muito importante na virulência de cepas APEC e o gene *iss*, detectado em 95,2% dos isolados, é o principal envolvido nesta característica (Johnson et al, 2008). Este gene é o mais distribuído entre isolados patogênicos de *E.coli* de diferentes sorotipos e várias espécies de hospedeiros, sendo um bom indicador de que um isolado possa vir causar doença (Pfaff-McDonough et al, 2000; Delicato et al., 2003; Rodriguez-Siek et al, 2005). Outro gene relacionado à resistência sérica é o *traT* que, de acordo com Rodriguez-Siek et al. (2005), está associado ao gene *cvaC*, relacionado à produção de colicinas. Neste estudo *traT* esteve presente em todos os isolados e *cvaC* em 90,4% destas amostras.

Além destes, outros VAGs importantes para o estabelecimento de infecções por APEC são os genes *ompT* e *hlyF*, ambos presentes em 100% dos isolados. O gene *ompT* codifica a protease OmpT que contribui para a invasão de células endoteliais pelo micro-organismo e está relacionada a meningites neonatais em humanos (Huang et al., 2001; Hejair et al., 2017). Apesar de ainda não ser muito compreendido o papel deste gene na patogenicidade de APEC, Hejair et al. (2017) elucidaram a sua importância demonstrando que estirpes mutantes que não produziam esta protease tiveram sua patogenicidade alterada. Em relação ao *hlyF*, sua ação na patogenia de APEC ainda é pouco conhecida, embora sabe-se que ele codifica uma hemolisina putativa para APEC, que é conhecidamente um importante fator de virulência (Johnson et al., 2008).

Cepas APEC tendem a ser menos toxigênicas em relação às que causam enfermidades em mamíferos (Barnes et al., 2008). Neste trabalho, os genes responsáveis pela produção da toxina termoestável EAST1 (*astA*) e da proteína vacuolizante Vat (*vat*) apareceram em apenas 9,5% e 14,3% das amostras, respectivamente. Apesar da baixa frequência, a presença destes genes é preocupante visto o envolvimento de citotoxinas no aumento da virulência dos isolados (Blanco et al., 1997).

Vários Vags aqui detectadas também foram identificados nos trabalhos de Borges et al (2017), que pesquisaram APEC em pombos, e Maluta et al (2014) que identificaram estes genes em *E. coli* patogênica extra-intestinal (ExPEC) em humanos. Estes achados evidenciam que aves selvagens e domésticas podem constituir fontes de disseminação de *E. coli* patogênica para humanos, demonstrando seu caráter zoonótico (Huja et al., 2015).

Os resultados do teste de patogenicidade demonstraram que a maioria dos isolados é de alta patogenicidade. As estirpes de patogenicidade baixa e intermediária somaram apenas 29,6% das amostras e somente um isolado se caracterizou como não patogênico. O número significativo de isolados de alta patogenicidade em aves aparentemente saudáveis pode ser explicado pelo fato dos VAGs não estarem sendo expressos pois, segundo Won et al (2009), a patogenicidade de APEC é baseada não somente na sua presença mas também na expressão destes VAGs, bem como estar relacionado com o estado do sistema

imune dos hospedeiros pois infecções por APEC são multifatoriais podendo variar conforme interações micro-organismo/hospedeiro e se desenvolver secundariamente devido a outros fatores como condições ambientais e de manejo inadequadas e infecções por outros agentes que possam afetar o sistema imunológico do hospedeiro e/ou lesionar o epitélio respiratório que é sua a porta de entrada (Won et al., 2009; Ferreira e Knöbl, 2000). Vale ressaltar também que existe troca de material genético entre as bactérias, tornando possível a transferência horizontal de genes de micro-organismos patogênicos para os não patogênicos, podendo até mesmo levar ao surgimento de novas estirpes virulentas da microbiota normal, inclusive humana (Fricke et al., 2009).

Um grande número de estirpes de *E. coli* que estão causando infecções em humanos, incluindo as resistentes a antimicrobianos, são de origem animal (Vieira et al., 2011; Johnson et al., 2017). Segundo Mellata et al. (2013), amostras de *E. coli* isoladas de aves são comumente resistentes para mais de um antimicrobiano. Aqui, um total de 95,2% dos isolados exibiu resistência a pelo menos três antimicrobianos, resultado similar a Barros et al (2013). Os maiores percentuais de resistência verificados foram em relação à cefalotina (100%), estreptomicina (90,5%), ampicilina (71,4%) e tetraciclina (61,9%), antibióticos comumente utilizados para tratamento de infecções humanas e de outros animais. Além disso, o fato de alguns isolados serem portadores de genes ESBL é preocupante visto o potencial de transmissão de isolados ESBL entre humanos e outras espécies (Bonnedahl et al., 2009; Ewers et al., 2010; Schmiedel et al., 2014; Falgenhauer et al., 2019).

Em relação à tipagem filogenética, a maioria dos isolados pertence ao grupo B1 e os grupos B2 e F foram associados a um maior número de VAGs. Trabalhos envolvendo o método atualizado por Clermont et al. (2013) ainda são escassos. Logue et al (2017) classificaram novamente isolados APEC de acordo com a nova tipagem filogenética e concluíram que as estirpes classificadas em A e B1 estão relacionadas a um menor potencial patogênico. Neste estudo, três amostras do grupo A foram classificadas como alta patogenicidade e uma como intermediária. A única amostra não patogênica foi classificada como B1, assim como uma amostra de baixa patogenicidade, porém duas amostras de patogenicidade intermediária e três de alta patogenicidade também foram incluídas neste grupo. Assim, podemos inferir

que amostras de baixo e alto potencial patogênico podem compartilhar um mesmo grupo filogenético e que mais estudos acerca deste tema precisam ser realizados a fim de esclarecer de forma mais efetiva a filogenia de isolados APEC.

Cepas envolvidas no aparecimento de colibacilose são frequentemente associadas a três principais sorogrupos: O1, O2 e O78, mas podem ocorrer também O8, O15, O18, O35, O88, O109 e O115 (Gyles e Fairbrother, 2004; Huja et al., 2015). Destes, O2 agrupou 14,3% dos nossos isolados. Schouler et al (2012) encontraram este sorogrupo como um dos mais prevalentes em seus estudos, abrigando principalmente amostras patogênicas. Em nossos achados, todas as amostras de O2 foram classificadas como patogênicas. Em relação ao antígeno H, o sorogrupo H4 foi o mais encontrado e o sorotipo de maior prevalência foi O51: H14.

Os resultados da análise da diversidade genética pela técnica de PFGE revelaram a grande variabilidade intra-específica do conjunto de micro-organismos em questão. Dentre os isolados que partilharam o mesmo pulsotipo, as amostras 1 e 2, provenientes do mesmo animal, não se apresentaram similares geneticamente, porém compartilharam o mesmo fenótipo em relação à resistência antimicrobiana, o mesmo grau de patogenicidade, filogenia, sorotipos, Tipos de Sequencia (ST) e complexo ST. Os isolados 13 e 15, também provenientes do mesmo animal, foram similares em relação ao perfil genotípico estudado, patogenicidade e filogenia, porém se diferenciaram em relação ao Tipo de Sequencia (ST) e complexo ST e à resistência antimicrobiana.

Não há como afirmar se todos os genes relacionados à resistência antimicrobiana estão sendo expressos, o que pode explicar a variabilidade nos resultados. Já as amostras 10 e 11, isoladas de aves diferentes, foram similares em todas as características, se constituindo como possíveis clones bacterianos. Estes resultados podem ser explicados pelo fato destas aves compartilharem o mesmo ambiente sendo muito próximas, facilitando a troca de material genético (Fricke et al., 2009), o que sugere a possibilidade de galinhas de angola de vida livre transmitirem cepas potencialmente APEC/EXPEC para outros animais incluindo seres humanos.

Dos 21 isolados, foram identificadas 16 Tipos de Sequencia (ST), sendo detectada uma nova, correspondente ao isolado 21, a qual diferiu em apenas um

locus (gene *gyrB*) da ST 155. Maluta et al (2014) verificaram que as ST 155, ST 88 e ST 117, encontradas em nosso trabalho, foram compartilhadas entre APEC e ExPEC em humanos no Brasil. As ST 46 e ST 83, associados a humanos e outros animais como cães (Wagner et al, 2014) e gatos (Liu et al, 2015) também foram encontrados neste estudo. também Os isolados 8, 9 e 10 provenientes de diferentes aves, porém habitantes da mesma localidade, compartilharam a mesma ST (1406), sorotipo (O51:H14), grupo filogenético (D), além do mesmo perfil genético e alta patogenicidade. Resultado similar em relação aos isolados 1 e 2, que compartilharam a mesma ST (141), sorotipo (O2:HNM), grupo filogenético (B2), alta patogenicidade e variaram apenas em um gene no perfil genético estudado. Já os isolados 7, 9 e 18 originados de aves diferentes sendo 7 e 9 da mesma localidade, compartilharam da mesma ST 58, porém variaram em todos os outros aspectos analisados. No geral, a análise filogenética por MLST demonstrou que, de fato, APEC se constitui como um grupo heterogêneo, resultado corroborado pelas outras análises realizadas neste estudo.

7. CONCLUSÕES

- A diversidade de combinações de fatores que podem levar uma cepa de *E. coli* a ser virulenta e resistente a antimicrobianos revela a grande importância de estudos sobre o potencial zoonótico de APEC;
- Os resultados deste trabalho demonstraram que este subpatótipo se constitui como um grupo heterogêneo de micro-organismos e que as galinhas de angola são reservatórios naturais de APEC com elevado potencial patogênico e multirresistentes a antimicrobianos;
- Visto que a bactéria pode ser eliminada pela via respiratória e principalmente pelas fezes de galinhas de angola, estas aves podem se constituir como fontes de infecção de ExPEC para outros animais que têm contato próximo com essas aves, incluindo os seres humanos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aarestrup FM (2005) Veterinary Drug Usage and Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal Origin. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology** 96, 271–281.

ABPA (Associação Brasileira de Proteína Animal). Relatório Anual, 2018. Disponível em: <ubabef.com.br>. Acesso em: 29 abril de 2018.

Adzitey F, Teye GA, Anachinaba IA (2015) Microbial Quality of Fresh and Smoked Guinea Fowl Meat Sold in the Bolgatanga Municipality, Ghana. **Asian Journal of Poultry Science** 9 (3): 165-17.

Asai T, Masani K, Sato C, Hiki M, Usui M, Baba K, Ozawa M, Harada K, Aoki H, Sawada T (2011) Phylogenetic groups and cephalosporin resistance genes of *Escherichia coli* from diseased food-producing animals in Japan. **Acta Veterinaria Scandinavica** 53:52.

Barbieri NL, De Oliveira AL, Tejkowski TM, Pavanelo DB, Rocha DA, Matter LB, Callegari-Jacques SM, De Brito BG, Horn F (2013) Genotypes and pathogenicity of cellulitis isolates reveal traits that modulate APEC virulence. **Plos One** 8: e72322.

Barcelos AS (2005) **Avaliação macroscópica, histopatológica e bacteriológica de fígados de frangos (*Gallus gallus*) condenados no abate pela inspeção sanitária**. 83 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

Barnes HJ, Nolan LK, Vaillancourt J (2008) Colibacillosis. In: Saif YM, Fadly AM, Glisson JR, Mcdougald LR, Nolan LK, Swayne DE (Eds). **Diseases of poultry**. Iowa: Iowa State University Press, 12 ed, p. 691-738.

Barrett TJ, Lior H, Green JH, Khakhria R, Wells JG, Bell BP, Greene KD, Lewis J, Griffin PM (1994) Laboratory investigation of a multistate food-borne outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 by using pulsed-field gel electrophoresis and phage typing. **Journal of Clinical Microbiology** 32:3013-3017.

Barros LSS, Silva RM, Silva IM, Baliza MD, Virgílio FF (2013) *Escherichia coli* from cellulitis lesions in broilers. **Journal of Food Measurement and Characterization** 7:40-45.

Bélangier L, Garenaux A, Harel J, Boulianne M, Nadeau E, Dozois CM (2011) *Escherichia coli* from animal reservoirs as a potential source of human extraintestinal pathogenic *E. coli*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology** 62:1–10.

Bhogoju S, Nahashon S, Wang X, KilonzoNthenge A (2018) A comparative analysis of microbial profile of Guinea fowl and chicken using metagenomic approach. **PLoS ONE** 13(3): e0191029.

Blanco JE, Blanco M, Mora A, Blanco J (1997) Production of Toxins (Enterotoxins, Verotoxins, and Necrotoxins) and Colicins by *Escherichia coli* Strains Isolated from Septicemic and Healthy Chickens: Relationship with In Vivo Pathogenicity. **Journal of Clinical Microbiology** 35(11): 2953–2957.

Blount ZD (2015) The unexhausted potential of *E. coli*. **eLife** 4:e05826

Bonnedahl J, Drobni M, Gauthier-Clerc M, Hernandez J, Granholm S, Kayser Y, Melhus A, Kahlmeter G, Waldenstrom J, Johansson A, Olsen B (2009) Dissemination of *Escherichia coli* with CTX-M Type ESBL between Humans and Yellow-Legged Gulls in the South of France. **PLoS ONE** 4: e5958.

Borges CA, Maluta RP, Beraldo LG, Cardozo MV, Guastalli EAL, Kariyawasam S, DebRoy C, Ávila FA (2017) Captive and free-living urban pigeons (*Columba livia*) from Brazil as carriers of multidrug-resistant pathogenic *Escherichia coli*. **Veterinary Journal** 219:65-67.

Bortolaia V, Guardabassi L, Trevisani M, Bisgaard M, Venturi L, Bojesen AM (2010) High diversity of extended-spectrum betalactamases in *Escherichia coli* isolates from Italian broiler flocks. **Antimicrobial Agents Chemotherapy** 54:1623–1626.

Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E (2000) Rapid and Simple Determination of *Escherichia coli* Phylogenetic Group. **Applied and Environmental Microbiology** 66:4555 – 4558.

Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E (2000) Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. **Applied and Environmental Microbiology** 66: 4555-4558.

Clermont O, Christenson JK, Denamur E, Gordon, DM (2013) The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. **Environmental Microbiology Report** 5:58–65.

Clinical and Laboratory Standards Institute CLSI (2015). Performance standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; 364 Approved Standard - Twelfth Edition. Clinical and Laboratory Standards Institute. 365 Wayne, PA.

Cooke EM (1985) *Escherichia coli* - an overview. **Journal of Hygiene** 95:523-530.

Cunha MPV, Menão MC, Ferreira AJP, Knobl T (2013) A similaridade genética de *Escherichia coli* patogênica para aves (APEC) com estirpes humanas e a resistência antimicrobiana justificam a preocupação sanitária em relação aos produtos de origem aviária? **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP** 11:24-33.

Cunha MPV, Silva KS, Lincopan N, Moreno AM, Knobl T (2015) Caracterização de APEC (Avian Pathogenic *Escherichia coli*) multivirulentas e multirresistentes. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP** 13:35-37.

Delicato ER, Brito BG, Gaziri LC, Vidotto MC (2003) Virulence-associated genes in *Escherichia coli* isolates from poultry with colibacillosis. **Veterinary Microbiology** 94:97-103.

Dho-Moulin M, Fairbrother JM (1999) Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). **Veterinary Research** 30, 299-316.

Dierikx C, Goot J, Fabri T, Zandbergen AE, Smith H, Mevius D (2013) Extended-spectrum- β -lactamase- and AmpC- β -lactamase-producing *Escherichia coli* in Dutch broilers and broiler farmers. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** 68:60–67.

Dutil L, Irwin R, Finley R, Ng LK, Avery B, Boerlin P, Bourgault AM, Cole L, Daignault D, Desruisseau A, Demczuk W, Hoang L, Horsman GB, Ismail J, Jamieson F, Maki A, Pacagnella A, Pillai DR (2010) Ceftiofur resistance in *Salmonella enterica* serovar Heidelberg from chicken meat and humans, Canada. *Emerging Infectious Diseases* 16:48–54.

Dziva F, Stevens M (2008) Colibacillosis in poultry: unravelling the molecular basis of virulence of avian pathogenic *Escherichia coli* in their natural hosts. **Avian Pathology** 37:355-366.

Edwards PR, Ewing's WH (1986) The genus *Escherichia*. In:-----, **Edwards and Ewing's identification of enterobacteriaceae**. 4ed. Nova Iorque: Elsevier Science Publishing 6:93-134.

Essack SY, Hall LM, Pillay DG, Mcfadyen ML, Livermore DM (2001) Complexity and diversity of *Klebsiella pneumoniae* strains with extended-spectrum β -lactamases isolated in 1994 and 1996 at a teaching hospital in Durban, South Africa. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 45:88-95.

Ewers C, Jansen T, Kiessling S, Philip HC, Wieler LH (2004) Molecular epidemiology of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from colisepticemia in poultry. **Veterinary Microbiology** 104(1-2):91-101.

Ewing B, Green P (1998) Basecalling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Research** 8:186-194.

Fabichak I. Criação de galinha d'angola. São Paulo: Nobel. 48p. 1997.

Falgenhauer L, Imirzalioglu C, Oppong K, Akenten CW, Hogan B, Krumkamp R, Poppert S, Levermann V, Schwengers O, Sarpong N, Owusu-Dabo E, May J, Eibach D (2019) Detection and Characterization of ESBL-Producing *Escherichia coli* From Humans and Poultry in Ghana. **Frontiers in Microbiology** 9:3358.

Ferreira, AJP, Knöbl T (2000). Colibacilose aviária. In: Berchieri Junior A, Macari M (Eds). **Doença das aves**. Campinas: Facta, p. 197-207.

Fricke WF, McDermott PF, Mammel MK, Zhao S, Johnson TJ, Rasko DA, Fedorka-Cray PJ, Pedroso A, Whichard JM, Leclerc JE, White DG, Cebula TA, Ravel J (2009) Antimicrobial resistance-conferring plasmids with similarity to virulence plasmids from avian pathogenic *Escherichia coli* strains in *Salmonella enterica* serovar Kentucky isolates from poultry. **Applied Environmental Microbiology** 75(18):5963-71.

Gordon D, Abajian C, Green P (1998) Consed: a graphical tool for sequence finishing. **Genome Research** 8:195-202.

Green P. PHRAD documentation (1996). Disponível em: <http://bozeman.mbt.washington.edu/phrap.docs/phrap.html>.

Guastalli EAL, Guastalli BHL, Soares NM, Leite DS, Ikuno AA, Maluta RP, Cardozo MV, Beraldo LG, Borges CA, Avila FA (2013) Virulence characteristics of *Escherichia coli* isolates obtained from commercial one-week-old layer chicks with diarrhea. **African Journal of Microbiology Research**. 7:5306-5313.

Guenther S, Ewers C, Wieler LH (2011) Extended-spectrum betalactamases producing *E. coli* in wildlife, yet another form of environmental pollution? **Frontiers in Microbiology** 2:1–13.

Gyles CL, Fairbrother JM (2004) *Escherichia coli*. In Gyles CL, Prescott JF, Songer G, Thoen CO (Eds.) **Pathogenesis of bacterial infections in animals**. 3 ed. New York: Wiley-Blackwell.

Hejair HMA, Zhu Y, Ma J, Zhang Y, Pan Z, Zhang W, Yao H (2017) Functional role of ompF and ompC porins in pathogenesis of avian *Escherichia coli*. **Microbial Pathogens** 107:29-37.

Horn F, Correa AMR, Barbieri NL, Glodde S, Weyrauch KD, Kaspers B, Driemeier D, Ewers C, Wieler LH (2012) Infections with Avian Pathogenic and Fecal *Escherichia coli* Strains Display Similar Lung Histopathology and Macrophage Apoptosis. **Plos One** 7(7):11.

Huang SH, Wan ZS, Chen HM, Jong AY (2001) 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, p. 54.

Huja S, Oren Y, Trost E, Brzuszkiewicz E, Biran D, Blom J, Goesmann A, Gottschalk G, Hacker J, Ron EZ, Dobrindt U (2015) Genomic Avenue to Avian Colisepticemia. **mBio** 6(1):e01681-14.

Hughes D (2014) Selection and Evolution of Resistance to Antimicrobial Drugs. **International Union of Biochemistry and Molecular Biology** 66(8): 521–529.

Jakobsen L, Kurbasic A, Skjot-Rasmussen L, Ejrnæs K, Porsbo LJ, Pedersen K, Jensen LB, Emborg H, Agerso Y, Olsen KEP, Aarestrup FM, Frimodt-Møller N, Hammerum AM (2010) *Escherichia coli* Isolates from Broiler Chicken Meat, Broiler Chickens, Pork, and Pigs Share Phylogroups and Antimicrobial Resistance with Community-Dwelling Humans and Patients with Urinary Tract Infection. **Foodborne Pathogens and Disease** 7:5.

Janßen T, Schwarz C, Preikschat P, Voss M, Philipp HC, Wieler LH (2001) Virulence associated genes in avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from internal organs of poultry having died from colibacillosis. **International Journal of Medical Microbiology** 291:371-378.

Jin W, Zheng Z, Zhang Y, Qin A, Shao H, Liu Y, Wang J, Wang Q (2008) Distribution of Virulence-Associated Genes of Avian Pathogenic *Escherichia coli* Isolates in China. **Agricultural Sciences in China** 7(12): 1511-1515.

Johnson JR, Johnston B, Clabots CR, Kuskowski M A, Roberts E, Debrouy C (2008) Virulence genotypes and phylogenetic background of *Escherichia coli* serogroup O6 isolates from humans, dogs and cats. **Journal of Clinical Microbiology** 46:417-422.

Johnson JR, Porter SB, Johnston B, ThurasP, Clock S, Crupain M, Rangan U (2017) Extraintestinal Pathogenic and Antimicrobial-Resistant *Escherichia coli*, Including Sequence Type 131 (ST131), from Retail Chicken Breasts in the United States in 2013. **Applied Environmental Microbiology** 83:e02956-16.

Johnson TJ, Johnson SJ, Nolan LK (2006a) Complete DNA sequence of a ColBM plasmid from avian pathogenic *Escherichia coli* suggests that it evolved from closely related ColV virulence plasmids. **Journal of Bacteriology** 188:5975-5983.

Johnson TJ, Kariyawasam S, Wannemuehler Y, Mangiamele P, Johnson SJ, Doetkott C, Skyberg JA, Lynne AM, Johnson JR, Nolan LK (2007) 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** 189:3228-3236.

Johnson TJ e Russo TA (2002) Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: “The other bad *E coli*”. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine** 139(3):155-162.

Johnson TJ, Siek KE, Johnson SJ, Nolan LK (2006b) DNA Sequence of a ColV Plasmid and Prevalence of Selected Plasmid-Encoded Virulence Genes among Avian *Escherichia coli* Strains. **Journal of Bacteriology** 188 (2):745–758.

Kawano M, Yaguchi K, Osawa R (2006) Genotypic analyses of *Escherichia coli* isolated from chickens with colibacillosis and apparently healthy chickens in Japan. **Microbiology and immunology** 50(12): 961-966.

Kemmett K, Humphrey T, Rushton S, Close A, Wigley P, Williams NJ (2013). 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** 8:e67749.

Klemm P, Hancock V, Schembri MA (2010) Fimbrial adhesins from extraintestinal *Escherichia coli*. **Environmental Microbiology Reports** 2(5):628-640.

Kilonzo-Nthenge A, Nahashon SN, Chen F, Adefope N (2008) Prevalence and Antimicrobial Resistance of Pathogenic Bacteria in Chicken and Guinea Fowl. **Poultry Science** 87(9):1841-8.

Köhler CD, Dobrindt U (2011) What defines extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*? **International Journal of Medical Microbiology** 301:642-647.

LeStrange K, Marklanda SM, Hoovera DG, Sharmab M, Knie KE (2017) An evaluation of the virulence and adherence properties of avian pathogenic *Escherichia coli*. **One Health** 4:22-26.

Ling J, Pan H, Gao Q, Xiong L, Zhou Y, Zhang D, Gao S, Liu X (2013) Aerobactin Synthesis Genes *iucA* and *iucC* Contribute to the Pathogenicity of Avian Pathogenic *Escherichia coli* O2 Strain E058. **PlosONE** 2: e57794.

Liu X, Thungrat K, Boothe DM (2015) Multilocus Sequence Typing and Virulence Profiles in Uropathogenic *Escherichia coli* Isolated from Cats in the United States. **PLoS One**. 10(11): e0143335.

Logue CM, Wannemuehler Y, Nicholson BA, Doetkott C, Barbieri NL, Nolan LK (2017) Comparative Analysis of Phylogenetic Assignment of Human and Avian ExPEC and Fecal Commensal *Escherichia coli* Using the (Previous and Revised) Clermont Phylogenetic Typing Methods and its Impact on Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC) Classification. **Frontiers in Microbiology** 23, 8:283.

Lloubes R, Bernadac A, Houot L, Pommier S (2013) Non classical secretion systems. **Research in Microbiology** 164:655-663.

Mallmann AJ, Szepaniuck AM, Stertz E, Marmitt LA (2001) Controle da broca da erva-mate através da galinha-d'Angola. **Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável** 2:13-17.

Maluta RP, Logue CM, Casas MRT, Meng T, Guastalli EAL, Rojas TCG, Montelli AC, Sadatsune T, Carvalho MR, Nolan LK, Silveira WD (2014) Overlapped Sequence Types (STs) and Serogroups of Avian Pathogenic (APEC) and Human Extra-Intestinal Pathogenic (ExPEC) *Escherichia coli* Isolated in Brazil. **PLoS ONE** 9:e105016.

Mellata, M (2013). Human and avian extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: infections, zoonotic risks, and antibiotic resistance trends. **Foodborne Pathogens Diseases** 2013; 10:916-932.

Menão MC, Ferreira CSA, Castro AGM, Knöbl T, Ferreira AJP (2002) Sorogrupos de *Escherichia coli* isolados de frangos com doença respiratória crônica. **Arquivos do Instituto Biológico** 69, 15-17.

Mendonça N, Figueiredo R, Mendes C, Card RM, Anjum MF, Silva GJ (2016) Microarray Evaluation of Antimicrobial Resistance and Virulence of *Escherichia coli* Isolates from Portuguese Poultry. **Antibiotics** 5(4).

Menezes RC, Mattos Júnior DG, Tortelly R (2001) Freqüência e patologia das infecções causadas por nematóides e cestóides em galinhas-d'angola (*Numida meleagris* Linnaeus, 1758) criadas extensivamente no estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias** 8:35-39.

Mitchell NM, Johnson JR, Johnston B, Curtiss III R, Mellata M. Zoonotic Potential of *Escherichia coli* Isolates from Retail Chicken Meat Products and Eggs (2015) **Applied Environmental Microbiology** 81(3).

Monroy MAR, Knöbl T, Bottino JA, Ferreira CSA, Ferreira AJP (2005) Virulence characteristics of *Escherichia coli* isolates obtained from broiler breeders with salpingitis. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases** 28, 1-15.

Moulin-Schouleur M, Répérant M, Laurent S, Brée A, Mignon-Grasteau S, Germon P, Rasschaert D, Schouler C (2007) Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains of avian and human origin: link between phylogenetic relationships and common virulence patterns. **Journal of Clinical Microbiology** 45, 3366-3376.

Nakazato G, Campos TA, Stehling GE, Brocchi M, Silveira WD (2009) Virulence factors of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). **Pesquisa Veterinária Brasileira** 29, 479-486.

Nolan LK, Horne SM, Giddings CW, Foley SL, Johnson TJ, Lynne AM, Skyberg J (2003) Resistance to serum complement, iss and virulence of avian *Escherichia coli*. **Veterinary Research Communications** 27:101-110.

Oh K, Kim D, Jung, SE, Cho S (2014) Molecular characterization of enterotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated from diarrheal patients in Korea during 2003–2011. **Plos One** 9:5.

Orskov F, Orskov I (1992) *Escherichia coli* serotyping and disease in man and animals. **Canadian Journal of Microbiology** 38(7): 699-704,

Parreira VR, Gyles CL (2003) A novel pathogenicity island integrated adjacent to the thrW tRNA gene of avian pathogenic *Escherichia coli* encodes a vacuolating auto transporter toxin. **Infection and Immunity** 71:5087-5096.

Pfaff-McDonough SJ, Horne SM, Giddings CW, Ebert JO, Doetkott C, Smith MH, Nolan LK (2000) Complement resistance-related traits among *Escherichia coli* isolates from apparently healthy birds and birds with colibacillosis. **Avian Diseases** 44:23-33.

Ribot EM, Fair MA, Gautom R, Cameron DN, Hunter SB, Swaminathan B, Barrett TJ. Standardization of Pulsed-Field Gel Electrophoresis Protocols for the Subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, Salmonella, and Shigella for PulseNet (2006). **Foodborne Pathogens Diseases** 3:59-67.

Robins-Browne RM, Holt KE, Ingle DJ, Hocking DM, Iang J, Tauscheck M (2016) Are *Escherichia coli* Pathotypes Still Relevant in the era of Whole-Genome Sequencing? **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology** 6:141.

Rocha ACGP da, Silva AB da, Brito BG, Moraes HLS, Pontes AP, Cé MC, Nascimento VP, Salle CTP (2002) Virulence factors of avian pathogenic *Escherichia coli* isolated from broilers from the south of Brazil. **Avian Diseases** 46:749-753.

Rocha ACGP da, Rocha SLS, Lima-Rosa CAV, Souza GF, Moraes HLS, Salle FO, Moraes LB, Salle CTP (2008) Genes associated with pathogenicity of avian *Escherichia coli* (APEC) isolated from respiratory cases of poultry. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 28:183-186.

Rocha SLS (2017) **Classificação de *Escherichia coli* patogênica aviária (APEC) e de *Escherichia coli* uropatogênica (UPEC) em grupos filogenéticos e**

associação com a patogenicidade. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias), Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Rodriguez-Siek KE, Giddings CW, Doetkott C, Johnson TJ, Nolan LK (2005) Characterizing the APEC pathotype. **Veterinary Research** 36:241-256.

Russo TA e Johnson JR (2000) Proposal for a New Inclusive Designation for Extraintestinal Pathogenic Isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. **The Journal of Infectious Diseases** 181:1753–1754.

Saladin M, Cao VTB, Lambert T, Donay JL, Herrmann JL, Ouldhocine Z, Verdet C, Delisle F, Philippon A, Arlet G (2002) Diversity of CTX-M β -lactamases and their promoter regions from Enterobacteriaceae isolated in three Parisian hospitals. **FEMS Microbiology Letters** 209:161-168.

Schmiedel J, Falgenhauer L, Domann E, Bauerfeind R, Prenger-Berninghoff E, Imirzalioglu C, Chakraborty T (2014) Multiresistant extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae from humans, companion animals and horses in central Hesse, Germany. **BMC Microbiology** 14:187.

Schouler C, Schaeffer B, Brée A, Mora A, Dahbi G, Biet F, Oswald E, Mainil J, Blanco J, Moulin-Schouleur M (2012) Diagnostic strategy for identifying avian pathogenic *Escherichia coli* based on four patterns of virulence genes. **Journal of Clinical Microbiology** 50:1673-1678.

Stürenburg E e Mack D (2003) Extended-spectrum β -lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory, therapy, and infection control. **Journal of Infection** 4:273-295.

Targino, LC (2015) **Viabilidade e Oportunidade de Mercado na Criação de Galinhas da Angola (*Numida melagris galeata*).** Dissertação (Sistemas Agroindustriais). Universidade Federal de Campina Grande.

Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray, BE, Persing DH, Swaminathan B (1995) Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for Bacterial Strain Typing. **Journal of Clinical Microbiology** 33(9): 2233–2239

Tivendale KA, Logue CM, Kariyawasam S, Jordan D, Hussein A, Li G, Wannemuehler Y, Nolan LK (2010) Avian-pathogenic *Escherichia coli* strains are similar to neonatal meningitis *E. coli* strains and are able to cause meningitis in the rat model of human disease (2010) **Infection and Immunity** 78:3412-3419.

Tortora GJ, Funke BR, Case CL. **Microbiologia**. 10 ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

Vandermaele F, anderchove D, Vereecken M, Derijcke J, Dho-Moulin H, Goddeeris BM (2003) Sequence analysis demonstrates the conservation of fimH and variability of fimA throughout Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC). **Veterinary Research** 34: 153–163.

Vieira AR, Collignon P, Aarestrup FM, McEwen SA, Hendriksen RS, Hald T, Wegener HC (2011) Association between antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolates from food animals and blood stream isolates from humans in Europe: an ecological study. **Foodborne Pathogens Diseases** 8(12):1295-301.

Vila J, Saez-López E, Johnson JR, Romling U, Dobrindt U, Cantón R, Giske CG, Naas T, Carattoli A, Martínez-Medina M, Bosch J, Retamar P, Rodríguez-Bano J, Baquero F, Soto SM (2016) *Escherichia coli*: an old friend with new tidings. **FEMS Microbiology Reviews** 40:437–463.

Wagner S, Gally DL, Argyle SA (2014) Multidrug-resistant *Escherichia coli* from canine urinary tract infections tend to have commensal phylotypes, lower prevalence of virulence determinants and ampC-replicons. **Veterinary Microbiology**. 169(3-4):171–178.

Wirth T, Falush D, Lan R, Colles F, Mensa P, Wieler LH, Karch H, Reeves PR, Maiden M C, Ochman H, Achtman M (2006) Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. **Molecular Microbiology** 60:1136–1151.

Won G, Moon B, Oh I, Matsuda K, Chaudhari AA, Hur J, Eo S, Yu I, Lee Y, Lee Y, Kim B, Lee JH (2009) Profiles of virulence-associated of avian pathogenic *Escherichia coli* isolates from chickens with colibacillosis. **Poultry Science** 46:260-266.

World Health Organization (WHO) (2014). Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance. Switzerland. Disponível em: <<https://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/>>. Acesso em: 21 de junho de 2019.

Zhao L, Gao S, Huan H, Xu X, Zhu X, Yang W, Gao Q, Liu X (2009) 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** 155:1634–1644.