

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

**DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE *Escherichia coli*
PATOGENICA PARA AVES (APEC) EM CRIAÇÕES DE
GALINHAS DE FUNDO DE QUINTAL**

**Elisabete Schirato de Oliveira
Bióloga**

2016

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

**DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE *Escherichia coli*
PATOGÊNICA PARA AVES (APEC) EM CRIAÇÕES DE
GALINHAS DE FUNDO DE QUINTAL**

Elisabete Schirato de Oliveira

Orientador: Prof. Dr. Fernando Antonio de Ávila

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

2016

O48d Oliveira, Elisabete Schirato de
Detecção e caracterização de *Escherichia coli* patogênica para aves (APEC) em criações de galinhas de fundo de quintal / Elisabete Schirato de Oliveira. -- Jaboticabal, 2016
ix, 72 p. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2016
Orientador: Fernando Antônio de Ávila
Banca examinadora: Caroline Peters Pigatto de Nardi, Patrícia Amoroso, Hélio José Montassier, José Moacir Marin
Bibliografia

1. ExPEC. 2. Multirresistência. 3. Patogenicidade. 4. Potencial zoonótico. 5. Virulência. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 576.8:636.5

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* PATOGÊNICA
PARA AVES (APEC) EM CRIAÇÕES DE GALINHAS DE FUNDO DE
QUINTAL

AUTORA: ELISABETE SCHIRATO DE OLIVEIRA

ORIENTADOR: FERNANDO ANTONIO DE ÁVILA

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



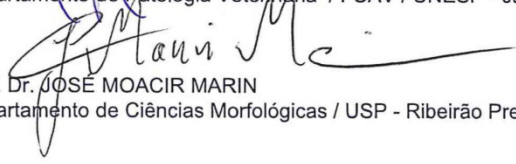
Profa. Dra. CAROLINE PETERS PIGATTO DE NARDI
Instituto Federal de São Paulo / Matão, SP



Profa. Dra. PATRÍCIA AMOROSO DE ANDRADE
Fundação Educacional de Barretos / Barretos, SP



Prof. Dr. HÉLIO JOSÉ MONTASSIER
Departamento de Patologia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Prof. Dr. JOSÉ MOACIR MARIN
Departamento de Ciências Morfológicas / USP - Ribeirão Preto, SP

Jaboticabal, 15 de dezembro de 2016.

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

ELISABETE SCHIRATO DE OLIVEIRA – nascida em Franca – SP, no dia 20 de junho de 1985, filha de Aparecida Helena Schirato e Heleno Engrácio de Oliveira. Graduiu-se em Ciências Biológicas (modalidade Bacharel) pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista (FCAV – UNESP), em dezembro de 2010. Em março de 2011, iniciou o curso de mestrado no Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agropecuária na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista (FCAV – UNESP), com bolsa da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), concluindo em fevereiro de 2013. Em março de 2013 iniciou o curso de doutorado no mesmo programa, com bolsa FAPESP (processo 2013/18279-1) e a obtenção do título foi em dezembro de 2016. E-mail: elisaschirato@yahoo.com.br

O dinheiro faz homens ricos, o
conhecimento faz homens sábios
e a humildade faz grandes
homens.

(Mahatma Gandhi)

*Dedico este trabalho à
minha amada mãe por todo
incentivo, apoio e carinho....*

Agradecimentos

Em primeiro lugar agradeço ao meu Deus que sempre está comigo me dando força e coragem para enfrentar as dificuldades encontradas em nossas vidas.

Em especial aos meus pais Aparecida Helena Schirato e Heleno Engrácio de Oliveira que sempre me deram força e coragem e são a razão de eu estar aqui hoje e ser o que eu sou e me apóiam sempre que preciso.

Ao professor e orientador Dr. Fernando Antonio de Ávila, pelos sábios ensinamentos, confiança, incentivo, amizade e oportunidade, a qual sou muito grata!

As grandes amigas, Camila Figueiredo (Bino!), Mariana Monezi, Marita Vedovelli e Caren Pavani (Queridinha!), pela amizade, companheirismo, apoio, paciência, aprendizagem e por serem excelentes companhias em todos os momentos.

Ao técnico e grande amigo João Quintana (*in memoriam*), pelo apoio, conselhos e amizade...saudades eternas!

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo suporte financeiro de todo projeto, incluindo minha bolsa de doutorado.

As galinhas e aos seus proprietários que contribuíram para a realização deste trabalho.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a execução deste trabalho e que não foram citados aqui...

Muito obrigada!!!

SUMÁRIO


	Página
CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	iii
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	iv
LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUÇÃO	8
2. REVISÃO DE LITERATURA	10
2.1 Criação de galinhas de fundo de quintal.....	10
2.2 <i>Escherichia coli</i>	11
2.3 <i>Escherichia coli</i> patogênica para aves (APEC) e a colibacilose	13
2.4 Fatores de virulência em APEC.....	15
2.4.1 Adesinas	16
2.4.2 Aquisição de ferro	17
2.4.3 Colicinas.....	17
2.4.4 Resistência sérica.....	18
2.4.5 Toxinas.....	19
2.5 Resistência antimicrobiana em APEC	19
2.6 Potencial zoonótico de APEC.....	20
3. OBJETIVOS	22
3.1 Objetivo geral.....	22
3.2 Objetivos específicos.....	22
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
4.1 População analisada e coleta das amostras.....	23
4.2 Extração de DNA	24
4.3 PCR para o estabelecimento dos patótipos de isolados de <i>E.coli</i>	25
4.4 Detecção de genes de virulência adicionais para APEC	26

4.5	Tipagem filogenética.....	28
4.6	Teste de suscetibilidade a antimicrobianos	29
4.7	Eletroforese em campo pulsátil (PFGE).....	29
4.8	Identificação sorológica	30
4.9	Teste de patogenicidade em pintainhos de um dia.....	30
5.	RESULTADOS	32
5.1	Estabelecimento dos patótipos	32
5.2	Detecção de genes de virulência adicionais	36
5.3	Tipagem filogenética.....	36
5.4	Teste de suscetibilidade a antimicrobianos	37
5.5	Identificação sorológica	39
5.6	Teste de patogenicidade em pintainhos de um dia.....	40
5.7	Eletroforese em campo pulsátil (PFGE).....	41
6.	DISCUSSÃO	43
7.	CONCLUSÕES	56
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**unesp**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal**CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS****CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo nº 05749/14 do trabalho de pesquisa intitulado "**Detecção e caracterização de *Escherichia coli* patogênica para aves (APEC) em galinhas de criatórios de fundo de quintal na região de Ribeirão Preto - SP**", sob a responsabilidade do Prof. Dr. Fernando Antonio de Ávila está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 02 de abril de 2014.

Jaboticabal, 02 de abril de 2014.


Prof.ª Dr.ª Paola Castro Moraes
Coordenadora - CEUA

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- AFEC - *Escherichia coli* isolada de fezes de aves saudáveis
- APEC - *Escherichia coli* patogênica para aves
- BHI - Infusão de cérebro e coração
- CLSI - “Clinical and Laboratory Standards Institute”
- Col - Colicina
- DAEC - *Escherichia coli* de aderência difusa
- EAEC - *Escherichia coli* enteroagregativa
- EAST1 - *Escherichia coli* enteroagregativa endotoxina termo estável tipo 1
- EcL - “Reference Laboratory for *Escherichia coli*” da Universidade de Montreal
- ECRC - “*E. coli* Reference Center” da Universidade da Pensilvânia
- EIEC - *Escherichia coli* enteroinvasiva
- EPEC - *Escherichia coli* enteropatogênica
- ETEC - *Escherichia coli* enterotoxigênica
- ExPEC - *Escherichia coli* patogênica extraintestinal
- FUTI - Infecção urinária adquirida de fonte alimentar
- GFQ - Galinhas de fundo de quintal
- InPEC - *Escherichia coli* patogênica intestinal
- ITU - Infecção do trato urinário
- MAPA - Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento
- mL - Mililitro
- mM - Milimolar
- NMEC - *Escherichia coli* associada a meningite neo-natal
- NT - Não tipável
- PAI - Ilha de patogenicidade
- pb - Pares de base
- PBS - Salina tamponada com fosfato
- PCR - Reação em cadeia da polimerase
- PFGE - Eletroforese em campo pulsátil
- rpm - Rotações por minuto
- STEC - *Escherichia coli* produtora da toxina Shiga

T_m - Temperatura de melting

UFC - Unidade formadora de colônias

UPEC - *Escherichia coli* uropatogênica

UPGMA - "Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean"

V - Volt

μL - Microlitro

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Distribuição das amostras coletadas de GFQ em 7 propriedades diferentes da região de Ribeirão Preto-SP.....	24
Tabela 2. Iniciadores utilizados para amplificação dos genes em isolados de <i>E. coli</i> , condições das reações e amostras controle.	27
Tabela 3. Genes relacionados à virulência, tipagem filogenética, índice de patogenicidade e sorogrupos em cada isolado potencialmente APEC obtidos de GFQ.	33
Tabela 4. Distribuição dos 69 isolados potencialmente APEC obtidos de GFQ em relação ao grupo filogenético.	37
Tabela 5. Número e porcentagem de resistência dos 69 isolados potencialmente APEC obtidos de amostras de GFQ frente a 17 antimicrobianos utilizados no teste de suscetibilidade.....	38
Tabela 6. Número e frequência dos sorogrupos nos 69 isolados potencialmente APEC obtidos de GFQ.	40

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Coleta de amostras de GFQ em pequenas propriedades da região de Ribeirão Preto – SP.....	24
Figura 2. Árvore dicotômica para determinar o grupo filogenético de cepas 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.	28
Figura 3. Relação de frequência de cada gene relacionado à virulência nos 69 isolados potencialmente APEC obtidos de GFQ.....	36
Figura 4. Suscetibilidade apresentada pelos 69 isolados potencialmente APEC obtidos de GFQ frente aos 17 antimicrobianos testados.....	39
Figura 5. Dendrograma mostrando a relação de similaridade genética dos 69 isolados potencialmente APEC estabelecida por PFGE baseado no coeficiente de Dice UPGMA, usando-se o programa BioNumerics versão 7.1.	42

DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE *Escherichia coli* PATOGÊNICA PARA AVES (APEC) EM CRIAÇÕES DE GALINHAS DE FUNDO DE QUINTAL

RESUMO: As condições de criação de galinhas de fundo de quintal (GFQ) apresentam alto risco sanitário, já que medidas de biossegurança nem sempre são implementadas nessas criações. Dentre as doenças infecciosas de grande destaque na avicultura está a colibacilose, cujo agente envolvido é *Escherichia coli* patogênica aviária (APEC). Essa enfermidade está ligada à maneira e ao ambiente em que as aves são criadas, sendo que alguns isolados de APEC podem causar infecções nas próprias aves e em humanos. O mecanismo de virulência das amostras de APEC tem sido continuamente estudado e acredita-se ser multifatorial. O objetivo do trabalho foi detectar e caracterizar isolados potencialmente APEC em criações de GFQ. Para isto foram coletadas amostras cloacais e orofaríngeas de 250 GFQ, provenientes de sete pequenas propriedades da região de Ribeirão Preto - SP. Das 500 amostras, foram obtidos 69 isolados de *E. coli* positivos para pelo menos 5 genes característicos de APEC. Estes foram submetidos à PCR para a detecção de mais 11 genes de virulência, apresentando alta prevalência dos mesmos. A inoculação *in vivo* em pintainhos de um dia revelou que 49 destes isolados são de alta e/ou intermediária patogenicidade. Os isolados também foram submetidos ao teste de suscetibilidade a 17 antimicrobianos, e apresentaram resistência a pelo menos um antimicrobiano e a maioria (79,7%) apresentou perfil de multirresistência. Além disso, foi realizada análise filogenética e foi observado que 53,6% dos isolados pertenciam ao grupo B2, o qual já foi descrito como o grupo que alberga isolados que causam infecções extraintestinais. Na análise por PFGE foi detectado alta heterogeneidade de pulsotipos entre os isolados APEC e apenas uma amostra foi não tipável para a enzima XbaI. Ainda, 15 sorogrupos foram identificados entre os isolados, sendo o O8 (23,2%) o mais frequente. Os resultados obtidos nesse trabalho revelam que GFQ são reservatórios de APEC com potencial zoonótico, multirresistentes a antimicrobianos, potencialmente patogênicas para aves e portadoras de um grande número de genes relacionados à virulência, o que representa um alto risco para as galinhas e para os seres humanos que tem contato com essas aves ou consomem alimentos derivados delas.

Palavras-chave: ExPEC, multirresistência, patogenicidade, potencial zoonótico, virulência

DETECTION AND CHARACTERIZATION OF AVIAN PATHOGENIC *Escherichia coli* (APEC) IN BACKYARD CHICKENS CREATION

ABSTRACT: The conditions of backyard chickens creation (BC) present a high sanitary risk, since biosafety measures are not always implemented in these systems. Among the most important infectious disease in poultry is colibacillosis, and avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) is the causative agent. This disease is related to the way and environment in which these birds are created, and some APEC isolates can cause infection in birds and humans. The virulence mechanism of APEC samples has been continuously studied and probably is multifactorial. The objective of this work was to detect and characterize potentially APEC isolates in BC creations. For that, it were collected cloacal and oropharyngeal samples of 250 BC, from seven small properties from Ribeirão Preto - SP. Of the 500 samples, 69 positive *E. coli* isolates were obtained for at least 5 characteristic genes of APEC. These isolates were submitted to PCR for detection of 11 more virulence genes, resulting in a high prevalence of them. The test of inoculation in one day-old chicks revealed that 49 of these isolates had high and/or intermediate pathogenicity. All isolates were also submitted to the susceptibility testing on 17 antimicrobials, and showed resistance to at least one antimicrobial agent, but the most of them (79.7%) had a multiresistance profile. In addition, phylogenetic analysis was performed and 53.6% of the isolates belonged to B2 group, which has already been described as the group harboring isolates that cause extraintestinal infections. In pulsed field gel electrophoresis analysis (PFGE), it was detected a high heterogeneity of pulse types among the APEC isolates and only one sample was non-typable for XbaI enzyme. Furthermore, 15 serogroups were identified among the isolates, and O8 was the most frequent (23.2%). The results obtained in this study demonstrated that BC are APEC reservoirs with zoonotic potential, multiresistant to antimicrobials, potentially pathogenic to birds and carrying a large number of virulence genes, which represents a high risk for chickens and also humans who have contact with these animals or consume food derived from them.

Key words: ExPEC, multiresistance, pathogenicity, virulence, zoonotic potential

1. INTRODUÇÃO

As criações de galinhas de fundo de quintal (GFQ) correspondem a uma atividade importante executada por pequenos produtores no mundo, com a finalidade de servir para o consumo e/ou comercialização local. Nesse tipo de criação é comum observar instalações precárias e mínimas práticas de manejo e sanidade, o que pode resultar em problemas sanitários mais graves (ARENALES, 2001). Em função disso, especula-se que GFQ podem contribuir para a disseminação de enfermidades tanto para as aves como para o consumidor (THEKISOE; MBATI; BISSCHOP, 2003). Dentre os principais agentes bacterianos de crescente interesse para a sanidade avícola destaca-se a *Escherichia coli* patogênica para aves (APEC), cujos isolados estão associados a uma série de infecções sistêmicas extra-intestinais nesses hospedeiros, coletivamente denominadas colibaciloses (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

A colibacilose é responsável por impactos econômicos negativos na produção avícola em todo o mundo (AHMED; SHIMAMOTO; SHIMAMOTO, 2013). O diagnóstico baseado somente no cultivo bacteriano possui a limitação pelo fato de evidenciar resultados falsos positivos em decorrência da presença de cepas comensais presentes naturalmente no intestino das aves (“avian fecal” *Escherichia coli* – AFEC). Entretanto, a patogenicidade em amostras de *E. coli* está relacionada aos fatores de virulência que servem para diferenciar amostras patogênicas de não patogênicas (KEMMETT et al., 2013). Um grande número de potenciais fatores de virulência tem sido detectado em amostras de *E. coli*, porém, não há um consenso na literatura em relação à quais genes seriam os marcadores de virulência ideais para APEC (BARBIERI et al., 2013).

O estudo dos fatores de virulência associados ao teste *in vivo* e a definição do sorogrupo, pode proporcionar um conhecimento mais completo do grau de patogenicidade dessas bactérias. Estudos envolvendo a inoculação experimental seguido por métodos de biologia molecular, como a PCR, têm sido de grande valia na compreensão da importância de alguns dos fatores de patogenicidade das APEC (MONROY et al., 2005). A inoculação *in vivo* em pintinhos de um dia é fundamental

para estabelecer uma classificação da patogenicidade desse relevante patógeno aviário, pois algumas amostras de *E. coli* podem ser de origem fecal, mas não estar associada à doença em aves (GUASTALLI et al., 2013).

Ademais, o potencial zoonótico de cepas de APEC é evidenciado quando fatores de virulência comuns nas APEC são frequentemente encontrados em cepas de *E. coli* causando doenças extra-intestinais em humanos, o que caracteriza uma relação principalmente entre APEC com UPEC e NMEC de seres humanos (JOHNSON et al., 2008). GFQ e humanos compartilham com frequência o mesmo ambiente, e essas aves podem constituir uma importante fonte de infecção para o homem, assim como cepas de origem humana podem infectar essas aves. Em função das deficiências de adoção de medidas de biossegurança, do convívio próximo a humanos e outros animais e a escassez na literatura científica de pesquisas relacionadas ao monitoramento de *E. coli* nas criações de GFQ, este trabalho teve como principal objetivo avaliar a presença de isolados potencialmente APEC e caracterizá-los quanto ao seu potencial patogênico e zoonótico em criações de GFQ da região de Ribeirão Preto-SP, Brasil.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Criação de galinhas de fundo de quintal

A produção avícola brasileira desenvolveu-se e modernizou-se rapidamente alcançando níveis elevados de produtividade (GIROTTI; MIELE, 2015). O Brasil é o segundo maior produtor mundial de carne de frango e o líder em exportação, apesar de que 69% da produção é destinada ao mercado interno (UBABEF, 2015). Apesar destes avanços tecnológicos, ainda há uma grande preocupação com a sanidade na avicultura. Falhas neste setor podem representar prejuízos econômicos ocasionados pela perda de mercados por restrições sanitárias (BOLDRIN, 2010).

Existem diversas formas de criação avícola, dentre elas, a produção de aves em criatórios de explorações não tecnificadas, denominadas galinhas de fundo de quintal (GFQ), que consiste em uma atividade agropecuária alternativa de grande relevância para várias regiões no mundo em desenvolvimento (THEKISOE; MBATI; BISSCHOP, 2003). As criações de GFQ são caracterizadas por uma população geralmente pequena, contendo cerca de 5 a 20 cabeças por propriedade com as várias faixas de idades representadas dentre elas, não têm raça definida, possuindo rusticidade característica, e ausência de intervenções reprodutivas (SONAIYA, 2001). Tal atividade apresenta um papel de destaque nos âmbitos econômico, social e cultural, uma vez que apresenta diversas finalidades como: exposição, hobby, companhia, consumo e venda local de carnes e ovos (SMITH et al., 2012; HAMILTON-WEST et al., 2012).

No Brasil, a criação GFQ é considerada uma das atividades agropecuárias mais tradicionais, possuindo mais de cinco séculos de existência, e aproximadamente 80% das propriedades rurais no país adotam este tipo de criação, sendo que em sua grande maioria são pequenos produtores que praticam como forma de subsistência (ALBINO; JÚNIOR; SILVA, 2001).

A avicultura industrial brasileira é muito diferente das criações de fundo de quintal. Essas diferenças são perceptíveis, sobretudo nas medidas existentes de prevenção e controle acerca desses tipos de criações. Os cuidados sanitários na indústria avícola são efetivados por meio de rígidas medidas de biossegurança, que

preconizam acompanhamento constante das aves. Já os parâmetros produtivos e de biossegurança das GFQ são baixos, apesar de serem obtidos com custos mínimos e embora extremamente necessários, não incluem controle sanitário efetivo (SONAIYA, 2001). Os problemas sanitários representam também um obstáculo ao sucesso dessa atividade alternativa, além de consistirem em uma fonte potencial para disseminação de enfermidades ocasionadas por microrganismos, em função da convivência das aves com outros animais ou com pessoas no mesmo ambiente. Observa-se também que esses agentes se multiplicam na natureza, contaminando ampla variedade de aves domésticas e de vida livre, especialmente na ausência de manifestação clínica, e disseminam-se na população de aves, por mecanismos de transmissão horizontal e vertical (BERCHIERI JUNIOR, 1997).

Medidas de vigilância e defesa sanitária são adotadas pelo Ministério de Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) e pela indústria para manter um bom *status* sanitário e assim garantir a qualidade do produto e segurança alimentar (BRASIL, 2007). Apesar desse sistema de biossegurança aplicado às criações comerciais, as criações GFQ encontram-se fora desse controle sanitário. As GFQ caracterizam-se pela sua forma de exploração extensiva e, normalmente são criadas para consumo próprio ou comercialização local, sendo inexistentes na maioria das vezes as instalações avícolas adequadas, bem como a adoção de boas práticas de manejo que contemplem com eficiência os aspectos sanitários (MARCHESI; ARALDI-FAVASSA, 2011).

2.2 *Escherichia coli*

Escherichia coli foi descrita pela primeira vez em 1.885 por Theodor Von Escherich, sendo chamada de *Bacterium coli commune*, devido ao fato de ser um dos principais integrantes da microbiota entérica de animais homeotérmicos (KONEMAN et al., 2008). Esta espécie de bactéria é Gram negativa e pertence à família *Enterobacteriaceae* (PIATTI; BALDASSI, 2007). Caracteriza-se por apresentar a forma de bastonete, ter metabolismo aeróbio ou anaeróbico facultativo, não esporogênico e podem ser móveis, com presença de flagelos peritríqueos, ou imóveis. São mesófilas, crescendo em temperaturas de 18°C a 44°C, sendo 37°C a

temperatura ideal para seu crescimento. Seu tamanho varia de 1,1 a 1,5 µm por 2 a 6 µm e produzem colônias de formas lisas ou rugosas em meio sólido, sendo possível o aparecimento de colônias mucóides (KONEMAN et al., 2008; BARNES; VAILLANCOURT; GROSS, 2008).

Essa bactéria também é caracterizada por suas propriedades bioquímicas: positiva para reação para indol, lisina, motilidade e reação de vermelho metila; negativa para testes para urease e hidrogênio e utilização de citrato. Além disso, algumas cepas podem produzir H₂S (QUINN et al., 2005).

A célula bacteriana é composta de estruturas antigênicas de superfície que contribuem para a determinação dos sorotipos de *E. coli*, que é realizada por meio de anti-soros e baseia-se na classificação que Kauffmann realizou em 1947, dos antígenos somáticos (*Öhne* – “O”), capsulares (*Kapsel* – “K”), flagelares (*Hauch* – “H”) e fimbriais (*Fimbriae* – “F”). Atualmente são descritos 181 antígenos somáticos, 80 capsulares e 53 flagelares. Existem ainda amostras rugosas, autoaglutinantes, que não podem ser sorotipadas devido à perda parcial ou total da cadeia de polissacarídeo (QUINN et al., 2005; ROCHA, 2008). Podem ser encontradas na natureza muitas possíveis combinações, mas o número de sorotipos patogênicos é limitado (ORSKOV; ORSKOV, 1992). Aproximadamente 60 sorotipos são mais freqüentemente associados ao homem sendo que 35 deles são associados a infecções intestinais (TRABULSI; TOLEDO, 1991). Somente os antígenos de superfícies não constituem numa base para classificar as amostras de *E. coli* quanto ao seu potencial patogênico, com a exceção do sorotipo O157:H7 que, pela forte associação com o patótipo, serve como indicador de cepas enterohemorrágicas (KUHNERT; BOERLIN; FREY, 2000).

Grande parte das *E. coli* são comensais, não apresentando qualquer gene de virulência e, portanto não tem grande papel patogênico. Como comensal, provenientes da mãe ou do ambiente, as *E. coli* colonizam o intestino de seu hospedeiro logo após o nascimento, e convivem com este de forma vitalícia (GYLES, 1994). No entanto, essa visão mudou progressivamente ao se reconhecerem diversas patologias entéricas e extra-intestinais causadas por alguns sorotipos dessa bactéria (FERREIRA; KNOBL, 2009).

O potencial patogênico de algumas cepas de *E. coli* se deve a ganhos genéticos ocorridos durante o processo evolutivo da espécie e devido à aquisição de genes de virulência por cepas comensais de *E. coli*, através de mutações ou transferência horizontal de material genético. Os genes de virulência, contidos em ilhas de patogenicidade no cromossomo bacteriano (PAI – “Pathogenicity Islands”) ou material genético extra-cromossômico, codificam proteínas que possibilitam a colonização, penetração e invasão de novos nichos em seus hospedeiros (HACKER et al., 1997).

Com base nos mecanismos de virulência específicos das cepas patogênicas, as *E. coli* podem ser classificadas em patotipos, sendo que, de acordo com o local de infecção, é possível dividir em *E. coli* patogênica de origem intestinal (InPEC) e *E. coli* patogênica extraintestinal (ExPEC) (FROMMEL et al., 2013). As InPEC são responsáveis pelas diarreias e podem apresentar diversas estratégias para invadir as células intestinais (CROXEN; FINLAY, 2010). Existem pelo menos seis categorias conhecidas, com relação às infecções intestinais: *E. coli* enteropatogênicas (EPEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* de aderência difusa (DAEC) e *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC). Nas ExPEC estão incluídos três subgrupos: *E. coli* uropatogênicas (UPEC) que determinam infecções no trato urinário em humanos, as *E. coli* causadora da meningite neo-natal (NMEC) e *E. coli* patogênica para aves (APEC), que causam colibacilose aviária (KAPER, NATARO; MOBLEY, 2004). Apesar de colonizarem diferentes nichos e apresentarem estratégias de patogenicidade distintas, as *E. coli* patogênicas extra-intestinais podem compartilhar genes de virulência (FERREIRA; KNOBL, 2009).

2.3 *Escherichia coli* patogênica para aves (APEC) e a colibacilose

A *E. coli* patogênica para aves (APEC) pertence ao grupo das *E. coli* patogênicas extra-intestinais e é responsável por uma série de enfermidades e por ocasionar grandes prejuízos na indústria avícola moderna. As APEC podem estar na microbiota intestinal das aves saudáveis, podendo assim, permanecer nas criações por um longo período, contaminando os alimentos e a água, que podem servir como via

de disseminação da bactéria para as aves (EWERS et al., 2004). A predominância dos sorotipos O1, O2 e O78 em isolados de aves clinicamente saudáveis reforçam a ideia de que o trato intestinal das aves pode ser um excelente reservatório para este patógeno (BLANCO et al., 1998).

De maneira geral, as cepas APEC causam, em seus hospedeiros, diferentes tipos de processos infecciosos, os quais são denominados colibacilose aviária (KAPER, NATARO; MOBLEY, 2004). O aparecimento desta doença é o resultado da interação da bactéria com o hospedeiro e o ambiente, podendo assim, estar associada a quadros de colisepticemia, peritonite, aerossaculite, pericardite, perihepatite, coligranuloma, salpingite, onfalite, celulite, doença respiratória crônica complicada, pleuropneumonia, síndrome da cabeça inchada, sinovite, osteomielite e panoftalmia. O processo infeccioso quando não tratado, termina com a morte da ave por septicemia (DZIVA; STEVENS, 2008). Nas aves, a colibacilose inicia-se no epitélio traqueal, em contraste com a maioria das enfermidades causadas por *E. coli* em mamíferos, que têm afetado inicialmente o epitélio intestinal e urinário (VIDOTTO; NAVARRO; GAZIRI, 1997).

Alguns fatores podem predispor a colibacilose aviária, incluindo a superpopulação, ventilação precária, acumulação excessiva de amônia no ambiente, alimentação inadequada, avitaminoses e hipovitaminoses, presença de coccidioses e verminoses em geral, micoplasmas e viroses respiratórias, manejo incorreto dos ovos férteis e incubadoras (BARCELOS, 2005).

O tratamento da colibacilose tradicionalmente é feito com antimicrobianos tais como ampicilina, espectinomicina, quilononas, cloranfenicol, neomicina, tetraciclina, trimetropim, entre outros. Além da administração de antibióticos, é necessário corrigir o manejo das aves visando às boas práticas de higiene e criação, com o objetivo de diminuir o estresse e prevenir novas infecções (DHO-MOULIN; FAIRBROTHER, 1999).

Cepas não patogênicas de *E. coli* aviária (“avian fecal” *E. coli* – AFEC) podem ser encontradas na microbiota normal do trato intestinal das aves e mamíferos e dificultam a caracterização do agente causal (ZANATTA et al., 2004). As cepas patogênicas diferem das comensais por apresentarem fatores de virulência que proporcionam infecções extraintestinais (KNÖBL et al., 2012). No Brasil, já são

descritos alguns estudos de caracterização e diferenciação de APEC e AFEC (IKUNO et al., 2006; NAKAZATO et al., 2009; MATURANA et al., 2011). No entanto, apenas trabalhos mais recentes demonstraram a elevada frequência dos cinco principais fatores de virulência (*iutA*, *iss*, *iroN*, *ompT* e *hlyF*) em APEC brasileiros (KOBAYASHI et al., 2011; MALUTA et al., 2014).

Além da circunstância de cepas de APEC desenvolverem doenças em aves, outro fator de grande relevância se relaciona ao papel desempenhado por este patógeno na saúde pública (MENÃO et al., 2002). Vários estudos relatam que patótipos APEC e UPEC podem apresentar regiões do genoma idênticos, evidenciando que algumas ExPEC humanas e aviárias são altamente similares (RODRIGUEZ-SIEK et al., 2005b; JOHNSON et al., 2007). Isso sugere que as aves podem ser um veículo ou pelo menos um reservatório de *E. coli* capazes de infectar humanos e por esta razão a APEC deve ser considerada um agente zoonótico em potencial (JOHNSON et al., 2007).

2.4 Fatores de virulência em APEC

Já foram descritos vários genes relacionados à virulência de APEC. No entanto, não existe um conjunto específico de genes que caracterizem o patótipo, inclusive para um mesmo sorogrupo. Cepas de APEC podem carecer de um ou mais genes associados à virulência e mesmo assim serem virulentas, sugerindo a hipótese de vários mecanismos alternativos mediando a patogenicidade (DZIVA; STEVENS, 2008). Mesmo cepas distintas geneticamente podem produzir a mesma infecção e patogenicidade, pois podem apresentar fatores de virulência distintos e com a mesma função, atuando no mesmo sítio do hospedeiro. Dessa maneira, parecem existir estratégias comuns que fazem da APEC um patógeno eficiente (EWERS et al., 2004).

Os fatores de virulência das cepas patogênicas de APEC podem ser traduzidos em adesinas, sistemas de captação de ferro, colicinas, fatores envolvidos na resistência a proteínas do soro, invasinas e toxinas (ROCHA et al., 2008; NAKAZATO et al., 2009). Segue abaixo uma descrição breve dos genes comumente associados à virulência de APEC.

2.4.1 Adesinas

A expressão de adesinas é considerada um fator de virulência essencial para aderência e colonização dos tecidos do hospedeiro, constituindo o primeiro passo na infecção por *E. coli* (DZIVA; STEVENS, 2008). A especificidade de aderência da bactéria em relação aos tecidos-alvo do hospedeiro determina a expressão das fímbrias e das adesinas na superfície bacteriana. Embora essas adesinas apresentem poucas diferenças morfológicas existem características antigênicas e hemaglutinantes distintas (FERREIRA; KNÖBL, 2009).

As adesinas fimbriais são as mais estudadas e caracterizadas. As fímbrias são filamentos de proteínas localizados na superfície celular bacteriana, com 1µm de comprimento e 7nm de largura, podendo ser de diferentes tipos. A fímbria mais comum em APEC é a fímbria tipo 1, estando presente em mais de 70% das cepas (BARBIERI et al, 2013). Tem como principal função promover a ligação da bactéria ao resíduo D-manose das células epiteliais das mucosas do trato respiratório superior das aves. O *operon pil* é o responsável por codificar a fímbria tipo 1, o qual compõem um conjunto que inclui pelo menos oito genes, sendo eles: *fimA*, *fimB*, *fimC*, *fimD*, *fimE*, *fimF*, *fimG* e *fimH*. Outra fímbria importante é a fímbria P ou F11, que é codificada por um conjunto de 11 genes cromossômicos denominados de operon *pap*, sendo que seis desses, *papA*, *papE*, *papF*, *papG*, *papH* e *papK*, estão relacionados com proteínas estruturais (KAWANO; YAGUCHI; OSAWA, 2006). Em aves, a fímbria P está relacionada à colonização dos órgãos internos após o estabelecimento da infecção inicial (LA RAGIONE; WOODWARD, 2002).

Entre as adesinas afimbriais, o Tsh (“temperature sensitive hemagglutinin”) contribui nas etapas seguintes da infecção por APEC, incluindo a colonização dos sacos aéreos (DOZOIS et al., 2000). Além disso, o Tsh está relacionado à atividade de hemaglutinação de eritrócitos de galinhas, sendo preferencialmente expressa a baixas temperaturas (26-30°C) e reprimida a 42°C em linhagens de APEC (MAURER et al., 1998). É importante salientar que o gene *tsh*, codificador desta proteína, não foi detectado em *E. coli* isoladas de fezes de galinhas saudáveis, AFEC,

mas sim em APEC, o que sugere a importância desse fator de virulência na patogenicidade de estirpes APEC (KOBAYASHI et al., 2011).

2.4.2 Aquisição de ferro

A capacidade das APEC de sequestrar ferro dos tecidos corporais é um fator importante para sua virulência, pois o ferro está em baixas concentrações nos tecidos dos hospedeiros. Para superar esta limitação a bactéria pode possuir sistemas especiais de assimilação, através dos quais ela capta o ferro necessário via componentes ligantes de ferro de baixo peso molecular, chamados sideróforos (NEILANDS, 1981). *E. coli* podem efetuar o transporte deste mineral por meio dos sistemas ferricromo, citrato, enterobactina e aerobactina (WOODROW et al., 1978).

O sistema da aerobactina é a forma de captação e transporte de ferro mais utilizada pela bactéria, e foi descrito em uma ilha de patogenicidade de *Shigella*. A aerobactina é codificada pelo operon, que está presente no plasmídeo ColV, e é composto pelos genes *iucABCD* e *iutA*, os quais codificam um sideróforo hidroximato e o receptor férrico da aerobactina. Os genes da aerobactina estão presentes nas estirpes virulentas e ausentes nas estirpes não virulentas e, por esta razão são considerados essenciais na patogenicidade das APEC (DZIVA; STEVENS, 2008; LING et al., 2013). Outro fator de aquisição de ferro encontrado em plasmídeos do tipo ColV é a salmoquelina, codificada pelo operon *iroBCDEN* e necessária para virulência e *in vivo* de APEC (GAZA et al., 2008). O operon *sitABCD* também codifica sideróforos, sendo esse sistema composto por permeases que aumentam a captura do ferro e manganês, contribuindo para a multiplicação bacteriana (SABRI; LEVEILLE; DOZOIS, 2006).

Existem outros genes, que também exercem a função de captação de ferro, entre eles podemos encontrar: *fyuA* (“ferric yersinia uptake – yersinabactin receptor”) e *irp2* (“iron repressible protein yersinabactin synthesis”) (SCHUBERT et al., 2002).

2.4.3 Colicinas

Algumas amostras de *E. coli* patogênicas apresentam a capacidade de sintetizar determinadas substâncias que inibem o crescimento de diferentes espécies bacterianas no nicho onde a *E. coli* está presente, denominadas de colicinas (LLOUBES et al., 2013). Essas substâncias são formadas por duas subunidades: maior, que é responsável pela lesão celular bacteriana, e a menor, que tem como função a autoproteção contra sua própria colicina (HARDY et al., 1975).

As colicinas são produzidas por genes localizados no plasmídeo Col (colicinogênicos) e são classificadas em tipo V, A, B, Ia, Ib, Ic, K, N, E1, E2, E3 e DF13 (LIOR, 1994). São encontradas principalmente em bactérias virulentas relacionadas a infecções extra-intestinais em humanos e animais. A maioria das cepas APEC tem o plasmídeo Col V (WRAY; WOODWARD, 1997). O gene *cva/cvi* responsável pela produção de colicina V está localizado no plasmídeo bacteriano (KAWANO; YAGUCHI; OSAWA, 2006).

2.4.4 Resistência sérica

A resistência ao sistema complemento do hospedeiro e a resistência à fagocitose desempenham importante papel na patogênese da colibacilose aviária, visto que bactérias sensíveis ao sistema complemento são incapazes de colonizar órgãos internos (MELLATA et al., 2003). Os genes de virulência responsáveis pela resistência sérica conferem à bactéria resistência aos efeitos bactericidas do soro do hospedeiro, podendo causar bloqueio do complexo terminal do sistema complemento que atua na membrana celular e provocar a lise da célula bacteriana (DZIVA; STEVENS, 2008).

O gene *iss* (“increased serum survival”) é codificado pelo plasmídeo conjugativo R, denominado de ColV, com um tamanho de 100 kilobases, e é determinante para resistência sérica, aos efeitos bactericidas do sistema complemento e à fagocitose, comumente relacionados a cepas septicêmicas de APEC (GYLES; FAIRBROTHER, 2010). Essa resistência é atribuída a produção de proteínas de membrana externa (OMPs), produzida por esses genes (MONROY et al., 2005).

Pfaff-Mc Donoughet al. (2000) estudaram a presença do gene *iss* em cepas consideradas patogênicas e não patogênicas e obtiveram uma maior frequência do gene entre as cepas patogênicas, sugerindo que o fator *Iss* esteja associado com a patogenicidade das APEC.

2.4.5 Toxinas

As bactérias patogênicas são capazes de produzir uma série de substâncias que são diretamente ou indiretamente tóxicas para as células do hospedeiro. Entre as toxinas mais frequentes em APEC está a proteína Vat (EWERS et al., 2007; BARBIERI et al., 2013), codificada pelo gene *vat* em uma ilha de patogenicidade. Esta toxina induz a formação de vacúolos intracelulares, resultando em efeitos citotóxicos (PARREIRA; GYLES, 2003).

Outra toxina associada à APEC e que contribui para a patogenia é a toxina EAST1 (*Escherichia coli* enteroagregativa endotoxina termo estável tipo 1), codificada pelo gene *astA*, o qual foi observado pela primeira vez em cepas de *E. coli* enteroagregativas. A presença desta toxina desencadeia alterações nas vias de sinalização celular que culminam no aumento da secreção de cloro e consequente diarreia aquosa típica em colibacilose (JANBEN et al., 2001; OH et al., 2014).

Há também toxinas com baixa frequência em APEC das quais se podem citar: a α -hemolisina, codificada pelo gene *hlyA* e que causa hemólise no hospedeiro; e o fator de citotoxicidade necrosante, codificado pelo gene *cnf1* (DE RYCKE; MILON; OSWALD, 1999), entre outras.

2.5 Resistência antimicrobiana em APEC

Os antibióticos são substâncias que tem a função de inibir ou evitar o crescimento bacteriano, sendo classificados como bactericidas, quando provocam a morte microbiana, ou como bacteriostáticos, quando inibem o crescimento do mesmo. Dependendo do grupo de antibiótico utilizado, sua ação antimicrobiana pode variar, existem aqueles que agem inibindo a síntese da parede celular, inibindo a síntese de proteínas, inativando a ação dos ribossomos, bloqueando a transcrição

do DNA ou mesmo alterando a permeabilidade da membrana (BERNATOVÁ et al., 2013).

Um dos grandes interesses na área da saúde pública é a existência de bactérias que colonizam os animais domésticos e que são resistentes a antimicrobianos. Embora a maior parte de casos de infecções por agentes multirresistentes em humanos possa ser atribuída à seleção ocorrida no próprio ambiente humano, há uma forte evidencia sobre o papel da criação animal na seleção e disseminação de bactérias resistentes (BOERLIN; WHITE, 2006). Alimentos de origem animal estão associados à transferência de resistência aos antimicrobianos para humanos, como também são descritos em vários trabalhos, casos de transmissão de bactérias resistentes entre animais e humanos de risco, como agricultores e funcionários de abatedouros (KLEIN; FRANZ, 2005; BOERLIN; WHITE, 2006).

O tratamento de infecções causadas por cepas ExPEC, tanto em humanos, quanto em animais, tem sido agravado pela emergência de resistência aos antibióticos, principalmente a partir do final da década de 1990 (PITOUT, 2012). Em cepas de APEC o problema parece se agravar mais, pois os índices apresentados por essas cepas isoladas de aves são maiores que de outras ExPEC (MELLATA, 2013). Uma hipótese para esses altos níveis de resistência seria o uso indiscriminado de antibióticos como promotores de crescimento ou como terapêuticos na cadeia de produção de aves (PITOUT, 2012; MELLATA, 2013).

A administração de certos antibióticos e quimioterápicos em pequenas concentrações e de forma contínua à ração proporciona aumento significativo de peso e melhor conversão alimentar (MOTA et al., 2005). A adoção desse manejo é relatada como administração subterapêutica de antimicrobianos, pois a dose utilizada destas drogas normalmente é inferior a utilizada em tratamentos da doença, o que aumenta as chances de transferência de resistência e de mutações que podem gerar isolados resistentes, diminuindo assim a capacidade destas drogas na cura de infecções em pessoas e animais (SINGER; HOFACRE, 2006).

2.6 Potencial zoonótico de APEC

O risco zoonótico de APEC foi inicialmente relacionado ao fato de algumas cepas isoladas de aves apresentarem sobreposição de fatores relacionados à virulência, grupos filogenéticos, sorogrupos e relação clonal com UPEC e NMEC isolados de humanos (RODRIGUEZ-SIEK et al., 2005b; EWERS et al., 2007).

Manges e Johnson (2012) relataram em um estudo que surtos de infecção do trato urinário (ITU) estavam relacionados ao consumo de carne de frango, e sugeriram que esse alimento pode ser uma importante via de transmissão de *E. coli* para mulheres que desenvolveram ITU recorrente. Relacionado a esse fato, Nordstrom, Liu e Price (2013) denominaram essa condição clínica de FUTI (infecção urinária adquirida de fonte alimentar) e ainda destacaram o fato de que muitas das cepas isoladas dessas FUTI apresentavam perfil de multirresistência aos antimicrobianos, o que reforça ainda mais a origem aviária dessas cepas.

Em alguns trabalhos já foram demonstrados que cepas aviárias podem causar infecção do trato urinário, meningite neonatal e sepse em camundongos, reforçando ainda mais a ideia de potencial zoonótico das APEC (ZHAO et al., 2009; JAKOBSEN et al., 2010; TIVENDALE et al., 2010). O relato de que APEC tem a capacidade de invadir células epiteliais humanas (pneumócitos) também é descrito na literatura (CHANTELOUP et al., 2011). Também existem pesquisas que demonstram a contraparte, ou seja, cepas isoladas de humanos causando quadros de colibacilose em aves, o que enfatiza que as ExPEC em geral compartilham várias características, inclusive a mesma tendência de expressão de fatores de virulência independente do hospedeiro ser mamífero ou ave (MOULIN-SCHOULEUR et al., 2007; ZHAO et al., 2009).

Estudos filogenéticos também ressaltam o potencial zoonótico de isolados APEC, uma vez que cepas EXPEC do grupo B2 isoladas de humanos e aves foram indistinguíveis. Tais isolados demonstraram ser virulentas e similares quando inoculadas em aves (MOULIN-SCHOULEUR et al., 2007). O sequenciamento de patótipos APEC demonstrou que este grupo está intimamente relacionado com o grupo ExPEC associado a infecção no trato urinário de seres humanos (JOHNSON et al., 2007).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo geral do presente trabalho consistiu em detectar e avaliar o potencial patogênico de estirpes de *E. coli* contendo fatores de virulência relacionados à *E. coli* patogênica aviária (APEC) em criações de galinhas de fundo de quintal.

3.2 Objetivos específicos

- Detectar através da PCR estirpes de APEC em GFQ de pequenas propriedades da região de Ribeirão Preto;
- Caracterizar os isolados de APEC através da pesquisa de vários genes de virulência;
- Determinar a patogenicidade dos isolados de potencialmente APEC por meio do teste *in vivo* em pintainhos de um dia de idade;
- Caracterizar o perfil de resistência dos isolados potencialmente APEC, frente a diversas drogas antimicrobianas;
- Determinar os sorogrupos das estirpes potencialmente APEC isoladas;
- Determinar o agrupamento filogenético dos isolados potencialmente APEC;
- Estabelecer relação epidemiológica dos isolados potencialmente APEC por PFGE.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), protocolo nº05749/14, da FCAV – UNESP - Jaboticabal.

4.1 População analisada e coleta das amostras

Foram coletadas amostras de suabes cloacal e orofaríngeal de 250 GFQ de origem genética desconhecida e de diferentes faixas etárias, provenientes de sete pequenas propriedades localizadas na região de Ribeirão Preto – SP, Brasil, no período de janeiro a abril de 2014, totalizando 500 amostras. As GFQ foram contidas manualmente e foram colhidas amostras fecais da cloaca, e amostras da orofaringe com auxílio de suabes estéreis (Figura 1). Essas amostras foram colocadas em tubos contendo 5mL de caldo infusão de cérebro-coração (BHI) e mantidas em caixa de isopor com gelo até serem processadas no laboratório. Os locais de coleta e as amostras de GFQ estão representados na Tabela 1.



Figura 1. Coleta de amostras de GFQ em pequenas propriedades da região de Ribeirão Preto – SP.

Tabela 1. Distribuição das amostras coletadas de GFG em 7 propriedades diferentes da região de Ribeirão Preto-SP.

Propriedade	A	B	C	D	E	F	G
Número das amostras	1C - 11C 1F - 11F	12C – 74C 12F – 74F	75C – 91C 75F – 91F	92C – 164C 92F – 164F	165C –195C 165F – 195F	196C –236C 196F - 236F	237C - 250C 237F - 250F

C: amostra cloacal;

F: amostra orofaríngeal;

4.2 Extração de DNA

Logo após a coleta, os tubos contendo caldo BHI e as amostras foram incubadas aerobicamente a 37°C por 16 horas e, passado esse período, 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 realizar a extração do DNA através de um protocolo de lise térmica, proposto por Keskimaki et al. (2001), com algumas modificações. Inicialmente, 1 mL de cada cultura incubada por 16 horas foi

centrifugado a 15.000 rpm por 2 minutos e o sobrenadante foi descartado. As células precipitadas foram ressuspensas em 1 mL de salina tamponada com fosfato (PBS), agitadas em vórtex e centrifugadas nas mesmas condições iniciais. O sobrenadante foi novamente descartado e as células foram ressuspensas em 0,5 mL de água ultrapura Milli-Q estéril (Millipore Corporation, EUA). Após esses procedimentos de lavagem, o tubo contendo as bactérias sedimentadas foi colocado por 10 minutos em água fervente e depois centrifugados a 15.000 rpm por 2 minutos. Foi retirada uma alíquota do sobrenadante, o qual continha o DNA, e estocado em outro tubo para posterior realização das análises por PCR para amplificação dos genes de virulência ou marcadores dos grupos filogenéticos.

4.3 PCR para o estabelecimento dos patótipos de isolados de *E. coli*

Para a identificação dos isolados *E. coli* como APEC, a PCR de triagem foi realizada para a identificação dos genes *cvaC*, *hlyF*, *ompT*, *iroN*, *iss* e *iutA*. Dois conjuntos de oligonucleotídeos iniciadores foram usados para a multiplex-PCR, um conjunto continha oligonucleotídeos para *iroN*, *ompT* e *iutA*, e o outro para *hlyF*, *cvaC* e *iss*. A PCR foi realizada com soluções contendo 2mM de cada dNTP (Thermo Fisher Scientific, Lituânia), 3,6µL de 10X Dream Taq Green Buffer (que contém 20mM de MgCl₂), 1,25pmol de cada iniciador, 1 unidade de Dream Taq Green DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Lituânia), 4µL de DNA molde e água ultrapura Mili-Q estéril (Millipore Corporation, EUA) para completar 20µL. Os pares de oligonucleotídeos iniciadores, as temperaturas de anelamento e os controles positivos estão descritos na Tabela 2. 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 amplificação da PCR foram visualizados em gel de agarosea 1,5%, utilizando a coloração de Safe DNA Gel Stain (Invitrogen, EUA). Todas as PCR foram realizadas utilizando-se o controle negativo (EcL10600) e controles positivos (Tabela 2).

As amostras que não apresentaram pelo menos um gene da triagem foram descartadas e as positivas para pelo menos um dos genes foram semeadas por esgotamento 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 por 16 horas a 37°C. Em seguida, um “pool” de cada grupo foi transferido para tubo contendo caldo BHI, incubados por 16 horas a 37°C, submetidos à extração de DNA e PCR para confirmação dos genes utilizados na triagem. O “pool” que apresentou resultado positivo para pelo menos um dos genes investigados na PCR de confirmação foi selecionado, e as cinco colônias que formavam este “pool” foram avaliadas individualmente conforme 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. Os procedimentos descritos acima e os oligonucleotídeos iniciadores utilizados foram feitos de acordo com o protocolo do EcL (EcL – Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal) disponível em http://www.apzec.ca/en/APZEC/Protocols/APZEC_PCR_en.aspx.

4.4 Detecção de genes de virulência adicionais para APEC

Adicionalmente, todos os isolados foram submetidos a novas análises por PCR para a detecção de mais 11 genes de virulência, sendo eles *sitA*, *tsh*, *traT*, *vat*, *astA*, *iucC*, *iucD*, *papC*, *irp2*, *fimH* e *fyuA*; seguindo-se os ciclos térmicos de PCR descritos no protocolo do EcL citado anteriormente.

Tabela 2. Oligonucleotídeos 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 – AAGTCAAAGCAGGGTTGCCCG R- GATCGCCGACATTAAGACGCAG	667	58	ECL 13256	Rodriguez-Siek et al. (2005a)
<i>irp2</i>	F – AAGGATTCGCTGTTACCGGAC R – TCGTCGGGCAGCGTTTCTTCT	287	55	ECL 13316	Rodriguez-Siek et al. (2005a)
<i>fyuA</i>	F – TGATTAACCCCGCGACGGGAA R – CGCAGTAGGCACGATGTTGTA	787	55	ECL 13316	Johnson; Stell (2000)
<i>iutA</i>	F – GGCTGGACATCATGGGAAGTGG R – CGTCGGGAACGGGTAGAATCG	302	59	ECL 13256	Johnson; Stell (2000)
<i>iucC</i>	F – CGCCGTGGCTGGGGTAAG R – CAGCCGGTTCACCAAGTATCACTG	541	58	ECL 13316	Skyberget al. (2003)
<i>iucD</i>	F – TACCGGATTGTGATATGCAGACCGT R – AATATCTTCCTCCAGTCCGGAGAAG	602	63	ECL 13316	Siqueira et al.(2009)
<i>sitA</i>	F – AGGGGGCACAACTGATTCTCG R – TACCGGGCCGTTTTCTGTGC	608	56	ECL 13316	Runyen-Janecky et al. (2003)
Protectinas/resistência ao soro					
<i>Iss</i>	F – CAGCAACCCGAACCACTTGATG R – AGCATTGCCAGAGCGGCAGAA	323	57	ECL 13256	Rodriguez-Siek et al. (2005a)
<i>traT</i>	F – GGTGTGGTGCGATGAGCACAG R – CACGGTTCAGCCATCCCTGAG	290	58	ECL 13316	Johnson; Stell (2000)
Adesinas					
<i>Tsh</i>	F – GGGAAATGACCTGAATGCTGG R – CCGCTCATCAGTCAGTACCAC	420	55	ECL 13316	Maureret al. (1998)
<i>fimH</i>	F – TGCAGAACCGGATAAGCCGTGG R – GCAGTCACCTGCCCTCCGGTA	508	63	ECL 13316	Siqueira et al. (2009)
<i>papC</i>	F – GACGGCTGTACTGCAGGGTGTGGCG R - ATATCCTTTCTGCAGGGATGCAATA	328	60	ECL 13316	Siqueira et al. (2009)
Hemolisina					
<i>hlyF</i>	F – GGCCACAGTCGTTTAGGGTGCTTACC R - GGCGGTTTAGGCATTCCGATACTCAG	450	62	ECL 13256	Rodriguez-Siek et al. (2005a)
Toxinas					
<i>astA</i>	F – TCGGATGCCATCAACACAGT R - GTCGCGAGTGACGGCTTTGTAG	125	56	ECL 7805	Ngeleka et al. (2003)
<i>Vat</i>	F – TCCTGGGACATAATGGTCAG R – GTGTCAGAACGGAATTGT	981	56	ECL 7805	Ewers et al. (2004)
Variados					
<i>cvaC</i>	F – CACACACAAACGGGAGCTGTT R - † CTTCCCGCAGCATAGTTCCAT	680	53	ECL 13256	Johnson; Stell (2000)
<i>ompT</i>	F – TCATCCCGGAAGCCTCCCTCACTACTAT R - TAGCGTTTGCTGCACTGGCTTCTGATAC	496	62	ECL 13256	Johnson; Stell (2000)
Tipagem Filogenética					
<i>chuA</i>	F – GACGAACCAACGGTCAGGAT	270	55	ND	Clermontet al.

	R – TGCCGCCAGTACCAAAGACA				(2000)
<i>yjaA</i>	F – TGAAGTGTCAAGGAGACGCTG	211	55	ND	Clermont et al.
	R – ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC				(2000)
TspE4.C	F – GAGTAATGTCTGGGGCATTCA	152	55	ND	Clermont et al.
2	R – CGCGCCAACAAAGTATTACG				(2000)

4.5 Tipagem filogenética

Os isolados foram submetidos à tipagem filogenética segundo o método descrito por Clermont, Bonacorsi e Bigen (2000). Tal método consiste na classificação de cada cepa, seguindo a árvore dicotômica (Figura 2), em um dos quatro grupos filogenéticos nomeadamente A, B1, B2 e D, baseado na presença dos genes *chuA*, *yjaA* e um fragmento anômalo de DNA denominado TspE4.C2, descritos na Tabela 2.

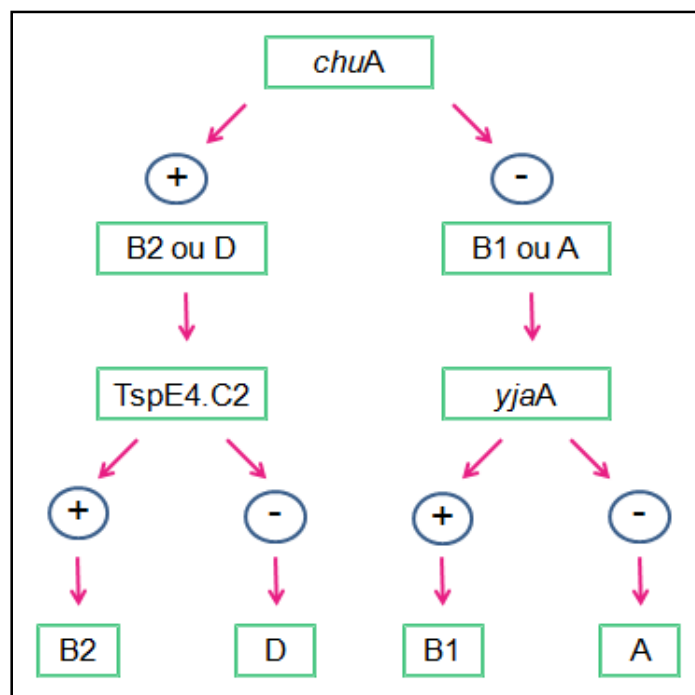


Figura 2. Árvore dicotômica para determinar o grupo filogenético de cepas de *E. coli*, utilizando os resultados da PCR dos genes *chuA*, *yjaA* e do fragmento de DNA TspE4.C2.

Cada reação de amplificação foi conduzida em volume de 20µL contendo: 4µL de DNA molde; 2mM de cada dNTP (Thermo Fisher Scientific, Lituânia), 3,6µL de 10X Dream Taq Green Buffer (que contém 20mM de MgCl₂), 1,25pmol de cada oligonucleotídeo iniciador, 1 unidade de Dream Taq Green DNA Polymerase

(Thermo Fisher Scientific, Lituânia) e água ultrapura Mili-Q estéril (Millipore Corporation, EUA) para completar 20µL. Esta mistura foi colocada em um termociclador a 94°C por 5 minutos; seguido de 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos. O último ciclo foi realizado a 72°C por 10 minutos para completa extensão pela Taq DNA polimerase. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese como citado anteriormente no item 4.3.

4.6 Teste de suscetibilidade a antimicrobianos

Os isolados foram submetidos a testes de suscetibilidade por meio do método de difusão em disco (CLSI, 2009) frente aos seguintes antimicrobianos: ampicilina (10µg), cefalotina (30µg), estreptomicina (10µg), gentamicina, (10µg), ciprofloxacina (5µg), cloranfenicol (30µg), tetraciclina (30µg), nitrofurantoína (300µg), sulfametoxazol+trimetoprim (25µg), ceftiofur (30µg), ceftriaxona (30µg), amicacina (30µg), cefoxitina (30µg), kanamicina (30µg), amoxicilina + ácido clavulânico (30µg), norfloxacin (10µg) e fosfomicina (50µg). Para a realização desses testes as cepas isoladas foram repicadas em tubos contendo 5mL 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 foram colocados os discos contendo os antimicrobianos. A leitura foi realizada após 18 horas de incubação a 37°C através da medida do diâmetro dos halos de inibição, com a utilização de régua milimetrada. Os diâmetros obtidos em milímetros foram comparados com um guia CLSI (2009). Os isolados que apresentaram resistência a três ou mais (≥ 3) classes de antimicrobianos foram considerados multirresistentes (MAGIORAKOS et al., 2011).

4.7 Eletroforese em campo pulsátil (PFGE)

A preparação dos “plugs” e digestão do DNA genômico com XbaI (Thermo Fisher Scientific, Lituânia) foi feita conforme descrito por Ribot et al. (2006) com algumas modificações. A estirpe de *Salmonella* Braenderup H9812 foi utilizada como

referência de peso molecular. O sistema utilizado foi o CHEF DR-III (Bio-Rad, EUA) e a eletroforese foi realizada em gel de agarose Pulsifield Certified 1% (Bio-Rad, EUA), com tempo inicial de 2,2 segundos, 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 23 horas a uma temperatura de 14°C . Os perfis dos fragmentos separados foram comparados, 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 UPGMA, usando-se o programa BioNumerics versão 7.1 (Matemática Aplicada, Sint-Martens-Latem, Bélgica).

4.8 Identificação sorológica

A sorotipagem foi realizada por meio de soroaglutinação em placas de acordo com o procedimento publicado por Orskov et al. (1977). As estirpes potencialmente APEC foram sorotipadas no “*E. coli* Reference Center” (ECRC) da Pennsylvania State University– EUA, tendo-se utilizando anti-soros produzidos contra os sorogrupos O1 a O181 com as exceções de anti-soros para O31, O47, O72, O93, O94, O122.

4.9 Teste de patogenicidade em pintainhos de um dia

O teste foi realizado através da inoculação de 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). Para a preparação do inóculo foi semeada uma colônia de cada estirpe bacteriana em 10 mL de caldo BHI, incubando-se por 18 horas a 37°C e em seguida diluindo a cultura em uma proporção de 1:10. A concentração do inóculo foi padronizada em 10^7 unidades formadoras de colônias/mL (UFC/mL). *E. coli* do sorogrupo O pertencente à coleção de culturas do Laboratório de Ornitopatologia da USP, foi utilizada como controle positivo. As aves usadas como controle negativo foram inoculadas apenas com caldo BHI. Para cada estirpe e também para os controles positivo e negativo, foram utilizados grupos de 10 pintainhos machos de linhagem de postura comercial. As aves foram mantidas

em observação durante 10 dias, e de acordo com o índice de mortalidade, as estirpes foram classificadas em alta ($\geq 80\%$), intermediária ($> 50\%$ e $< 80\%$), baixa patogenicidade ($\leq 50\%$) e não-patogênica (mortalidade zero).

5. RESULTADOS

5.1 Estabelecimento dos patótipos

Das 500 amostras coletadas de GFQ e analisadas, foram obtidos 69 isolados que apresentaram positividade para pelo menos cinco dos genes relacionados à APEC (*cvaC*, *iroN*, *iss*, *iutA*, *ompT* e *hlyF*), sendo 36 provenientes de cloaca e 33 da orofaringe. A frequência desses genes observada nos isolados de *E. coli* foi 66,7% (46/69) *cvaC*, 100% (69/69) *hlyF*, 100% (69/69) *iss*, 87% (60/69) *iroN*, 100% (69/69) *ompT* e 88,4% (61/69) *iutA*, como mostrado na Figura 3 e o perfil de virulência de cada isolado pode ser visto na Tabela 3.

Tabela 3. Genes relacionados à virulência, tipagem filogenética, índice de patogenicidade e sorogrupos em cada isolado potencialmente APEC obtidos de GFQ.

Isolados	Genes relacionados à virulência																	Filogenia	Patogenicidade	Sorogrupos
	<i>cvaC</i>	<i>hlyF</i>	<i>iroN</i>	<i>ompT</i>	<i>iss</i>	<i>iutA</i>	<i>sitA</i>	<i>tsh</i>	<i>iucC</i>	<i>traT</i>	<i>iucD</i>	<i>fimH</i>	<i>fyuA</i>	<i>irp2</i>	<i>vat</i>	<i>astA</i>	<i>papC</i>			
1Ca3	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	B2	Baixa	O8
2Ca1	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	B2	Intermediária	NT
2Fa4	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	A	NP	O158
4Ca1	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	B2	Intermediária	O8
5Ca1	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	B2	Alta	O8
8Cb3	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	B2	Baixa	O8
9Fa1	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	B2	Baixa	O8
10Ca1	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	B2	Intermediária	NT
11Ca2	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	B2	Intermediária	O8
13Ca1	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	A	Alta	NT
13Fa1	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	B2	Alta	NT
16Ca2	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	B2	Alta	O119
16Ca3	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	B2	Alta	O120
16Fa1	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	B2	Alta	NT
18Ca4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	B2	Baixa	O117
21Fa4	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	A	Intermediária	O8
37Ca1	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	A	Baixa	O8
46Ca2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	A	Alta	NT
52Ca1	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	A	NP	NT
52Ca5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	D	Baixa	NT
52Fa4	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	D	Alta	O119
56Ca4	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	B2	Intermediária	O149
58Cb2	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	B2	Alta	NT

61Ca1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	B2	Alta	O109
64Ca3	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	B2	Baixa	NT
70Fa1	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	B2	Alta	O8
71Fa1	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	B2	Alta	O88
71Fa5	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	B2	Alta	O8
77Ca1	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	B1	Baixa	O38
77Fb1	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	B2	Alta	O8
81Cb3	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	B1	Alta	NT
82Fa1	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	B2	Alta	NT
86Ca1	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	A	Alta	NT
88Ca4	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	B1	Alta	O2
88Ca5	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	B1	Alta	NT
88Fa2	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	B2	Alta	NT
113Cb1	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	B1	Baixa	O11
113Cb5	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	B1	NP	NT
116Fa4	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	B1	Baixa	NT
132Ca2	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	A	Alta	NT
133Ca1	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	B2	Alta	O8
133Ca5	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	B2	Alta	O8
135Ca1	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	A	Alta	NT
143Fa4	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	B2	Alta	O8
145Fa3	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	B2	Baixa	NT
149Fa3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	B1	Baixa	O2
149Fb2	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	B1	Alta	O2
153Fa1	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	A	Alta	O5
156Fa1	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	B2	Baixa	NT
157Fa1	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	B2	NP	NT

168Fa3	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	B1	Alta	NT
169Ca4	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	B1	Alta	O2
175Fa1	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	A	Alta	NT
175Fb1	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	A	Alta	O2
179Cb4	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	B2	Baixa	NT
182Fa4	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	A	Alta	O2
188Cb1	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	B2	Alta	O64
189Cb2	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	B2	Alta	NT
193Fb3	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	A	Baixa	O20
202Ca1	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	A	Alta	NT
210Fa2	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	B2	Baixa	NT
211Fb2	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	A	Baixa	O8
212Fb4	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	B2	Alta	O149
236Fa1	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	B1	Alta	O158
236Fb1	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	B2	Alta	O158
236Fb2	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	B1	Alta	NT
237Cb4	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	B2	Alta	NT
239Fa2	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	B2	Alta	O8
247Fb2	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	A	Alta	O9

NP: Não patogênico;

NT: Não tipáveis;

5.2 Detecção de genes de virulência adicionais

As estirpes potencialmente APEC foram submetidas à PCR para a detecção de genes de virulência adicionais. A frequência desses genes nos isolados de *E. coli* foram 89,8% *sitA*, 30,4% *tsh*, 58% *iucC*, 82,6% *traT*, 74% *iucD*, 82,6% *fimH*, 39,1% *fyuA*, 76,8% *irp2*, 17,4% *vat*, 15,9% *astA* e 1,5% *papC*, como demonstrado na Figura 3 e o perfil de virulência de cada isolado pode ser visto na Tabela 3.

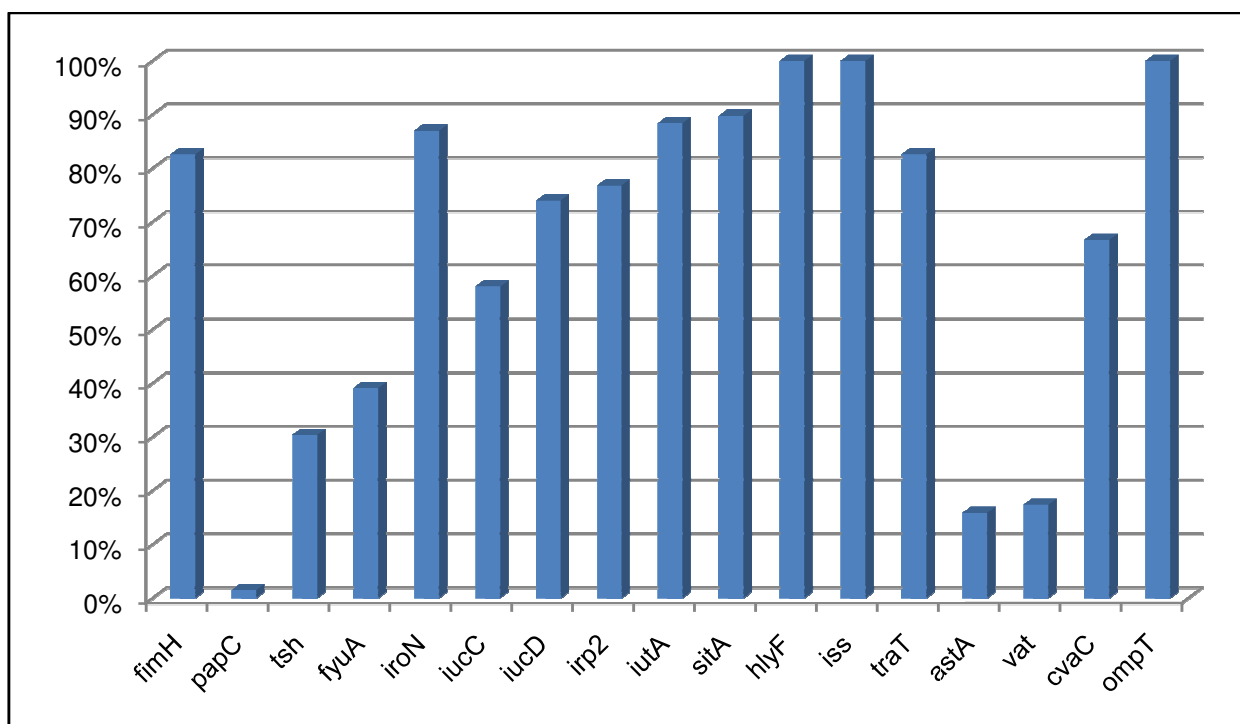


Figura 3. Relação de frequência de cada gene relacionado à virulência nos 69 isolados potencialmente APEC obtidos de GFQ.

5.3 Tipagem filogenética

A análise filogenética revelou que a maioria dos isolados pertence ao grupo filogenético B2 (37/69), seguido pelo grupo A (17/69), grupo B1 (13/69) e grupo D (2/69), conforme demonstrado na tabela 4. Os isolados dos grupos filogenéticos B2 e D estiveram associados a um maior número de fatores de virulência, apresentando uma média de 11,5 e 13,5 fatores de virulência por isolado, respectivamente. Já os grupos filogenéticos A e B1 apresentaram 9,9 e

10,8 fatores de virulência por isolado, respectivamente. Na Tabela 3 pode-se observar o grupo filogenético de cada isolado.

Tabela 4. Distribuição dos 69 isolados potencialmente APEC obtidos de GFQ em relação ao grupo filogenético.

Grupo filogenético (nº - %)	Média FV/isolado*
A (17 – 24,6%)	9,9
B1 (13 – 18,8%)	10,8
B2 (37 – 53,6%)	11,5
D (2 – 2,9%)	13,5

*Representa a soma do total de fatores de virulência do grupo e dividido pelo número de isolados.

5.4 Teste de suscetibilidade a antimicrobianos

Todos os 69 isolados testados apresentaram resistência a pelo menos um antimicrobiano e a maioria revelou perfil de multirresistência, sendo que 55 isolados apresentaram resistência para três ou mais classes de antimicrobianos, representando um percentual de 79,7%. O número e a porcentagem de isolados resistentes aos 17 antimicrobianos utilizados no teste de suscetibilidade podem ser vistos na Tabela 5 e sua distribuição na Figura 4.

Tabela 5. Número e porcentagem de resistência dos 69 isolados potencialmente APEC obtidos de amostras de GFQ frente a 17 antimicrobianos utilizados no teste de suscetibilidade.

Antimicrobianos	Resistentes (n - %)	Intermediários (n - %)	Sensíveis (n - %)
Tetraciclina	48 – 69,5%	0 – 0%	21 – 29,2%
Cloranfenicol	4 – 5,5%	2 – 2,8%	63 – 91,3%
Nitrofurantoína	49 – 71,0%	18 – 26,0%	2 – 2,8%
Fosfomicina	17 – 24,3%	1 – 1,4%	51 – 73,9%
Ceftiofur	19 – 27,5%	36 – 52,2%	14 – 19,5%
Cotrimazol	39 – 56,5%	0 – 0%	30 – 41,7%
Ceftriaxona	15 – 21,7%	28 – 40,5%	26 – 37,7%
Kanamicina	13 – 18,0%	49 – 71,0%	7 – 10,1%
Amoxicilina	8 – 11,1%	30 – 43,5%	31 – 44,9%
Amicacina	10 – 13,9%	32 – 46,4%	27 – 39,1%
Cefoxitina	3 – 4,3%	4 – 5,5%	62 – 89,8%
Ampicilina	39 – 56,5%	26 – 36,1%	4 – 5,5%
Gentamicina	15 – 21,7%	12 – 17,4%	42 – 60,9%
Ciprofloxacina	15 – 21,7%	9 – 12,5%	45 – 65,2%
Norfloxacina	11 – 15,9%	3 – 4,2%	55 – 79,7%
Estreptomicina	44 – 63,8%	18 – 25,0%	7 – 10,1%
Cefalotina	56 – 81,1%	13 – 18,0%	0 – 0%

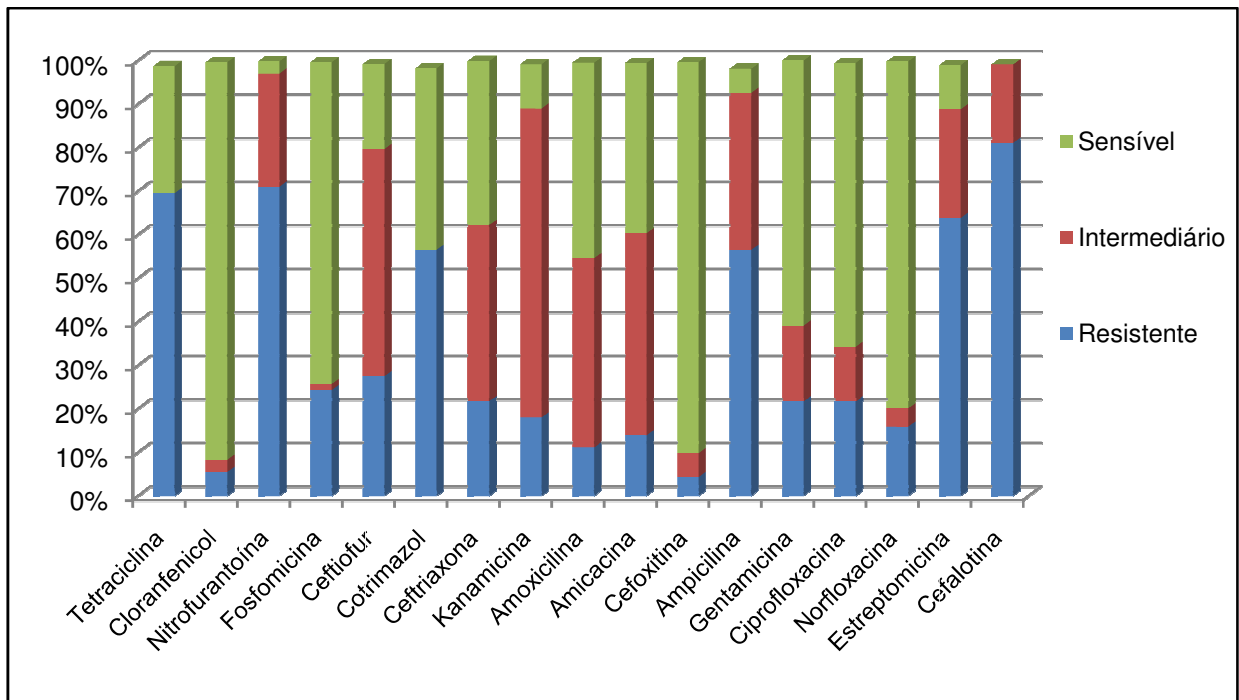


Figura 4. Suscetibilidade apresentada pelos 69 isolados potencialmente APEC obtidos de GFQ frente aos 17 antimicrobianos testados.

5.5 Identificação sorológica

Das 69 amostras analisadas, 30 não foram tipáveis para o antígeno O. Na identificação sorológica foram identificados 15 sorogrupos diferentes: O2, O5, O8, O9, O11, O20, O38, O64, O88, O109, O117, O119, O120, O149 e O158. O número de amostras e a frequência estão descritos na Tabela 6 e o perfil sorológico de cada isolado está demonstrado na Tabela 3.

Tabela 6. Número e frequência dos sorogrupos nos 69 isolados potencialmente APEC obtidos de GFQ.

Sorogrupos	Número de amostras	Porcentagem (%) ^a
O2	6	8,7
O5	1	1,5
O8	16	23,2
O9	1	1,5
O11	1	1,5
O20	1	1,5
O38	1	1,5
O64	1	1,5
O88	1	1,5
O109	1	1,5
O117	1	1,5
O119	2	2,9
O120	1	1,5
O149	2	2,9
O158	3	4,4
NT	30	43,5

^a Porcentagem em relação a um total de 69 isolados;

NT: Não tipáveis;

5.6 Teste de patogenicidade em pintainhos de um dia

O teste revelou 43 (62,3%) estirpes de alta patogenicidade, seis (8,7%) estirpes de intermediária patogenicidade, 16 (23,2%) estirpes de baixa patogenicidade e quatro (5,8%) estirpes não patogênicas. A patogenicidade de cada estirpe pode ser observada na Tabela 3. 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 de intermediária patogenicidade.

5.7 Eletroforese em campo pulsátil (PFGE)

Dentre os 69 isolados potencialmente APEC, apenas um não foi tipável pela enzima XbaI. Os 68 restantes geraram 59 pulsotipos. Seis pulsotipos foram compartilhados por mais de um isolado, apresentando 100% de similaridade, sendo eles: 1Ca3 e 5Ca1, 52Ca1 e 81Ca3, 52Ca5 e 82Fa1, 56Ca4 e 88Ca4, 21Fa4 e 71Fa1, 37Ca1 e 71Fa5. Todos os outros isolados foram agrupados em pulsotipos únicos, demonstrando um elevado grau de heterogeneidade entre as APEC examinadas. O dendrograma gerado por PFGE apresentou três grandes “clusters” (Figura 5).

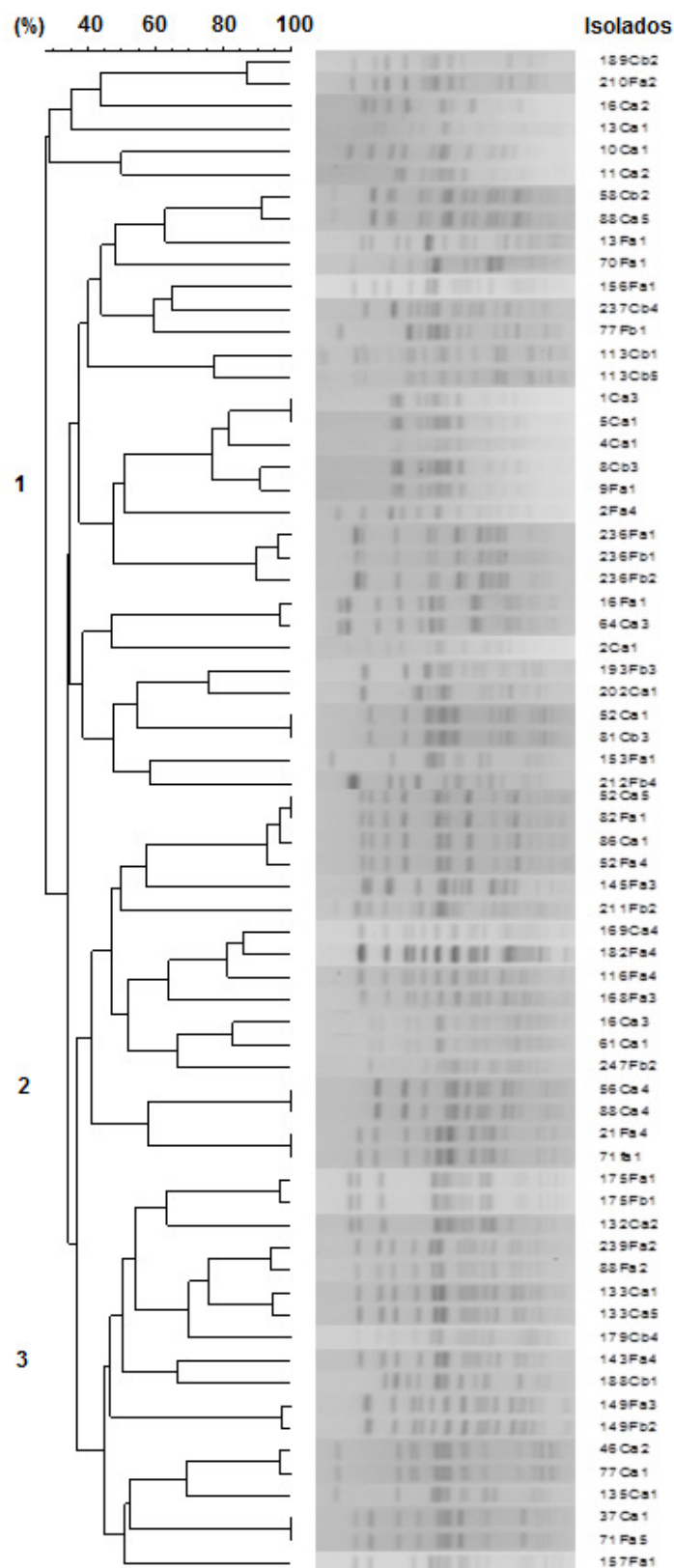


Figura 5. Dendrograma mostrando a relação de similaridade genética dos 69 isolados potencialmente APEC estabelecida por PFGE baseado no coeficiente de Dice UPGMA, usando-se o programa BioNumerics versão 7.1.

6. DISCUSSÃO

As infecções causadas por APEC são designadas colibacilose aviária e estão entre as principais doenças infecciosas de impacto negativo na avicultura industrial. Embora não figure na lista de doenças de notificação compulsória da OIE, o papel dessa bactéria na sanidade das aves é inquestionável nos dias atuais (KAHN et al., 2012). Por esta razão, há um grande número de estudos envolvendo APEC em aves de produção. Entretanto, na literatura científica são poucos os trabalhos que trazem dados relacionados à epidemiologia de zoonoses bacterianas, especificamente a *E. coli*, envolvendo aves criadas em “fundo de quintal” de subsistência, o que se faz necessários estudos sobre a presença dessa bactéria e suas características de virulência em GFQ, uma vez que essas informações são importantes para o emprego em estudos epidemiológicos e no controle e adoção de medidas de prevenção da APEC.

Estudos que trazem dados sobre as GFQ são de relevante importância, pois essas criações não possuem práticas de manejo que contemplem com eficiência os aspectos sanitários (GALVÃO-JÚNIOR; BENTO; SOUZA, 2009). Consequentemente, as GFQ se constituem em uma fonte potencial para disseminação de patógenos zoonóticos, em função do consumo de carne e ovos ou, até mesmo, da convivência das aves com outros animais ou com pessoas no mesmo ambiente (ARENALES, 2001). O presente estudo buscou determinar uma relação epidemiológica das APEC em GFQ, com o objetivo de caracterizar e determinar seu potencial patogênico para as aves, e zoonótico para humanos que convivem junto com essas aves ou consomem seus produtos.

Dentre os estudos realizados com GFQ, Samanta et al. (2014) realizaram uma pesquisa em diferentes regiões agroclimáticas da Índia, envolvendo galinhas criadas em fundo de quintal aparentemente saudáveis e verificaram presença de 75% de *E. coli* nas amostras obtidas dessas aves e do ambiente em que foram criadas. Similarmente, em outro trabalho realizado na Índia, foi relatado que 85,5% das amostras cloacais de galinhas de fundo de quintal continham *E. coli* patogênica (DAS et al., 2012). Na Austrália, foram coletadas 155 amostras de galinhas criadas de maneira extensiva, no período

de dezembro de 2008 a junho de 2009, e desse total obteve-se 134 isolados de *E. coli* (86,5%) (OBENG et al., 2012). Em nosso trabalho identificamos 69 isolados potencialmente APEC de um total de 500 amostras, o que representa um percentual de 13,8%. Esse número está bem abaixo dos estudos citados anteriormente, devido a metodologia utilizada para definir um patótipo APEC, que selecionou apenas isolados que possuíam pelo menos 5 genes utilizados na triagem relacionados a APEC (KEMMETT et al., 2013).

Ademais, existe ainda uma dificuldade na diferenciação de cepas não patogênicas (AFEC), que são encontradas na microbiota normal do trato intestinal das aves (ZANATTA et al., 2004; JOHNSON et al., 2008). Nakazato et al. (2009) relataram que a caracterização molecular e biológica é necessária para o entendimento da patogênese da APEC, buscando o desenvolvimento de ferramentas que podem prevenir as perdas econômicas causadas por estas linhagens. Outros estudos propõem a caracterização molecular de APEC com base na presença de determinados genes de virulência, não havendo um consenso na literatura em relação às quais genes seriam os marcadores de virulência ideais, pois diferentes isolados podem abrigar diferentes associações de fatores de virulência, sendo cada um capaz de induzir colibacilose em aves (SCHOULER et al., 2012).

Johnson et al. (2008) avaliaram um painel com 46 genes de virulência isolados de APEC e AFEC com objetivo de identificar um número mínimo de fatores de virulência com capacidade de prever o patótipo APEC. Esses autores concluíram que para uma amostra ser patogênica para aves deve apresentar os seguintes genes plasmidiais: *iutA*, *hlyF*, *iss*, *iroN* e *ompT*. Esses genes segundo este estudo, foram comuns em cepas de alta patogenicidade, e foram chamados de preditores mínimos de virulência para aves. No estudo em tela, foi realizada uma PCR de triagem para os genes *cvaC*, *iroN*, *iss*, *iutA*, *ompT* e *hlyF*, obtendo-se percentuais elevados desses genes, sendo que 52 isolados (75,4%) apresentaram os cinco genes propostos no estudo citado acima. É importante salientar que a metodologia adotada em nosso trabalho de selecionar somente as cepas que apresentarem pelo menos cinco dos genes utilizados na triagem aumenta conseqüentemente a frequência desses genes entre os isolados em questão, aumentando as chances dos isolados serem patogênicos para aves. A adoção dessa metodologia juntamente com os genes

de triagem propostos por Johnson et al. (2008) mostraram-se úteis como ferramenta para selecionar uma cepa de *E. coli* com potencial para APEC em nosso trabalho. Isso ganha respaldo ao verificar os resultados obtidos no teste de patogenicidade *in vivo* realizado neste trabalho e discutido mais adiante, pois uma alta porcentagem dos isolados obtidos de GFQ apresentaram esses genes e foram altamente patogênicos para os pintainhos de um dia de idade.

No presente estudo, o gene *traT* estava presente em 82,6% dos isolados de GFQ, frequência próxima a encontrada por Rodriguez-Siek et al. (2005a) que observaram esse gene em 78% dos isolados obtidos de aves com colibacilose 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. O gene *cvaC* está relacionado a produção de colicinas, e é encontrado principalmente em estirpes virulentas extraintestinais, causando doenças em humanos e animais (RODRIGUEZ-SIEK et al., 2005a; JOHNSON; JOHNSON; NOLAN, 2006). Este gene apresentou uma frequência de 66,7% em nossos isolados, resultado muito semelhante ao encontrado por Rodriguez-Siek et al. (2005a), que detectaram o gene *cvaC* em 66,8% dos isolados de aves com colibacilose.

Ewers et al. (2007) relataram que para um isolado ser considerado patogênico é necessário a presença de pelo menos um fator de adesão, um de aquisição de ferro e um de resistência sérica. Baseando-se na proposta desses autores, nesse trabalho foram pesquisados os genes *fimH*, *tsh* e *papC*, relacionados a adesão, e estes apresentaram frequência de 82,6%, 30,4% e 1,5%, respectivamente. Os genes relacionados à aquisição ferro pesquisados no presente estudo foram *iroN*, *iutA*, *sitA*, *iucC*, *iucD*, *fyuA* e *irp2*, sendo que os isolados apresentaram pelo menos dois desses genes. A resistência sérica é codificada principalmente pelo gene *iss* (MONROY et al., 2005) e este foi encontrado em 100% dos isolados. Contudo, os resultados encontrados no presente estudo, mostram que os 64 (92,7 %) isolados de GFQ apresentaram pelo menos um fator de virulência relacionado à adesão, um relacionado à aquisição de ferro e um fator de resistência sérica, o que corrobora com a proposta dos autores citados acima, sugerindo, portanto que a maioria de nossos isolados são potencialmente APEC.

Ainda dando destaque ao gene *iss*, Tivendale et al. (2004), ao estudarem cepas de APEC, observaram que o gene *iss* estava relacionado a altos níveis de virulência. Resultados com alta prevalência desse gene também foram obtidos por Rocha et al. (2008) que analisando 61 linhagens APEC, observaram que 73% eram portadores do gene *iss* e por Arabi et al. (2013), que obtiveram 96,4% para o gene *iss* em amostras de *E. coli* isoladas de frangos. Adicionalmente, o gene *iss* foi encontrado como um dos mais freqüentes em isolados de *E. coli* de aves com colibacilose, apesar de vários genes de virulência estarem envolvidos na sua patogênese (DELICATO et al., 2003).

Cepas de *E. coli* aviária tendem a ser menos toxigênicas que cepas de patótipos que afetam humanos (BARNES; VAILLANCOURT; GROSS, 2008), sendo assim a prevalência de genes que codificam toxinas costumam ser baixas em APEC (RODRIGUEZ-SIEK et al. 2005a, EWERS et al., 2007). Porém existem alguns genes que ocorrem em substancial número de cepas do patótipo aviário. Entre os genes que podem exercer o papel de marcadores de virulência, pode-se citar o *vat*, que codifica uma toxina vacuolizante e *astA*, que codifica uma toxina termoestável. Samanta et al. (2014) detectou o gene *astA* em 14,32% dos isolados obtidos de GFQ e do ambiente que essas aves viviam, resultado semelhante ao do presente trabalho que detectou uma freqüência de 15,9% deste gene. O gene *vat* foi observado em 17,4% de nossas amostras, e pertence a uma ilha de patogenicidade e segundo Ewers et al. (2004) é mais freqüentemente encontrado em estirpes APEC.

Mesmo considerando que a virulência de isolados de *E. coli* resulte da soma de vários genes relacionados à virulência, de forma que um isolado com maior número de genes apresentaria também maiores chances de ser mais virulento e causar infecções mais severas ao hospedeiro, esta definição poderia ser confirmada apenas com a realização de outros testes experimentais como o teste de infecção *in vivo*. Nesse trabalho foi realizado o teste de patogenicidade em pintainhos de um dia de idade, e os resultados se mostraram discrepantes com as definições genotípicas de APEC encontrados na literatura. Guastalli et al. (2013) em um estudo com poedeiras comerciais, que apresentavam sinais de colibacilose, obtiveram aproximadamente 50% de seus isolados com alta ou intermediária patogenicidade. Essa freqüência está

abaixo dos obtidos em nosso trabalho, que apesar de os isolados terem sido obtidos de amostras de GFQ, que em sua maioria, eram aparentemente saudáveis, ou seja, não apresentavam sinais clínicos de colibacilose, e que em princípio deveriam ser apatogênicas, mais de 70% deles são de alta ou intermediária patogenicidade. Com esses resultados obtidos em nosso trabalho, pode-se concluir que as GFQ são portadoras e veiculadoras de cepas de *E. coli* patogênicas, que podem ser transferidas para outras aves e/ou animais susceptíveis, representando uma importante fonte de infecção. O fato das GFQ não apresentarem manifestações clínicas da doença, é devido a sua alta variabilidade genética e a sua grande rusticidade, que conferem a elas maior resistência a doenças e a condições adversas de clima e alimentação (ALBINO; JÚNIOR; SILVA, 2001). Já as aves de linhagem comercial perderam muito de sua variabilidade gênica por terem passado por rigorosos processos de seleção, tendo como consequência uma baixa resistência a doenças (BOSCHIERO et al, 2007), como pode ser observado nos pintainhos utilizados no teste *in vivo* do estudo em tela, pois essas aves pertenciam a linhagem comercial e, portanto apresentaram sinais clínicos da colibacilose quando inoculados com culturas de *E. coli* obtidas das GFQ.

Ainda, além das características genéticas da ave, o comportamento oportunista das *E. coli* aliado a situações de imunossupressão podem influenciar na susceptibilidade ou resistência às doenças (NATARO; KATER, 1998). O alto índice de isolados altamente patogênicos para os pintainhos utilizados no teste de patogenicidade de nosso estudo, também pode ser justificado pelas oscilações do estado imunológico dos pintainhos, além de diversos fatores que podem influenciar na resposta imune dessas aves, como deficiência nutricional, imunidade materna, estresse, genética, entre outros (RIBEIRO et al., 2008).

Outro ponto relevante a ser considerado para este resultado é a possível troca de material genético entre as diferentes estirpes bacterianas, em que os genes envolvidos na virulência são constantemente transferidos por plasmídeos, portanto a transferência desses elementos genéticos pode levar uma estirpe apatogênica apresentar algum potencial patogênico (FRICKE et al., 2009).

Nesse estudo também foi encontrado um número significativo de isolados de baixa patogenicidade ou apatogênico, no teste *in vivo*, representando 29% do total de isolados, porém os mesmos apresentaram um alto número de genes relacionados à virulência de APEC. Isso pode ter ocorrido porque esses isolados podem ser apenas portadores dos genes de virulência, e, portanto, o fator determinante que torna um organismo virulento não é apenas a presença ou ausência de genes de virulência, mas os níveis de expressão dos genes, que pode variar entre uma amostra patogênica e uma amostra não patogênica (PITOUT, 2012). Este fato revela a necessidade de se investigar além da presença dos genes, a expressão dos mesmos. Apesar disso, segundo Ikuno et al. (2006), a presença de gene de virulência associados a estirpes de *E. coli* comensal, pode ser usada como indicador de potenciais riscos, pois tais bactérias podem ser reservatórios dos genes de virulência.

Além de possuírem diferentes associações de genes de virulência e um grau de patogenicidade elevado, a maioria dos isolados de GFQ de nosso trabalho apresentou multirresistência aos antimicrobianos testados. A resistência múltipla a antimicrobianos pode indicar que essas cepas de *E. coli* sofreram um grande processo seletivo sendo uma ameaça de patogenicidade para todos os tipos de animais e mesmo para o homem. Amostras de *E. coli* isoladas de aves são frequentemente resistentes para mais de uma droga (MELLATA, 2013).

No presente estudo foi verificado que uma significativa porcentagem dos isolados (79,7%) apresentou multirresistência frente a três ou mais classes de antimicrobianos testados, assim como vários trabalhos realizados em diferentes partes do mundo com aves de produção que relatam níveis fenotípicos de multirresistência em APEC acima de 90%, e resistência a todas as classes de antimicrobianos (WANG et al., 2012; AHMED; SHIMAMOTO; SHIMAMOTO, 2013; MELLATA; 2013). No Brasil, alguns trabalhos realizados também com aves de criações industriais relatam que cepas de APEC apresentaram resistência a todas as classes de drogas, sendo que as sulfonamidas e as tetraciclínas apresentam os maiores índices, variando entre 50% a 90%, enquanto que os índices de fluorquinolonas e de aminoglicosídeos apresentam índices menores que 50% (ZANATTA et al., 2004). Esses dados

são compatíveis aos resultados encontrados no presente trabalho e foi possível verificar que os isolados apresentaram elevados percentuais de resistência às tetraciclinas (69,5%) e sulfonamidas (58,3%), e baixos percentuais de resistência a fluorquinolonas, corroborando com o que foi observado por aqueles autores. Porém, dentre os aminoglicosídeos testados, a estreptomicina apresentou maior índice (63,8 %) entre os isolados. É importante ressaltar que nos trabalhos citados anteriormente, a multirresistência dos isolados de *E. coli*, é justificada em grande parte, devido à prática comum de utilização de antimicrobianos como promotores de crescimento e na terapêutica das aves, pois selecionam os agentes bacterianos mais resistentes, propiciam a transferência de genes de virulência e não debelam a infecção (FERREIRA; KNÖBL, 2009; MELLATA, 2013).

Embora os parâmetros para a criação de GFQ normalmente são diferentes do sistema de criações industriais, as características de resistência a múltiplos antimicrobianos encontradas nas aves desse estudo, foram bastante semelhantes, como descritos anteriormente. Uma justificativa para esse fenômeno pode estar relacionado à dieta das GFQ, das quais coletamos as amostras, que possuíam uma alimentação constituída de restos de alimentos de consumo humano ou milho, juntamente com ração comercial, que provavelmente, continha em sua composição promotores de crescimento antimicrobianos. Atualmente esses promotores de crescimento são os principais aditivos utilizados na dieta de aves e são utilizados em doses subterapêuticas, com a finalidade de controlar agentes prejudiciais ao trato digestivo e proporcionar os efeitos benéficos na absorção de nutrientes (MILES et al., 2006). Dentre os antimicrobianos utilizados como promotores incluem penicilina, amoxicilina, ceftiofur, gentamicina, neomicina, tetraciclina, virginiamicina, entre outros.

Alguns trabalhos envolvendo galinhas de fundo de quintal também relataram a ocorrência de isolados de *E.coli* multirresistentes (OKOLI, 2006; DAS et al., 2012; SAMANTA et al., 2014). Esses trabalhos relatam que a transmissão de *E. coli* resistentes para as GFQ está relacionado a contaminação da água e alimentos, por meio de práticas agrícolas que espalham esterco de animais próximo a leitos de água, assim como, a falta de saneamento, descarte inapropriado de medicamentos antimicrobianos e

convívio próximo a outras espécies de aves, animais domésticos e humanos que sofreram tratamentos com antimicrobianos, sendo que esse último caso, ocorria com as GFQ de nosso estudo, que conviviam com animais e outras aves, e até mesmo tinham o hábito de transitar dentro das residências dos proprietários. Esses dados mostram a importância do contato entre os proprietários e os animais, levando em consideração que há possibilidade da transmissão direta de patógenos potencialmente zoonóticos (HASAN et al., 2012).

Dentre os fármacos testados neste trabalho, somente cefoxitina (4,3%) e cloranfenicol (5,5%) mostraram-se eficientes para a maioria dos isolados. Já cefalotina (81,1%), nitrofurantoína (71%), tetraciclina (69,5%) e estreptomicina (63,8%), mostraram-se ineficientes na maioria dos isolados. Samanta et al. (2014) verificaram em GFQ uma porcentagem mais baixa de isolados resistentes para tetraciclina e estreptomicina, e em contraste com nossos resultados, 87,52% dos isolados resistentes para cloranfenicol e nenhum isolado resistente para cefalotina.

A alta porcentagem de resistência aos antimicrobianos nos nossos isolados também pode estar relacionado ao fato de que algumas GFQ das propriedades visitadas apresentavam quadro respiratório ou alguma enfermidade. Este fato encontra respaldo no fato que os próprios proprietários relatavam no momento da coleta de amostras que haviam utilizado tratamento prévio com antimicrobianos adquiridos no comércio agropecuário, sem obter o efeito esperado, pressupondo-se assim, o uso constante destes com conseqüente indução de resistência aos mesmos.

Outras hipótese para esses níveis alarmantes de resistência a antimicrobianos nos isolados encontrados nesse estudo, é o fato da presença do gene *iss* em 100 % dos isolados analisados, que além de aumentar a resistência das cepas de *E. coli* aos efeitos líticos do soro, pode levar a resistência a diversos antimicrobianos (ABREU et al., 2010). O gene *iss* juntamente com outros genes de resistência a antimicrobianos estão localizados em um plasmídeo conjugativo R e podem ser transferidos, por conjugação, para outras bactérias avirulentas, inclusive *E. coli*. Através da conjugação, bactérias comensais, inclusive de espécies diferentes, podem se tornar patogênicas e resistentes (JOHNSON; JOHNSON; NOLAN, 2006).

Quando isto ocorre, a bactéria que recebeu o plasmídeo R adquire a capacidade de produzir colicina, aerobactina, resistência à ampicilina, à tetraciclina e ao complemento (JOHNSON; RUSSO, 2002)

Para determinação de sorogrupos envolvidos em cepas APEC, várias pesquisas têm sido realizadas em todo o mundo. A colibacilose possui vários sorogrupos associados a sua patogenia, porém os mais frequentes são O1, O2 e O78 (DZIVA; STEVENS, 2008). Além disso, o sorogrupo O2 figura entre os mais prevalentes em doença aviária, sendo encontrado em diferentes regiões geográficas (DHO-MOULIN; FAIRBROTHER, 1999; MOULIN-SCHOULER et al., 2007). No Brasil, trabalhos indicam que os sorogrupos mais prevalentes em APEC são O2, O21, O36, O50, O78, O88, O119 e O152, como também as estirpes não tipáveis que podem apresentar importância epidemiológica (NAKAZATO et al., 2009). Dos sorogrupos mais encontrados no Brasil, foram identificados em nosso trabalho o O2, O88 e O119. Blanco et al. (1998) relataram que alguns estudos têm verificado uma grande diversidade antigênica entre as cepas APEC, havendo em sua maioria uma predominância de três a cinco sorogrupos em cada estudo. Neste trabalho, os sorogrupos de maior frequência foram O2 (8,7%), O8 (23,3%) e O158 (4,4%). Para Silveira et al. (2002), a diversidade de sorogrupos envolvidos com colibacilose, podem ser resultado de fatores geográficos e temporais associadas à prevalência de diferentes grupos clonais de cepas.

Ferreira e Knobl (2009) relacionaram os sorogrupos O1, O2, O8 e O25 a infecções urinárias em humanos e animais. Dentre os sorogrupos citados, foram encontrados no presente estudo O2 (6/69) e o O8 (16/69), representando uma porcentagem de 31,9 % dos isolados de GFQ. Todavia, é interessante salientar que esses dois sorogrupos, encontrados em nosso estudo, são amplamente referidos na literatura como os principais envolvidos em ITU em humanos (MOKADY; GOPHNA; RON, 2005; SMITH; FRATAMICO; GUNTHER, 2007), sugerindo que os clones desses patógenos foram transferidos entre os humanos e as GFQ de nosso trabalho, confirmando a hipótese de que as ExPEC são patógenos zoonóticos. Essa hipótese ganha respaldo quando se verifica que o número de isolados obtidos de GFQ resistentes ao antimicrobiano nitrofurantoína, que é de utilização exclusiva na terapêutica das

infecções do trato urinário em humanos, foi significativamente alto (71%) (KOCH et al, 2008).

Das 69 cepas estudadas, 30 (43,8%) foram não tipáveis para o sorogrupo O, estando de acordo com trabalhos realizados em diversas regiões descritos na literatura que apontam uma oscilação de amostras não tipáveis entre 14,8% e 60% (SILVEIRA et al., 2002;VANDEKERCHOVE et al., 2004; MONROY et al, 2005; ZHAO et al., 2005; JOHNSON et al., 2008). No Canadá, Allan, Van DenHurk e Potter (1993) observaram que 39% das amostras de *E. coli* isoladas de colibacilose aviária, eram não tipáveis. Samanta et al. (2014) obtiveram em amostras de GFQ da Índia, um percentual de 28,67% de cepas não tipáveis. O elevado número de amostras que não são possíveis serem sorotipadas indica que existem variantes novas de patógenos responsáveis pela colibacilose aviária, cujo sorogrupo ainda não foi identificado, resultantes de troca de açúcares que compõe a cadeia de polissacarídeo do antígeno somático “O” o que esse fato dificulta os diagnósticos fundamentados na sorologia (DHO-MOULIN; FAIRBROTHER, 1999).

Vale salientar que apesar de diversos trabalhos demonstrarem que os sorogrupos prevalentes em APEC, a caracterização destas, não pode ser associada apenas a esta informação, visto que é possível encontrar amostras apatogênicas pertencentes aos diferentes sorogrupos O. Além disso, muitas amostras patogênicas não são tipáveis (RODRIGUEZ-SIEK et al., 2005a), e quando se investiga a associação de sorogrupos a fatores de virulência percebe-se que determinados genes relacionados a patogenicidade como: *iss*, *tsh*, *cvaC*, *iutA* são amplamente distribuídos entre APEC, independente do sorogrupo O (YAGUCHI et al., 2007).

Estudos de análises filogenéticas mostraram que os isolados de *E.coli* podem ser agrupados em quatro principais grupos filogenéticos: A, B1, B2 e D. Amostras patogênicas extra-intestinais, com grande variedade de fatores de virulência, concentram-se nos grupos B2 e D. Enquanto, amostras comensais concentram-se nos grupos A e B1 (LE GALL et al., 2007). No presente estudo os isolados que apresentaram o maior número de genes relacionados à virulência pertencem aos grupos B2 e D, apresentando uma média de 11,5 e 13,5 genes, respectivamente. Já os grupos A e B1, apresentaram uma média de 9,9 e 10,8 genes, respectivamente. Resultados semelhantes foram

observados por Johnson et al. (2003) que mostraram que isolados de cloaca de aves de produção e de *E. coli* patogênicas foram mais frequentemente classificados como pertencentes aos grupos filogenéticos B2 e D e apresentaram mais genes associados à virulência dos que os classificados como comensais.

Vários trabalhos realizados em diversas localidades, inclusive no Brasil, verificaram que a maioria dos isolados APEC estavam mais associados aos grupos filogenéticos A e D (RODRIGUEZ-SIEK et al., 2005a; EWERS et al., 2007; KOBAYASHI et al., 2011). Os resultados do presente trabalho mostram que a maioria dos isolados são classificados como sendo do grupo B2 (54,2 %), seguidos pelos grupos A (23,6 %), B1 (19,5 %) e D (2,8 %).

Há diversos estudos que sugerem que os grupos clonais virulentos, são principalmente derivados do grupo filogenético B2 e, em menor medida, do grupo D, explicando a predominância de grupos B2 e D, entre isolados clínicos (JOHNSON; RUSSO, 2002). Em contrapartida, Rodriguez-Siek et al. (2005a) identificaram, em casos de colibacilose aviária, que metade das amostras pertenciam aos grupos filogenéticos A e B1, e o restante (50%), aos grupos filogenéticos B2 e D. Esses autores concluíram que a classificação de metade das amostras em um grupo considerado não patogênico seria explicada pela natureza oportunista de infecções de *E. coli*. Com base nesses resultados, pode-se inferir que não existe um grupo que compreenda exclusivamente isolados patogênicos animais, mas que os grupos apresentam combinações de isolados comensais e isolados patogênicos animais e humanos, justificando a hipótese de que APEC deve ser considerada um agente zoonótico em potencial.

Os resultados do PFGE demonstraram uma alta variabilidade epidemiológica entre os isolados, o que já foi relatado por alguns estudos na literatura (HUSSEIN et al., 2013; KEMMETT et al., 2013). Três pulsotipos de isolados provenientes de GFQ de diferentes localidades apresentaram 100 % de similaridade: 52Ca1 e 81Cb3, 52Ca5 e 82Fa1, 56Ca4 e 88Ca4. No entanto, estes isolados apresentaram diferentes perfis genotípicos, de patogenicidade e de tipagem filogenética. Apenas o último pulsotipo apresentou sorogrupo diferente, sendo os dois primeiros não tipáveis ao antígeno O. Apenas os isolados 1Ca3 e 5Ca1, 21Fa4 e 71Fa1, e 37Ca1 e 71Fa5, apresentaram 100%

de similaridade e pertenciam a mesma propriedade, uma explicação possível seria o constante contato entre as aves que resulta em uma transmissão de certos clones frequentes, já que as GFQ se encontravam alojadas em viveiros em quase todas as propriedades visitadas.

Foram encontrados também pulsotipos com similaridade superior a 95% pertencentes à mesma ave, sendo que nesse caso, os isolados eram provenientes de amostras coletadas da orofaringe, tais como: 149Fa3 e 149Fb2, 175Fa1 e 175Fb1, e 236Fa1 e 236Fb1, apresentando similaridades genotípicas e fenotípicas, com exceção do pulsotipo 149Fa3 e 149Fb2, que embora seja da mesma ave, apresentou no teste *in vivo*, resultado bastante distinto, sendo o primeiro de baixa e o segundo de alta patogenicidade. Uma possível explicação para esse evento é a possível presença de cápsula que são encontradas em algumas cepas de APEC virulentas (MOULIN-SCHOULEUR et al., 2007). Os antígenos capsulares estão envolvidos intimamente com a virulência, uma vez são de baixa imunogenicidade e apresentam atuação antifagocítica (DEVINE & ROBERTS, 1994). Mudanças genéticas no microrganismo sejam por alteração no cromossomo por mutação ou no DNA plasmidial por transferência genética, também explicam algumas diferenças entre a presença e ausência de genes de virulência para esses pulsotipos (SKYBERG et al., 2003).

As APEC não são patogênicas para o homem, porém uma informação preocupante é que amostras avícolas apresentam similaridade com as ExPEC humanas, sendo que a maioria dos genes de virulência possui similaridade àquelas identificadas em doenças causadas por cepas extra-intestinais no homem e desta forma pode representar risco zoonótico (JOHNSON; RUSSO, 2002). Todavia, as informações sobre a epidemiologia das APEC e a possibilidade de transmissão dos isolados clínicos de *E. coli* assim como a distribuição dos genes de virulência entre as amostras se constituem importantes ferramentas epidemiológicas (IKUNO et al., 2006).

Os resultados encontrados no presente estudo mostraram que as GFQ são reservatórios de potenciais ExPEC multirresistentes a antimicrobianos e com potencial altamente patogênico, representando um risco ao consumidor, principalmente por estas aves viverem em grande proximidade com os humanos e outros animais. Torna-se relevante ressaltar que GFQ portadoras

de cepas potencialmente patogênicas e com vários fatores de virulência são importantes fontes de infecção, já que a bactéria pode ser excretada juntamente com as fezes ou expelidas pela via respiratória dessas aves. As complexas interações entre ambiente e as características genéticas das cepas APEC podem levar a seleção e a disseminação da preocupante coexistência de virulência e resistência. Portanto, estudos de APEC em GFQ que são reservatórios e disseminadores desse patógeno podem contribuir para o desenvolvimento de métodos de diagnóstico, controle, prevenção e tratamento das doenças ocasionadas ou agravadas por essa bactéria, além de levar a um melhor conhecimento dos aspectos sanitários das criações não tecnificadas de galinhas no Brasil e seu potencial zoonótico.

7. CONCLUSÕES

Em face dos resultados encontrados no presente estudo e por todo o exposto no item Discussão, pode-se concluir que:

7.1. O estudo revelou que as cepas de *E.coli* obtidas de GFQ, apresentam múltiplos genes relacionados à virulência de APEC e uma alta prevalência dos mesmos;

7.2. Através do teste de inoculação *in vivo* em pintainhos de 1 dia, pode-se constatar que embora as GFQ são aparentemente saudáveis, elas albergam estirpes altamente patogênicas de APEC, e que alguns isolados, embora apresentaram baixa patogenicidade, continham um elevado número de genes relacionados à virulência, revelando a necessidade de se estudar a expressão desses genes;

7.3. Os isolados de GFQ apresentaram, em sua maioria, multirresistência a diferentes classes de antimicrobianos, representando risco para humanos e outros animais;

7.4. Nos isolados de GFQ foram identificados uma porcentagem significativa de alguns sorogrupos, os quais já foram implicados em doenças extraintestinais humanas e animais, além de um grande número de amostras não tipáveis;

7.5. A análise filogenética mostrou que a maioria dos isolados pertencia ao grupo B2, que inclui estirpes patogênicas extra-intestinais. Além disso, verificou-se que entre os quatro grupos filogenéticos não houve diferença marcante nos números de genes relacionados à virulência por isolado;

7.5. A análise de similaridade por PFGE mostrou alta heterogeneidade entre os isolados indicando que existem poucos clones prevalentes nas *E. coli* nas GFQ;

7.6. GFQ constituem em reservatórios de APEC/AFEC, por apresentarem estirpes altamente patogênicas, com múltiplos genes de virulência e multirresistentes.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, D.L.C.; FRANCO, R.M.; NASCIMENTO, E.R.; PEREIRA, V. L.A.; ALVES, F.M.X.; ALMEIDA, J.F. Perfil de sensibilidade antimicrobiana e detecção do gene *iss* pela reação em cadeia da polimerase na tipificação de *Escherichia coli* patogênica em codornas de corte sob inspeção sanitária. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 5, p. 406-410, 2010.

AHMED, A.M.; SHIMAMOTO, T.; SHIMAMOTO, T.; Molecular characterization of multidrug-resistant avian pathogenic *Escherichia coli* isolated from septicemic broilers. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 303, n. 8, p. 475-483, 2013.

ALBINO, L.F.T.; JÚNIOR, J.G.V.; SILVA, J.H.V. **Criação de Frango e Galinha Caipira (avicultura alternativa)**. Viçosa: Aprenda Fácil, 2001. 113 p

ALLAN, B.J.; VAN DEN HURK, J.V.; POTTER, A.A. Characterization of *Escherichia coli* isolated cases of avian colibacillosis. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 57, p. 146-151, 1993.

ARABI, S.; JAFARPOUR, M.; MIRINARGESI, M. ALS,S.; BEHJATI, R.N. SHABANPOUR, M. Molecular characterization of avian pathogenic *Escherichia coli* in broilers bred in Northern Iran. **Global Veterinaria**, v. 10, n. 4, p. 382-386, 2013.

ARENALES, M.C. **Criação Orgânica de Frangos de Corte e Aves de Postura**. Viçosa: CPT, 2001. 186 p.

BARBIERI, N.L.; DE OLIVEIRA, A.L.; TEJKOWSKI, T.M.; PAVANELO, D.B.; ROCHA, D.A.; MATTER, L.B.; CALLEGARI-JACQUES, S.M.; DE BRITO, B.G. HORN, F. Genotypes and pathogenicity of cellulitis isolates reveal traits that modulate APEC virulence. **Plos One**, v. 8, n. 8, p. e72322, 2013.

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

BARNES, H.J.; VAILLANCOURT, J.P.; GROSS, W.B. Colibacillosis. In: SAIF, Y.M.; FADLY, A.M.; GLISSON, J.R.; McDOUGALD, L.;R.; NOLAN, L.K.;

SWAYNE, D.E. (Eds.). **Diseases of poultry**. 12. ed. Ames: Blackwell Publishing, 2008. p.631-656.

BERCHIERI JÚNIOR, A. Doenças de transmissão vertical. In: Simpósio Técnico de Produção de Ovos, 7.,1997, Campinas. **Anais...** São Paulo: APA, 1997. p.133-142.

BERNATOVÁ, S.; SAMEK, O.; PILÁT, Z.; SERÝ, M.; JEŽEK, J.; JÁKL, P.; SILER, M.; KRZYŽÁNEK, V.; ZEMÁNEK, P.; HOLÁ, V.; DVOŘÁČKOVÁ, M.; RŮŽIČKA F. Following the mechanisms of bacteriostatic versus bactericidal action using Raman spectroscopy. **Molecules**, v.18, n.11, p.13188-13199, 2013.

BLANCO, J. E.; BLANCO, M.; MORA, A.; JANSEN, W. H.; GARCIA, V.; VAZQUEZ, M.L.; BLANCO, J. Serotypes of *Escherichia coli* isolated from septicaemic chickens in Galícia (Northwest Spain). **Veterinary Microbiology**, v. 61, n. 3, p. 229-235, 1998.

BOERLIN, P.; WHITE, D.G. Antimicrobial resistance and its epidemiology. In: GUIGUÈRE, S.; PRESCOTT, J.F.; BAGGOT, J.D.; WALKER, R.D.; DOWLING, P.M. (Eds.). **Antimicrobial therapy in Veterinary Medicine**.4. ed. Ames: Blackwell Publishing, 2006. p. 27-44.

BOLDRIN P. J. **Infecção de aves por mutantes de *Salmonella* sorotipos Gallinarum, Pullorum e enteritidis com deleção nos genes *cobS* e *cbiA***, Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias Campus de Jaboticabal , São Paulo, 2010.

BOSCHIERO, C.; CAMPOS, L.R.C.; AMBO, M., ROSÁRIO, M.F., NONES, K., LEDUR, M.C., COUTINHO, L.L. AND ASAMT, M. Associações entre marcadores microssatélites do cromossomo 13 e características de desempenho, carcaça e órgãos em galinhas. In: Congresso Latino-Americano de Avicultura, 20. **Memórias...** Porto Alegre, p.255-257. 2007.

BRASIL. MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Defesa Agropecuária, Depto. De Defesa Animal, Coordenação de Vigilância e Programas Sanitários, Plano Nacional de Sanidade Avícola. Normas para Registro e Fiscalização dos Estabelecimentos Avícolas. Instrução Normativa número 56, de 06 de Dezembro de 2007. Brasília, 2007.

CAZA, M.; LÉPINE, F.; MILOT, S.; DOZOIS, C.M. Specific roles of the iroBCDEN genes in virulence of an avian pathogenic *Escherichia coli* O78 strain and in production of salmochelins. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 8, p. 3539-3549, 2008.

CHANTELOUP, N.; PORCHERON, K. G.; DELALEU, B.; GERMON, P.; SCHOULER, C.; MOULIN-SCHOULEUR, M.; GILOT, P. The extra-intestinal avian pathogenic *Escherichia coli* strain BEN2908 invades avian and human epithelial cells and survives intracellularly. **Veterinary Microbiology**, v. 27, p. 435-439, 2011.

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 - CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Tests; Approved Standard. 10. ed. CLSI document MO2-A10**. Wayne: Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI), 2009.

CROXEN, M.A., FINLAY, B.B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 1, p. 26-38, 2010.

DAS, P.; JOARDAR, S.N.; SAMANTA, I.; DAS, P.K.; SADHUKHAN, T.K.; ISORE, D.P. Isolation and antibiogram of *E. coli* from backyard poultry in West Bengal. **Applied Biological Research**, v. 14, p. 228–230, 2012.

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

DE RYCKE, J.; MILON, A.; OSWALD, E. Necrotoxic *Escherichia coli* (NTEC): two emerging categories of human and animal pathogens. **Veterinary Research**, v. 2, n. 3, p. 221-233, 1999.

DEVINE, D.A.; ROBERTS, A.P. K1, K5 and O antigens of *E. coli* in relation to serum killing via the classical and alternative complement pathways. **Journal of Medical Microbiology**, v.41, n.2, p.139-144, 1994.

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

DOZOIS, C. M.; DHO-MOLULIN, M.; BRÉE, A.; FAIRBROTHER, J.M.; DESAUTELS, C.; CURTIS, R. Relationship between the Tsh Autotransporter and Pathogenicity of Avian *Escherichia coli* and Localization and Analysis of the tsh Genetic Region. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 7, p. 4145-4154, 2000.

DZIVA, F.; STEVENS, M. Colibacillosis in poultry: unravelling the molecular basis of virulence of avian pathogenic *Escherichia coli* in their natural hosts. **Avian Pathology**, v. 37, n.4, p. 355-366, 2008.

EWERS, C.; JANSEN, T.; KIESLING, 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.; KIESLING, S.; ALT, K.; ANTAO, E. M.; LANTURNUS, C.; DIEHL, I.; GLODDE, S.; HOMEIER, T.; BOHNKE, 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, n. 3, p. 163-176, 2007.

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.

FRICKE, W.F.; MCDERMOTT, P.F.; MAMMEL, M.K.; ZHAO, S.; JOHNSON, T.J.; RASKO, D.A.; FEDORKA-CRAY, P.J.; PEDROSO, A.; WHICHARD, J.M.; LECLERC, J.E.; WHITE, D.G.; CEBULA, T.A.; RAVEL, J. Antimicrobial resistance-conferring plasmids with similarity to virulence plasmids from avian pathogenic *Escherichia coli* strains in Salmonella entérica serovar Kentucky isolates from poultry. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, p. 5963-5971, 2009.

FRÖMMEL, U.; LEHMANN, W.; RÖDIGER, S.; BÖHM, A.; NITSCHKE, J.; WEINREICH, J.; GROß, J., ROGGENBUCK, D., ZINKE, O., ANSORGE, H., VOGEL, S., KLEMM, P., WEX, T., SCHRÖDER, C., WIELER, L. E SCHIERACKA, P. Adhesion of human and animal *Escherichia coli* strains in association with their virulence-associated genes and phylogenetic origins. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 19, p. 5814–5829, 2013.

GALVÃO JUNIOR, J.G.B.; BENTO, E.F.; SOUZA, A.F. Diagnóstico da realidade dos criatórios de aves na comunidade Base Física – Ipanguacu/RN. **Holos**, v.4, p.120-126, 2009.

GIROTTTO, A. F.; MIELE, M. Estudos da EMBRAPA – Situação atual e tendências para a avicultura de corte nos próximos anos. Disponível em: <http://www.aviculturaindustrial.com.br/site/dinamica.asp?id=12024&tipo_tabela=produtos&categoria=frango_de_corte> Acesso em: 20 de agosto de 2015.

GUASTALLI, E.A.L.; GUASTALLI, B.H.L.; SOARES, N.M.; LEITE, D.S.; IKUNO, A.A.; MALUTA, R.P.; CARDOZO, M.V.; BERALDO, L.G.; BORGES, C.A.; AVILA, F.A. Virulence characteristics os *Escherichia coli* isolates obtained from commercial one-week-old layer chicks with diarrhea. **African Journal of Microbiology Research**, v. 7, p. 5306-5313, 2013.

GYLES, C. L. ***Escherichia coli* in Domestic Animals and Humans**. Wallingford: CAB International, 1994. 666 p.

GYLES, C.L.; FAIRBROTHER, J.M. *Escherichia coli*. In: GYLES, C.L.; PRESCOTT, J.F.; SONGER, J.G.; THOEN, C.O. (Eds.). **Pathogenesis of bacterial infections in animals**. 4. ed. Ames: Blackwell Publishing, 2010. p. 266-308.

HACKER, J.; BLUM-OEHLER, G.; MUHLDORFER, I.; TSCHAPE, H. Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. **Molecular Microbiology**, v. 23, n. 6, p. 1089-1097, 1997.

HAMILTON-WEST, C.; ROJAS, H.; PINTO, J.; OROZCO, J.; HERVECLAUDE, L.P.; URCELAY, S. Characterization of backyard poultry production systems and disease risk in the central zone of Chile. **Research in Veterinary Science**, n. 93, p. 121-124, 2012.

HARDY, K. G. Colicinogeny and related phenomena. **Bacterioly Reviews**, v. 39, n. 4, p. 464-515, 1975.

HASAN, B.; SANDEGREN, L.; MELHUS, A.; DROBNI, M.; HERNANDEZ, J.; WALDENSTROM, 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.

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.; GUASTALLI, E.A.L.; BUIM, M.R.; GAMA, N.M.S.Q.; FRANÇA, S.B.; ALONSO, A.C.; FUJIKURA, L.M.; FERREIRA, V.C.A. Genes de virulência associados em *Escherichia coli* (APEC) isoladas de poedeiras comerciais, do meio ambiente e de água de dessedentação de granjas de postura de ovos. **Biológico**, v. 68 (Suplemento), p. 68-72, 2006.

JAKOBSEN, L.; KURBASIC, A.; SKJOT-RASMUSSEN, L.; EJRNES, K.; PORSBO, L. J.; PEDERSEN, K.; JENSEN, L. B.; EMBORG, H.; AGERSO, Y.; OLSEN, K. E. P., AARESTRUP, F. M., FRIMODT-MOLLER, N., HAMMERUM, A. M. *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**, v. 7, n. 5, 2010.

JANBEN, T.; SCHWARZ, C.; PREIKSCHAT, P.; VOSS, M.; PHILIPP, H. C.; WIELER, L. H. Virulence associated genes in avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from internal organs of poultry having died from colibacillosis. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 291, p. 371-378, 2001.

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

JOHNSON, J.R.; MURRAY, A.C.; GAJEWSKI, A.; SULLIVAN, M.; SNIPPES, P.; KUSKOWSKI, M.A.; SMITH, K.E. Isolation and Molecular Characterization of Nalidixic Acid-Resistant Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* from Retail Chicken Products. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 7, p. 2161–2168, 2003.

JOHNSON, T.J.; JOHNSON, S.J.; NOLAN, L.K. 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**, v. 188, n. 16, p. 5975-5983, 2006.

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, J.R.; JOHNSTON, B.; CLABOTS, C.R.; KUSKOWSKI, M.A.; ROBERTS, E.; DEBROUY, C. Virulence genotypes and phylogenetic background of *Escherichia coli* serogroup O6 isolates from humans, dogs and cats. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 2, p. 417-422, 2008.

KAHN, R.E.; MOROZOV, I.; FELDMANN, H.; RICHT, J.A. 6th International Conference on Emerging Zoonoses. **Zoonoses and public health**, v. 59 (Supplement 2), p. 02-31, 2012.

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

KAWANO, M.; YAGUCHI, K.; OSAWA, R. Genotypic analyses of *Escherichia coli* isolated from chickens with colibacillosis and apparently healthy chickens in Japan. **Microbiology and immunology**, v. 50, n. 12, 961-966, 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, n. 6, p. e67749, 2013.

KESKIMAKI, M.; EKLUND, M.; PERSONEN, H.; HEISKANEN, T.; SIITONEN, A. EPEC, EAEC and STEC in stool specimens: Prevalence and molecular epidemiology of isolates. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 40, p. 151 –156, 2001.

KLEIN, G.; FRANZ, C.M.A.P. The farm animal as potential reservoir of antibiotic resistant bacteria in the food chain. In: HOLZAPFEL, W.H.; NAUGHTON, P.J.; PIERZYNOWSKI, S.G.; ZABIELSKI, R.; SALEK, E. (Eds.). **Microbial ecology in growing animals**. Salt Lake: Elsevier, 2005. p. 191-207.

KNOBL, T.; MICKE MORENO, A.; PAIXAO, R., GOMES, T. A. T.; VIEIRA, M. A. M.; SILVA L. D.; FERREIRA, A. J. P. Prevalence of avian pathogenic *Escherichiacoli* (APEC) clone harboring *stfagene* in Brazil. **The Scientific World Journal**, 2012.

KOBAYASHI, R.K.T.; AQUINO, I.; FERREIRA, A.L.S.; VIDOTTO, M.C. EcoR phylogenetic analysis and virulence genotyping of avian pathogenic *Escherichia coli* strains and *Escherichia coli* isolates from commercial chicken carcasses in southern Brazil. **Foodborne Pathogenes and Disease**, v. 8, n. 5, p. 631-634, 2011.

KOCH, C. R.; RIBEIRO, J. C.; SCHNOR, O. H.; ZIMMERMANN, B. S.; MÜLLER, F. M.; D' AGOSTIN, J.; MACHADO, V.; ZHANG, L. Resistência antimicrobiana dos uropatógenos em pacientes ambulatoriais, 2000-2004. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 3, p. 277-281, 2008.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN, W.C. **Diagnóstico microbiológico-texto e atlas colorido**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 1760 p.

KUHNERT, P.; BOERLIN, P.; FREY, J. Target genes for virulence assessment of *Escherichia coli* isolates from water, food and environment. **FEMS Microbiology Reviews**. v. 24, n.1, p. 107-117, 2000.

LA RAGIONE, R.M.; WOODWARD, M. J. Virulence factors of *Escherichia coli* serotypes associated with avian colisepticaemia. **Research in Veterinary Science**, London, v. 73, n. 1, p. 27-35, 2002.

LE GALL, T.; CLERMONT, O.; GOURIOU, S.; PICARD, B.; NASSIF, X.; DENAMUR, E.; TENAILLON, O. Extraintestinal virulence is a coincidental by-product of commensalism in B2 phylogenetic group *Escherichia coli* strains. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, n. 11, p. 2373-2384, 2007.

LING, J.; PAN, H.; GAO, Q.; XIONG, L.; ZHOU, Y.; ZHANG, D.; GAO, S. E.; LIU, X. Aerobactin Synthesis Genes *iucA* and *iucC* Contribute to the Pathogenicity of Avian Pathogenic *Escherichia coli* O2 Strain E058. **PlosOne**, v.8, n. 2, 2013.

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

LLOUBES, R.; BERNADAC, A.; HOUOT, L.; POMMIER, S. Non classical secretion systems. **Research in Microbiology**, v.164, n. 1, p. 655-663, 2013.

MAGIORAKOS, A.P.; SRINIVASAN, A.; CAREY, R.B.; CARMELI, Y.; FALAGAS, M.E.; GISKE, C.G.; HARBARTH, S.; HINDLER, J.F.; KAHLMETER, G.; OLSSON-LILJEQUIST, B.; PATERSON, D.L.; RICE, L.B.; STELLING, J.; STRUELENS, M.J.; VATOPOULOS, A.; WEBER, J.T. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 18, p. 3, p. 268-281, 2011.

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, n. 4, 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.

MARCHESI, J.A.P.; ARALDI-FAVASSA, C.T. Estudo da incidência de Salmonella enteritidis em populações de galinhas caipiras no município de Concórdia (Santa Catarina, Brasil) por meio de teste sorológico. **Ágora: revista de divulgação científica**, v. 18, n. 1, p. 29-34, 2011.

MATURANA, V.G.; DE PACE, F.; CARLOS, C.; MISTRETTA PIRES, M.; AMABILE DE CAMPOS, T.; NAKAZATO, G. Subpathotypes of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) exist as defined by their syndromes and virulence traits. **Open Microbiology Journal**. v. 5, p. 55- 64, 2011.

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, n. 1, p.106-118, 1998.

MELLATA, M.; DHO-MOULIN, M.; DOZOIS, C.M.; CURTISS III, R.; LEHOUX, B.; FAIRBROTHER, J.M. Role of avian pathogenic *Escherichia coli* virulence factors in bacterial interaction with chicken heterophils and macrophages. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 1, p. 494-503, 2003.

MELLATA, M. Human and avian extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: infections, zoonotic risks, and antibiotic resistance trends. **Foodborne Pathogenes and Disease**, v. 10, n. 11, p. 916-932, 2013.

MENÃO, M.C.; FERREIRA, C.S.A.; CASTRO, A.G.M.; KNÖBL, T.; FERREIRA, A.J.P. Sorogrupos de *Escherichia coli* isolados de frangos com doença respiratória crônica. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 69, n. 4, p. 15-17, 2002.

MILES R.D.; BUTCHER, G.D.; HENRY, P.R.; LITTELL, R.C. Effect of antibiotic growth promoters on broiler performance, intestinal growth parameters, and quantitative morphology. **Poultry Science**, v. 85, n. 3, p. 476-485, 2006.

MOKADY, D.; GOPHNA, U.; RON, E.Z. Virulence factors of septicemic *Escherichia coli* strains. **International Journal of Medical Microbiology**. v. 295, n. 6, p. 455-462, 2005.

MONROY, M. A. R.; KNÖBL, T.; BOTTINO, J. A.; 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**, v. 28, p.1-15, 2005.

MOTA, R.A.; SILVA, K.P.C.; FREITAS, M.F.L.; PORTO, W.J.N.; SILVA, L.B.G. Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a multirresistência bacteriana. **Brazilian Journal Veterinary Research and Animal Science**, v. 42, n. 6, p. 465-470, 2005.

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, n.10, p. 3366-3376, 2007.

NAKAZATO, G.; AMABILE DE CAMPOS, T.; STEHLING, G. E.; BROCCHI, M.; DIAS DA SILVEIRA, W. Virulence factors of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 7, p. 479-486, 2009.

NATARO, P.J.; KAPER, B.J. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v.11, p.142-201, 1998.

NEILANDS, J. B. Iron absorption and transport in microorganism. **Annual Review of Nutrition**, Palo Alto, v. 1, p. 27-46, 1981.

NGELEKA, M.; PRITCHARD, J.; APPELYARD, G.; MIDDLETON, D.; FAIRBROTHER, J. Isolation and association of *Escherichia coli* AIDA-I/STb,

rather than EAST1 pathotype, with diarrhea in piglets and antibiotic sensitivity of isolates. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 15, n. 3, p. 242-252, 2003.

NORDSTROM, L.; LIU, C.M.; PRICE, L.B. Foodborne urinary tract infections: a new paradigm for antimicrobial-resistant foodborne illness. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, n. 29, p. 1-6, 2013.

OBENG, A. S.; RICKARD, H.; NDI, O.; SEXTON, M.; BARTON, M. Antibiotic resistance, phylogenetic grouping and virulence potential of *Escherichia coli* isolated from the faeces of intensively farmed and free range poultry. **Veterinary Microbiology**, v. 154, p. 305–315. 2012.

OH, K., KIM, D., JUNG, S. E CHO, S. Molecular characterization of enterotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated from diarrheal patients in Korea during 2003–2011. **Plos One**, v. 9, n. 5, 2014.

OKOLI, I.C. Anti-microbial resistance profiles of E.coli isolated from free range chickens in urban and rural environments of Imo State, Nigeria. **Online Journal of Health and Allied Sciences**, v. 5, n. 1, p. 3, 2006.

ORSKOV, I.; ORSKOV, F.; JANN, B.; JANN, K. Serology, Chemistry, and Genetics of O and K antigens of *Escherichia coli*. **Bacteriology Review**, v. 41, p. 667-710, 1977.

ORSKOV, F.; ORSKOV, I. *Escherichia coli* serotyping and disease in man and animal. **Canadian Journal of Microbiology**. v.37, n. 7, p.699-704, 1992.

PARREIRA , V.R.; GYLES, C.L. 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**, v. 71, n. 9, p. 5087-5096, 2003.

PFAFF-MCDONOUGH, S. J.; HORNE, S. M.; GIDDINGS, C. W.; EBERT, J. O.; DOETKOTT, C.; SMITH, M. H.; NOLAN, L. K. Complement resistance-related traits among *Escherichia coli* isolates from apparently healthy birds and birds with colibacillosis. **Avian Diseases**, v. 44, p. 23-33, 2000.

PIATTI, R. M; BALDASSI, L. Prevalência de *Escherichia coli* O78: K80 na microbiota de aves da região oeste do Estado de São Paulo. **Arquivos Instituto Biológico**, v. 74, n. 4, p. 357-359, 2007.

PITOUT, J. D. D. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: a combination of virulence with antibiotic resistance. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n. 1, p. 9, 2012.

QUINN, P.J.; MARKEY, B.K.; CARTER, M.E.; DONNELLY, W.J.; LEONARD, F.C. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**, Porto Alegre: Artmed, 2005. 512 p.

REGITANO J.B.; LEAL R.M.P. Comportamento e impacto ambiental de antibióticos usados na produção animal brasileira. **Revista Brasileira de Ciência Solo**, v. 34, p. 601-616, 2010.

RIBEIRO, A. M. L.; VOGT, L.K.; CANAL, C.W.; LAGANÁ, C.; STRECK, A.F. Suplementação de vitaminas e minerais orgânicos e sua ação sobre a imunocompetência de frangos de corte submetidos a estresse por calor. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.37, p. 636-644, 2008.

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.

ROCHA, A. C. G. P.; ROCHA; S. L. S; LIMA-ROSA, C.A.V.; SOUZA, G. F., MORAES, H. L. S.; SALLE, F. O.; MORAES, L. B.; SALLE, C.T.P. Genes associated with pathogenicity of avian *Escherichia coli* (APEC) isolated from respiratory cases of poultry. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 28, n. 3, p. 183-186, 2008.

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.

SABRI, M.; LEVEILLÉ, S.; DOZOIS, C.M. A SitABCD homologue from an avian pathogenic *Escherichia coli* strain mediates transport of iron and manganese and resistance to hydrogen peroxide. **Microbiology**, v. 152, n. 3, p. 745–758, 2006.

SAMANTA, I.; JORARDAR, S.N.; DAS, P.K.; DAS, P.; SAR, T.K.; DUTTA, T.K.; BANDYOPADHYAY, S.; BATABYAL, S.; ISORE, D.P. Virulence repertoire, characterization, and antibiotic resistance pattern analysis of *Escherichia coli* isolated from backyard layers and their environment in India. **Avian Diseases**, v. 58, n. 1, p. 39-45, 2014.

SCHOULER, C.; SCHAEFFER, B.; BRÉE, A.; MORA, A.; DAHBI, G.; BIET, F.; OSWALD, E.; MAINIL, J.; BLANCO, J.; MOULIN-SCHOULEUR, M. Diagnostic strategy for identifying avian pathogenic *Escherichia coli* based on four patterns of virulence genes. **Journal Clinical Microbiology**, v.50, n. 5, p.1673-1678, 2012.

SCHUBERT, S.; PICARD, B.; GOURIOU, S.; HEESEMAN, J.; DENAMUR, E. Yersinia high-pathogenicity island contributes to virulence in *Escherichia coli* causing extraintestinal infections. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 9, p. 5335-5337, 2002.

SILVEIRA, W. D. S; FERREIRA, A.; BROCCHI, M.; HOLLANDA, L. M.; PESTANA DE CASTRO, A. F.; YAMADA, A. T.; LANCELLOTTI, M. Biological characteristics and pathogenicity of avian *Escherichia coli* strains. **Veterinary Microbiology**, v. 85, n. 1, p. 47-53, 2002.

SINGER, R.S.; HOFACRE, C.L. Potential impacts of antibiotic use in poultry production. **Avian Diseases**, v. 50, n.2, p. 161-172, 2006.

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 Diseases**, v. 47, n. 4, p.1441-1447, 2003.

SMITH, J.L.; FRATAMICO, P.M.; GUNTHER, N.W. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Foodborn Pathogens and Disease*. v. 4, n. 2, p. 134-163, 2007.

SMITH, E.I.; REIF, J.S.; HILL, A.E.; SLOTA, K.E.; MILLER, R.S.; BJORK, K.E.; PABILONIA, K.L. Epidemiologic characterization of Colorado backyard birds flocks. **Avian Diseases**, v. 56, p. 263-271, 2012.

SONAIYA, E.B. Small Poultry Holdings, the Family and Community Development - Ethology, Ethics and Self Interest. In: Conference of the Association of Institutions for Tropical Veterinary Medicine, 10, 2001, Copenhagen. **Proceedings...** Utrecht: Association of Institutions for Tropical Veterinary Medicine, 2001. p.20-23.

THEKISOE, M.M.O.; MBATI, P.A.; BISSCHOP, S.P.R. Diseases of free ranging chickens in the Qwa-Qwa district of the northeastern free state province of South Africa. **Journal South African Veterinary Association**, v. 74, n. 1, p. 14-16, 2003.

TIVENDALE, K.A.; ALLEN, J.L; GINNS, C.A.; CRABB, B.S.; BROWNING, G.F. Association of *iss* and *iucA*, but not *tsh*, with plasmid-mediated virulence of avian pathogenic *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 72, p. 6554-6560, 2004.

TIVENDALE K.A.; LOGUE C.M.; KARIYAWASAM S.; JORDAN D.; HUSSEIN A., LI G.; WANNEMUEHLER Y.; NOLAN L.K. 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. **Infection and Immunity**, v. 78, p. 3412-3419, 2010.

TRABULSI, L.R.; TOLEDO, M.R.F. Microbiologia. Rio de Janeiro: Atheneu, p.386, 1991.

VANDEKERCHOVE, D.; DE HERDT, P.; LAEVENS, H.; BUTAYE, P.; MEULEMANS, G.; PASMANS, F. Significance of interactions between *Escherichia coli* and respiratory pathogens in layer hens flocks suffering from colibacillosis-associated mortality. **Avian Pathology**, v. 33, n. 3, p. 298-302, 2004.

VIDOTTO, M.C.; NAVARRO, H.R.; GAZIRI, L.C.J. Adherence pili of pathogenic strains of avian *Escherichia coli*. **Veterinary microbiology**, v. 59, n. 1, p. 79-87, 1997.

ZANATTA, G.F.; KANASHIRO, A.M.I.; CASTRO A.G.M.; CARDOSO, A.L.S.P.; TESSARI, E.N.C.; PULICI, S.C.P. Susceptibilidade de amostras de *Escherichia*

coli de origem aviária a antimicrobianos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 71, n. 3, p. 283-286, 2004.

ZHAO, S.; MAURER, J. J.; HUBERT, S.; DE VILLENA, J. F.; McDERMOTT, P. F.; MENG, J.; AYERS, S.; ENGLISH, L.; WHITE, D. G. Antimicrobial susceptibility and molecular characterization of avian pathogenic *Escherichia coli* isolates. **Veterinary Microbiology**, v. 107, n. 3, p. 215-224, 2005.

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.

YAGUCHI, K.; OGITANI, A.C.T.; OSAWA, A R.; KAWANO, B.M.; KOKUMA, B.N.I; KANESHIGE, A.T.; NORO, A T.; MASUBUCHI, A.K.; SHIMIZU, Y. Virulence factors of avian pathogenic *Escherichia coli* strains isolated from chickens with colisepticemia in Japan. **Avian Diseases**, n. 51, p. 656–662, 2007.

WANG, Y.; HE, T.; SCHWARZ, S.; ZHOU, D.; SHEN, Z.; WU, C.; WANG, Y.; MA, L. Detection of the staphylococcal multiresistance gene *cfr* in *Escherichia coli* of domestic-animal origin. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v.67, n.1, p.1094-1098, 2012.

WRAY C.; WOODWARD M. J. *Escherichia coli* infections in farm animals. In: SUSSMAN M. (Ed.). ***Escherichia coli* mechanism of virulence**. Cambridge: Cambridge University Press, 1997. p. 49-84.

WOODROW, G. C.; LANGMAN, L.; YOUNG, I. G.; GIBSON, F. Mutations affecting the citrate-dependente iron uptake system in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 133, n. 3, p. 1524-1526, 1978.