

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
ESPECIALIZAÇÃO EM PRODUÇÃO, TECNOLOGIA E HIGIENE EM
ALIMENTOS DE ORIGEM ANIMAL**

**Prevalência de fatores associados à virulência em amostras de *Escherichia coli*
Patogênica Aviária (APEC) isoladas de lesões de celulite aviária**

Thiago Moreira Tejkowski

Porto Alegre

2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL - UFRGS
FACULDADE DE VETERINÁRIA
ESPECIALIZAÇÃO EM PRODUÇÃO, TECNOLOGIA E HIGIENE EM
ALIMENTOS DE ORIGEM ANIMAL

**Prevalência de fatores associados à virulência em amostras de *Escherichia coli*
Patogênica Aviária (APEC) isoladas de lesões de celulite**

Autor: Thiago Moreira Tejkowski

**Monografia apresentada à Faculdade de
Veterinária como requisito parcial para obtenção
do grau de Especialista em Produção, Tecnologia
e Higiene em Alimentos de Origem Animal**

Orientador: Prof.^a Dr.^a Susana Cardoso

Porto Alegre

2012

DEDICATÓRIA

*Dedico essa monografia
a meus pais Marislei Moreira
e Lidio Adão Tejkowski,
que tanto me apoiaram!*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Lidio Adão Tejkowski e Marislei Moreira, os quais sempre acreditaram no meu sucesso.

Ao Professor Dr. Carlos Tadeu Pippi Salle, meu orientador no mestrado e ao Professor Dr. Hamilton Luiz de Souza Moraes. Obrigado pelas dicas e pelos muitos ensinamentos, permitindo a realização do experimento no CDPA.

A Professora Dr^a. Susana Cardoso, minha orientadora da especialização. Obrigado pelos momentos convvidos, aulas ministradas e orientação nessa monografia.

Ao Dr. Benito Guimarães de Brito, pesquisador do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor, pelas amostras bacterianas cedidas para realização deste e demais estudos.

Aos funcionários do CDPA, especialmente ao Silvio Luis da Silveira Rocha, pelos momentos de conversas, reflexões e dúvidas referentes ao trabalho.

Aos meus amigos que durante esta caminhada sempre me incentivaram a nunca desistir: Daiane Carvalho, Gustavo Perdoncini, Gabriela Zottis, Rita Cássia, Elisar Camilotti, Felipe Cardinal, entre outros que estiveram presentes.

Aos meus prezados Professores da Especialização. Agradeço-os pelo conhecimento que adquiri.

À todas as pessoas que por algum momento estiveram comigo nesse período de estudos.

Muito obrigado!

*“E aqui me paro a pensar
Do que a pouco ouvi dizer
Que é necessário aprender
Para depois ensinar!”*

(Jayme Caetano Braun e Luiz Marengo)

RESUMO

A *Escherichia coli* Patogênica Aviária (APEC) é a causa de doenças extra-intestinais em aves, que manifestam-se de forma localizada ou infecções sistêmicas, assim denominada colibacilose. Uma das manifestações associadas a colibacilose é a celulite aviária, a qual provoca um grande número de condenações em matadouros-frigoríficos em decorrência de lesões nas carcaças de frangos de cortes. O objetivo deste trabalho foi verificar a prevalência de fatores associados a virulência em 209 amostras APEC isoladas de carcaças de frangos com lesões de celulite aviária. Utilizou-se a técnica de multiplex-PCR, onde foram analisados a presença e/ou ausência de 38 genes associados à virulência, os quais são responsáveis pela capacidade de adesão, invasão, resistência sérica, toxinas, uma protease serina autotransportadora e uma Ilha de patogenicidade associada ao marcador CFTO 73. Todos os isolados deste estudo apresentaram pelo menos um fator de virulência relacionado à adesão, pelo menos um fator relacionado ao sistema de aquisição de ferro e pelo menos um fator relacionado com a resistência sérica, além de apresentar uma média de 17,8 fatores de virulência por isolado. Os fatores com maior prevalência foram genes responsáveis pela adesão, como *fimC* (97,12%), *fimH* (96,17%), *crl* (91,86), genes responsáveis pela resistência sérica, como *ompA* (96,65%), *traT* (90,9%), genes responsáveis por aquisição de ferro, como *iutA* (94,73%) e *iucD* (83,73%), e genes responsáveis pela invasão, como *cvaC* (80,86%). Esses resultados fornecem um panorama geral sobre as diversas características dos mecanismos de patogenicidade de cepas APEC que causam lesões de celulite aviária.

Palavras chave: Celulite aviária; Frangos de corte; APEC; Fatores de virulência.

ABSTRACT

The Avian Pathogenic Escherichia coli (APEC) is the cause of extraintestinal diseases in poultry, which manifest themselves in a localized or systemic infections, so called colibacillosis. One of the manifestations associated with avian colibacillosis is the cellulite, which causes a large number of convictions in refrigerated slaughterhouses due to injuries in broilers carcass. The objective of this study was to assess the prevalence of factors associated with virulence of APEC strains isolated from 209 chicken carcasses with lesions of avian cellulitis. We used the technique of multiplex PCR, which analyzed the presence and/or absence of 38 genes associated with virulence, which are responsible for the adhesion, invasion, serum resistance/protectins, toxins, a serin protease autotransporter and a pathogenicity-associated island marker CFT073. All isolates in this study had at least one virulence factor related to adhesion, at least one related to the acquisition system iron and a at least factor related to serum resistance, and presents an average of 17.8 virulence factors per isolate. The factors most prevalent, were the genes responsible for adhesion, as fimC (97,12%), fimH (96,17%), crl (91,86), genes responsible for serum resistance, as ompA (96,65%), traT (90,9%), genes responsible for iron acquisition, as iutA (94,73%) and iucD (83,73%) and genes responsible for invasion, as cvaC (80,86%). These results provide an overview of the various characteristics of the pathogenic mechanisms of APEC strains that cause avian cellulitis lesions.

Keywords: *Avian cellulitis, Broilers, APEC, Virulence factors.*

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Genes alvos, tamanho do fragmento, grupos de multiplex-PCR e suas descrições	10
Tabela 2 - Frequência de genes associados a virulência em 209 amostras APEC isoladas de lesões de celulite detectados por multiplex-PCR	12

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Produtos de amplificação de quatro ensaios multiplex-PCR (MP), amplificados separadamente usando conjunto de <i>primers</i>	22
Figura 2 - Produtos de amplificação de um ensaio de multiplex-PCR (MP), amplificados separadamente usando conjunto de <i>primers</i>	23
Figura 3 - Produtos de amplificação de um ensaio de multiplex-PCR (MP), amplificados separadamente usando conjunto de <i>primers</i>	23

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	10
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
2.1	<i>Escherichia coli</i>	12
2.1.1	Fatores de virulência associados à <i>Escherichia coli</i>	13
2.1.1.1	Adesinas	13
2.1.1.2	Invasinas	14
2.1.1.3	Sistemas de aquisição de ferro	15
2.1.1.4	Resistência sérica	15
2.1.1.5	Toxinas	16
2.2	<i>Escherichia coli</i> Patogênica Aviária (APEC).....	16
2.2.1	Celulite Aviária	17
2.2.2	Fatores de virulência associados à APEC	18
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
3.1	Local do estudo.....	19
3.2	Amostras bacterianas.....	19
3.3	Pesquisa dos fatores associados a virulência	19
3.3.1	Extração do DNA	21
3.3.2	Realização dos conjuntos de Multiplex-PCR.....	21
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	22
4.1	Ensaio de PCR	22
4.2	Distribuição dos genes de virulência	24
5	CONCLUSÕES.....	28
	REFERÊNCIAS.....	29

1 INTRODUÇÃO

A avicultura brasileira vem, ano a ano, superando os seus próprios recordes e conquistando mercados mais exigentes. O país se tornou o terceiro produtor mundial e líder em exportação. Atualmente, a carne de frango nacional chega a 142 países e até 2020 a expectativa é que a produção de carne de frango suprirá 48,1% das exportações mundiais (BRASIL, [2012]). A produção da carne de frango chegou a 12,230 milhões de toneladas em 2010, com um crescimento de 11,38% em relação a 2009, quando foram produzidos 10,980 milhões de toneladas. Com este desempenho o Brasil se aproxima da China, cuja produção em 2010 foi de 12,550 milhões de toneladas, abaixo apenas dos Estados Unidos, com 16,648 milhões de toneladas, conforme projeções do Departamento de Agricultura dos EUA (USDA) (UBABEF, [2011]).

A intensificação da produção na criação de aves aumentou o risco de ocorrência de epidemias, cujas consequências financeiras podem ser muito graves. Patologias como salmonelose, colibacilose e micoplasmose, que são endêmicas em certas granjas, levam a produção mais baixa, à qualidade inferior do produto, ou até mesmo a mortalidade. Mesmo com rigorosa seleção genética das avós, matrizes e pintos de um dia, as patologias a campo ainda são frequentes exigindo a manutenção de pesquisas nas diferentes áreas (LOVATO, 2009).

O termo colibacilose vem sendo utilizado como indicativo de infecções localizadas ou sistêmicas, causadas total ou parcialmente pela *Escherichia coli*, a qual é responsável por vários processos patológicos nas aves, atuando como agente primário ou secundário na aerossaculite, saculite, pericardite, peri-hepatite, peritonite, salpingite, onfalite, sinovite, coligranuloma, síndrome da cabeça inchada e celulite, entre outros. Uma pequena porção da população de *E. coli* possui fatores de patogenicidade, embora ambas, amostras patogênicas e apatogênicas, convivam harmoniosamente na mesma ave. Em determinadas condições de estresse e de debilidade das aves, a porção patogênica pode aumentar, alterando o equilíbrio bacteriano (ANDREATTI FILHO, 2006).

Em função da produção em larga escala, do tipo de criação e do manejo de frangos de corte, as lesões cutâneas, como a celulite aviária, vêm-se tornando cada vez mais frequentes, sendo uma das maiores responsáveis por condenações totais e parciais de carcaças em todo o mundo, com crescentes prejuízos à avicultura (VIEIRA *et al.*, 2006).

De acordo com Ngeleka *et al.* (1996) e Kumor *et al.* (1998) embora não se saiba o potencial que as estirpes isoladas de celulite têm de causar doenças em humanos, as

habilidades em adquirir fatores de virulência por transferência genética são fatores a serem considerados. Amostras APEC e *Escherichia coli* extraintestinal humanas podem encontrar desafios similares quando estabelecem uma infecção e, com isso, podem compartilhar um conteúdo similar de genes de virulência e capacidade de causar doenças. O conhecimento sobre as características de virulência de patótipos de *Escherichia coli*, que causam frequentes infecções nos homens e animais, tem aumentado consideravelmente ao longo dos anos.

Com base nessas premissas, esse trabalho tem o objetivo de verificar a prevalência de fatores associados a virulência de amostras de *Escherichia coli* isoladas de carcaças de frangos de corte com lesões de celulite aviária, oriundas de matadouros-frigoríficos da região sul do Brasil.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Escherichia coli*

O gênero *Escherichia* é composto de várias espécies, mas somente a *Escherichia coli* (*E. coli*) é um importante patógeno dos animais. Essa espécie é a principal bactéria gram-negativa facultativa da flora normal do trato gastro intestinal (HIRSH; ZEE, 2003, p. 219-230).

Há poucos microrganismos tão versáteis quanto à bactéria Gram-negativa *E. coli* (KAPER, *et al.*, 2004). A *E. coli* foi descrita, pela primeira vez, em 1885, por Theobald Escherich. São bastonetes, não esporulados, geralmente de 2-3 x 0,6 µm, pertencem à família Enterobacteriaceae, possuem metabolismo aeróbio e anaeróbio facultativo, crescem em temperaturas de 18 a 44° C, são catalase positivos, oxidase negativos e podem ser móveis pela presença de flagelos peritríqueos (BARNES *et al.*, 2008).

Sua distribuição é cosmopolita e é o principal habitante do trato gastrointestinal de animais, incluindo aves. Em frangos, há aproximadamente 10⁹ unidades formadoras de colônias (UFC) de bactérias por gramas de fezes, dessas, 10⁶ são *E. coli*, das quais de 0-15% são de sorogrupos patogênicos (GROSS, 1994). A diversidade patogênica de *E. coli* é enorme, a espécie compreende várias categorias de amostras que causam infecção intestinal por diferentes mecanismos e várias outras especificamente associadas com infecções urinárias, meningites e outras infecções extra-intestinais (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

Os patógenos intestinais podem ser divididos em patotipos, genericamente denominados de *E. coli* diarreiogênica (DEC) do termo em inglês “*Diarrheagenic Escherichia coli*”, os quais são geralmente definidos por várias características como: modo de transmissão, características do hospedeiro afetado, sorotipos e sorogrupos, fenótipos de interação com as células epiteliais intestinais, mecanismos de patogenicidade e determinantes genéticos de virulência. Atualmente, seis distintas categorias patogênicas (patotipos) de amostras de *E. coli* patogênica intestinal são conhecidas: EPEC (*E. coli* enteropatogênica), ETEC (*E. coli* enterotoxigênica), EIEC (*E. coli* enteroinvasiva), EAEC (*E. coli* enteroagregativa), STEC/EHEC (*E. coli* produtora de toxina Shiga), DAEC (*E. coli* difusamente aderente) (RUSSO; JOHNSON, 2000; KAPER, *et al.*, 2004). Além destas, Russo e Johnson (2000) propuseram a denominação ExPEC (*E. coli* patogênica extra-intestinal) para englobar todas as *E. coli* que são isoladas de infecções extraintestinais, entre estas,

encontram-se as UPEC (*E. coli* uropatogênica), NMEC (*E. coli* associada à meningite neonatal) e APEC (*Escherichia coli* patogênica aviária).

As amostras de *E. coli* possuem diversos determinantes antigênicos localizados principalmente na parede celular, como antígenos somáticos (O), antígenos flagelares (H), antígenos capsulares (K) e fímbrias (P), os quais são usados para sorotipagem de *E. coli* (QUINN *et al.*, 2005). Classificados de acordo com o esquema de Kauffmann, existem aproximadamente 180 antígenos O, 60 antígenos H e 80 antígenos K. Na maioria dos esquemas de tipificação sorológica somente os antígenos O e H são determinados, como a *E. coli* O157:H7. O antígeno O determina o sorogrupo enquanto o antígeno H determina o sorotipo (BARNES *et al.*, 2008).

As enterobactérias apresentam ou produzem uma gama de fatores de virulência potencialmente comprovados. A maioria desses fatores de virulência é expressa pelas variedades patogênicas de *E. coli*, *Shigella*, *Salmonella* e *Yersinia* (TRABULSI & ALTERTHUM, 2008).

2.1.1 Fatores de virulência associados à *Escherichia coli*

Linhagens patogênicas de *Escherichia coli* possuem fatores de virulência que permitem a colonização das superfícies das mucosas e a subsequente produção da doença. Os fatores de virulência de linhagens patogênicas de *Escherichia coli* incluem cápsula, endotoxina, estruturas responsáveis por colonização como adesinas, invasinas, sistema de aquisição de ferro, resistência sérica, enterotoxinas e outras substâncias secretadas (QUINN *et al.*, 2005).

2.1.1.1 Adesinas

A aderência com as células da mucosa ocorre através das adesinas bacterianas que se localizam ao longo ou na ponta das fímbrias. As adesinas estabelecem ligações mecanicamente estáveis entre as bactérias e as células do hospedeiro (SMYTH *et al.*, 1994). A interação com as células da mucosa ocorre através do reconhecimento de receptores específicos da membrana plasmática da célula alvo pelas adesinas bacterianas (EISENSTEIN, 1987). Uma bactéria pode apresentar mais de 400 estruturas fimbriadas na sua superfície (ANTÃO *et al.*, 2009). A classificação das fímbrias e adesinas são

determinadas pela morfologia e habilidade de promover aglutinação de hemácias de diferentes espécies. Em função desta característica, são também denominadas de hemaglutininas (EISENSTEIN, 1987).

Entre as diversas fimbrias encontradas em *Escherichia coli* a fimbria tipo 1 esta relacionada com a capacidade da bactéria em aderir ao epitélio do trato respiratório superior (WOOLEY *et al.*, 1998). O “operon” *pil* é o responsável por codificar a fimbria do tipo 1 (HULL *et al.*, 1981), o qual compõem um conjunto de pelo menos oito genes (operon *fim*), entre eles *fimA*, *fimB*, *fimC*, *fimD*, *fimE*, *fimF*, *fimG* e *fimH*. A fimbria P ou F11 (Pyelonephritis-associated pilus ou P blood antigen) codificada por um conjunto de 11 genes cromossômicos denominado “operon” *pap* é também encontrada em amostras de *Escherichia coli* (LATHAM; STAMM, 1984).

Antão *et al.* (2009), relataram outras fimbrias e adesinas relacionadas com a *Escherichia coli*, como a fimbria curli, a qual é codificada pelo gene *crl* (Curli fiber gene) e é formada por uma estrutura enrolada encontrada na superfície externa das cepas de *E. coli*; a fimbria S, codificada pelo gene cromossômico *sfa/focCD* (S fimbriae sialic acid-specific and FIC fimbriae), associada à meningite do recém-nascido (NMEC) e a isolados de *E. coli* associado a septicemia; a adesina codificada pelo gene *afa* (Afimbrial), que está associada às *E. coli* enteropatogênicas e uropatogênicas humanas; as Fimbrias Dr ou O75X que são expressas principalmente em isolados de UPEC pertencentes ao sorogrupo O75, assim codificadas pelos genes do operon *dra* (Dr antigen-specific adhesin).

2.1.1.2 Invasinas

Muitos patógenos desenvolveram estratégias para anexar, invadir e atravessar o epitélio. Entre essas estratégias, algumas bactérias patogênicas rompem a barreira do epitélio por ser citotóxicas às células epiteliais (KEHL-FIE & GEME, 2007) ou pela ativação de seu programa de apoptose (KIM *et al.*, 1998), enquanto outros atravessam o epitélio invadindo células epiteliais (mecanismo transcelular) ou através do cruzamento entre elas (mecanismo paracelular) (KIM, 2008). Uma forma pela qual as bactérias sobrevivem no interior dos seus hospedeiros é pelo processo de invasão, que proporciona aos microrganismos uma forma de permanecer no hospedeiro sem estar em contato com os efeitos do soro (BARBIERI, 2010).

Entre os genes de virulência associados à invasão em cepas APEC encontram-se o homólogo de proteína Tia (*toxigenic invasion locus in ETEC strains*), a ilha de

patogenicidade *gimB* (*Genetic island associated with newborn meningitis*) e o gene *ibeA* (*Invasion of brain endothelium*) (EWERS *et al.*, 2007).

2.1.1.3 Sistemas de aquisição de ferro

Um fator de virulência comum em microrganismos que causam infecções sistêmicas em humanos e animais é a capacidade de se multiplicar em meios com restrição do íon ferro (SUSSMAN, 1997). *E. coli* podem efetuar o transporte deste mineral por meio dos sistemas ferricromo, enterobactina, citrato e aerobactina (WOODROW *et al.*, 1978). O sistema aerobactina é a forma de captação e transporte de ferro mais utilizada pela bactéria e na ausência de genes para aerobactina a hemolisina deve servir como um mecanismo alternativo (MONTGOMERIE *et al.*, 1984).

A aerobactina é codificada pelo operon composto pelos genes *iucABC* e *iut*, que podem estar em plasmídeos ou no cromossomo (VIDOTTO *et al.*, 1990). O sistema transportador de ferro é codificado pelo gene *sitABCD* (*Salmonella iron transport system gene*), que pode ser encontrado tanto no cromossomo quanto no episossomo (SABRI *et al.*, 2006). Existem outros genes, também tem a função de aquisição de ferro, entre eles podemos encontrar: *fyuA* (*Ferric yersinia uptake - yersiniabactin receptor*) e *irp2* (*Iron repressible protein yersiniabactin synthesis*) (SCHUBERT *et al.*, 2002), *chuA* (*Heme receptor gene - E. coli haem utilization*) (LI, *et al.*, 2005), e *ireA* (*Iron-responsive element*) (RUSSO *et al.*, 2001).

2.1.1.4 Resistência sérica

A resistência sérica também parece ser um mecanismo importante de virulência da APEC, e pode desempenhar um papel na patogênese da colibacilose aviária, visto que bactérias sensíveis ao soro 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 (DHO-MOULIN; FAIRBROTHER, 1999). O gene que codifica a proteína Iss (*increased serum survival*), o gene cromossômico *ompA* (*Outer membrane protein*) que codifica uma proteína da membrana externa (NOLAN *et al.*, 2003), a proteína TraT codificada pelo gene *traT* (*Transfer Protein*) (SUKUPOLVI *et al.*, 1990), a cápsula do tipo

K1, codificada pelo gene *neuC* (K1 capsular polysaccharide) (BRÉE *et al.*, 1989), os genes *kpsMT II* (*Group II capsule antigens*) que codificam as proteínas KpsM (ARRECUBIETA *et al.*, 2000) são alguns genes envolvidos na resistência séria da APEC.

2.1.1.5 Toxinas

As bactérias patogênicas produzem muitas substâncias que são diretamente ou indiretamente tóxicas para as células do hospedeiro. Algumas proteínas microbianas secretadas, geralmente enzimas, são chamadas de exotoxinas, pois podem em baixas concentrações matar a célula (FINLAY; FALKOW, 1997). Algumas linhagens de *E. coli* são capazes de produzir toxinas, como as enterotoxinas termolábeis e termoestáveis (SMITH; GYLES, 1970), e as verotoxinas, conhecidas também como “shiga-like toxins” (PARREIRA; YANO, 1998).

Várias toxinas produzidas pelas *E. coli* já foram descritas, entre elas podemos citar: a toxina de vacuolização codificada pelo gene *vat* (*vacuolating toxina autotransporter*) que induz a formação de vacúolos intracelulares, resultando em efeitos citotóxicos (PARREIRA & GYLES, 2003), a hemolisina A ou α -hemolisina que é codificada pelo gene *hlyA* (Hemolysin A), as quais são proteínas que são secretadas extracelularmente por algumas cepas de *E. coli* e possuem uma ação citotóxica para uma variedade de tipos de células (FINLAY; FALKOW, 1997), uma toxina chamada de EAST1 (*Escherichia coli* enteroagregativa endotoxina termo estável 1) que codificada pelo gene *astA*, o qual foi primeiramente observado em cepas de *E. coli* enteroagregativa (EAggEC) (MÉNARD *et al.*, 2002), uma toxina codificada pelo gene *cnf 1/2* (*Cytotoxic necrotizing factor*) (DE RYCKE *et al.*, 1999), a proteína Sat que é codificada pelo gene *sat* (*secreted autotransporter toxin*) (GUYER *et al.*, 2000), entre outras.

2.2 *Escherichia coli* Patogênica Aviária (APEC)

As *E. coli* patogênicas aviárias são a causa de doenças extra-intestinais em aves e são habitantes normais da flora gastrointestinal e do ambiente de produção, sendo possível encontrar nos aviários 10^6 UFC/g de fezes, tornando praticamente impossível a eliminação deste agente no ambiente (GROSS, 1994). Acredita-se que apenas cepas específicas de *E. coli* são dotadas de fatores de virulência, permitindo-lhes causar doença (DELICATO *et al.*,

2003), a qual manifesta-se de forma localizada ou infecções sistêmicas, assim denominada colibacilose (FERREIRA; KNÖBL, 2009).

A colibacilose nas aves é considerada uma das principais doenças da avicultura industrial moderna e responsável por grandes prejuízos econômicos no mundo inteiro. O aparecimento da colibacilose é o resultado da interação da bactéria com o hospedeiro e o meio ambiente, podendo assim, causar colisepticemia ou lesões como peritonite, pneumonia, pleuropneumonia, aerossaculite, pericardite, celulite, coligranuloma, donça respiratória crônica complicada (DRCC), onfalite, salpingite, síndrome da cabeça inchada (SCI), panoftalmia, osteomielite, ooforite e sinovite (FERREIRA; KNÖBL, 2009).

Uma das doenças mais importantes causadas por APEC é a colisepticemia, a qual geralmente inicia-se no trato respiratório superior das aves, seguido de uma infecção viral primária ou por micoplasma (BARNES *et al.*, 2008; JORDAN; PATTISON, 1996), que muitas vezes, são referidas como doenças dos sacos aéreos. Outras doenças causadas por linhagens de APEC que têm apresentado grande importância em diversos países, inclusive no Brasil, são a onfalite, a qual se caracteriza por uma necrose do tecido do cordão umbilical das aves, que pode se estender à cavidade abdominal e ocasionar peritonite e pericardite (BARNES *et al.* 2008) e a celulite aviária, uma dermatite necrótica que leva a um grande número de condenações em matadouros-frigoríficos em decorrência de lesões na carcaça (REVOLLEDO; FERREIRA, 2009).

2.2.1 Celulite Aviária

A celulite aviária é uma das manifestações associadas a infecções por *E. coli* que acometem frangos de corte, levando a um grande número de condenações em matadouros-frigoríficos em decorrência de lesões de carcaça (REVOLLEDO; FERREIRA, 2009). A lesão de celulite é caracterizada como uma inflamação purulenta, aguda e difusa do tecido subcutâneo profundo que envolve camadas celulares, havendo a formação de placas fibrino-caseosas no subcutâneo (FALLAVENA, 2000), localiza-se principalmente nas regiões de abdômen e sobrecoxa, podendo estar presente também em cabeça e pescoço, coxa, dorso, asas, peito e região cervical, sendo frequentemente unilateral (VIEIRA *et al.*, 2006).

No Brasil a celulite é responsável por 45,2% da condenação de carcaças por lesões de pele e as perdas econômicas chegam a US\$ 10 milhões por ano (BRITO; GAZIRI; VIDOTTO, 2003).

Segundo Gyles (1994) a etiologia da celulite aviária é multifatorial, pois são necessários, pelo menos, dois fatores para a sua ocorrência. Em primeiro, está à necessidade de um trauma qualquer que resulte em ferimento na pele, independente da razão, em segundo a presença maciça de contaminação bacteriana por *E. coli*.

Uma das causas relevantes da celulite aviária é a compactação da cama do aviário, a qual causa lesões na região do peito e a umidade favorece a multiplicação bacteriana que encontra facilidades para penetrar e causar a inflamação. As más condições dos comedouros, bebedouros e as instalações em geral do galpão podem ocasionar um aumento de lesões cutâneas, outros fatores como a presença de agentes virais e químicos, também pode contribuir. Além disso, outras bactérias podem estar envolvidas no processo da celulite, mas a *Escherichia coli* é o principal agente infeccioso isolado em casos de celulite e os sorogrupos O1, O2, O71 e O78 são os mais prevalentes (NGELEKA *et al.*, 1996).

No matadouro-frigorífico as lesões de celulite são descritas por possuírem uma área de 1 x 2 cm² a 4 a 10 cm² e com espessura de 3-5 mm, porém, em alguns casos, pode ser observada uma massa semi-sólida com superfície de 1 x 2 cm (GOMIS *et al.* 1997). Em experimentos que visam induzir a lesão em aves com mais de 20 dias de idade as características das lesões são as mesmas das observadas em matadouros-frigoríficos (JEFFREY *et al.*, 1999).

2.2.2 Fatores de virulência associados à *Escherichia coli* Patogênica Aviária

Para ser patogênica a *Escherichia coli* deve possuir genes associados à virulência. Considerando que os patótipos intestinais de *Escherichia coli* já são bem definidos, nenhum gene ou grupo de genes define o patotipo APEC (EWERS *et al.*, 2007; RODRIGUES-SIEK *et al.*, 2005). No entanto, sabe-se que os genes associados à virulência mais frequentemente associadas a patogenicidade APEC incluem as adesinas, resistência sérica, sistema de aquisição de ferro, colicina V, hemolisina (JOHNSON, T. J. *et al.*, 2006), a multiresistência a drogas antimicrobianas, a motilidade, a presença de grandes números de plasmídeos e a invasibilidade celular (BARNES *et al.*, 2008). A fim de definir a relação genética de isolados APEC, uma grande variedade de genes de virulência são pesquisados para ganhar uma compreensão mais profunda deste patótipo (EWERS *et al.*, 2007, BARBIERI *et al.*, 2012).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Local de estudo

O presente estudo foi conduzido no Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária (CDPA), na Faculdade de Veterinária, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), em Porto Alegre.

3.2 Amostras bacterianas

Foram utilizadas 209 amostras APEC, isoladas de carcaças de frangos de corte com celulite aviária, as quais foram coletadas entre os anos de 2006 e 2009 em matadouros-frigoríficos da região sul do Brasil. Os isolados foram cedidos pelo Dr. Benito Guimarães de Brito do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor – IPVDF/Eldorado do Sul/RS, os quais estavam armazenados em BHI (*Brain Heart Infusion*) com glicerol (-80°C) e hoje fazem parte da coleção de culturas do Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária.

3.3 Pesquisa dos fatores associados a virulência

As amostras APEC foram investigadas para 38 genes associados a virulência da espécie *Escherichia coli* pela técnica de multiplex-PCR (Reação em Cadeia da Polimerase). Os genes alvos e suas descrições, bem como o tamanho do fragmento e os conjuntos de multiplex-PCR para os procedimentos de amplificação estão representados na Tabela 1.

Tabela 1 – Genes alvos, tamanho do fragmento, grupos de multiplex-PCR e suas descrições

Multiplex-PCR / Fonte	Genes	Características	Tamanho do fragmento	
Multiplex 1 Ewers et al. (2001)	1	<i>kpsMT II</i>	Antígeno cápsular do Grupo II	280 pb
	2	<i>hlyA</i>	Hemolisina A	350 pb
	3	<i>pic</i>	Protease Serina Autotransportadora	409 pb
	4	<i>fimC</i>	Fimbria tipo 1 (Adesina D-manose-específica)	477 pb
	5	<i>hra</i>	Aglutinina resistente ao calor	537 pb
	6	<i>iha</i>	Gene homologo-ferro-regulado	609 pb
	7	<i>neuC</i>	Polissacarídeo capsular K1	676 pb
	8	<i>afa/draB</i>	Adesina afimbrial (operon) / Dr adesina antígeno-específica	810 pb
	9	<i>malX = Rpai</i>	Ilha de patogenicidade associada ao marcador CFTO 73	922 pb
	10	<i>sfa/focC</i>	Fimbria S (operon) - ácido siálico específicos - e fimbrias F1CD	1242 pb
Multiplex 2 Ewers et al. (2001)	1	<i>chuA</i>	Gene da proteína Heme (transporte) da EHEC	278 pb
	2	<i>ibeA</i>	Proteína de Invasão do endotélio cerebral de <i>E. coli</i>	342 pb
	3	<i>traT</i>	Proteína de transferência	430 pb
	4	<i>sitD chr</i>	Gene do sistema de transporte de ferro da Salmonella	554 pb
	5	<i>gimB</i>	Ilha genética associada com a meningite neonatal	736 pb
	6	<i>ironA</i>	Catecolatos sideróforos (salmochelin)	847 pb
	7	<i>ompA</i>	Proteína da membrana externa	919 pb
	8	<i>SitD ep.</i>	Gene do sistema de transporte de ferro da Salmonella	1052 pb
Multiplex 3 Ewers et al. (2001)	1	<i>astA</i>	EAST1 (calor estável associado a citotoxina de <i>E. coli</i> enteroagregativa)	116 pb
	2	<i>iss</i>	Aumento da sobrevivência sérica	309 pb
	3	<i>irp2</i>	Aerobactina (repressor) - Proteína ferro repressor (síntese yersiniabactin)	413 pb
	4	<i>papC</i>	Pilus associado com pielonefrite	501 pb
	5	<i>cvi/cva</i>	Gene estrutural do operon do plasmídeo ColV	598 pb
	6	<i>iucD</i>	Aerobactina (Síntese)	714 pb
	7	<i>tsh</i>	Proteína Tsh - Hemaglutinina sensível a temperatura	824 pb
	8	<i>vat</i>	Toxina autotransportadora que induz formação de Vacuolos	981 pb
Multiplex 4 Ewers et al. (2001)	1	<i>crl</i>	Fimbria “curli” (regurador)	270 pb
	2	<i>ireA</i>	Elemento ferro-responsivo	384 pb
	3	<i>cnf1/2</i>	Fator necrosante citotóxico	446 pb
	4	<i>tia</i>	Invasão de Locus toxigênicos em ETEC	512 pb
	5	<i>sat</i>	Toxina autotransportadora secretada	667 pb
	6	<i>fyuA</i>	Aerobactina - Férrico captação de Yersinia (receptor yersiniabactin)	774 pb
	7	<i>mat</i>	Fimbrias associadas a Meningite e regulação da temperatura	889 pb
Multiplex 5 Rocha (2008)	1	<i>felA</i>	Codificadora da fimbria 11	270pb
	2	<i>iutA</i>	Presença de aerobactina: captação e transporte de ferro	300pb
	3	<i>cvaC</i>	Produção de colicina	680pb
Multiplex 6 (Dados não publicados)	1	<i>papG</i>	Fimbria P ou F 11	508pb
	2	<i>fimH</i>	Fimbria do tipo 1	1070pb

3.3.1 Extração do DNA

Para extração do DNA das amostras armazenadas em BHI (*Brain Heart Infusion*) com glicerol, foi retirado uma alicota de 50µL para serem reativadas em caldo BHI, as quais permaneceram em estufa bacteriológica por 24 horas a 37°C, após foram isoladas colônias em Ágar BHA (*Brain Heart Agar*) e Agar EMB (*Eosin Methylene Blue Agar*) que permaneceram o mesmo tempo e temperatura na estufa bacteriológica. Com isso, foram coletadas de três a quatro colônias bacterianas com uma alça de platina a partir do Agar BHA, que foram solubilizadas em 200 µL de água miliQ (miliopore) em um eppendorf, após resfriadas a -20°C por 10 minutos (congelador) e em seguida aquecidas a 100°C por 10 minutos (água fervente), e centrifugado a 14.000xg por 10 minutos. Os sobrenadantes contendo o DNA foram retirados e armazenados a -20 ° C até o momento da análise.

3.3.2 Realização dos conjuntos de Multiplex-PCR

A detecção dos 38 genes de virulência foi realizada em seis multiplex-PCRs, sendo que a presença de 33 genes foram investigados de acordo com 4 protocolos de multiplex-PCR desenvolvidos por Ewers *et al.* (2007), 3 genes através do multiplex-PCR de Rocha (2008) e o multiplex 6 para os genes *fimH* e *papG* foram investigados através de um multiplex-PCR desenvolvido pelo CDPA. A mistura de reação deste multiplex é de 25 µL, incluindo 2,5 µL de tampão 10X, 1,25 µL de MgCl₂ 2,5mM, 0,3 µL de Taq DNA polimerase (1,5 U), 0,5 µL de cada dNTP à 2,5 mM, 2 µL de cada um dos *primers* (20 pmol) e 5 µL de DNA bacteriano, complementado com o volume adequado de água ultra pura.

Todas as reações de amplificação foram realizadas em Termociclador (Marca: Biocycler – Modelo: Peltier Thermal Cycler MJ96+ / MJ96G), a eletroforese dos produtos amplificados foi feita em gel de agarose à 1,5%, corado com brometo de etídio e para visualização foi utilizado o sistema de fotodocumentação através de transluminador Ultra-Violeta (UV).

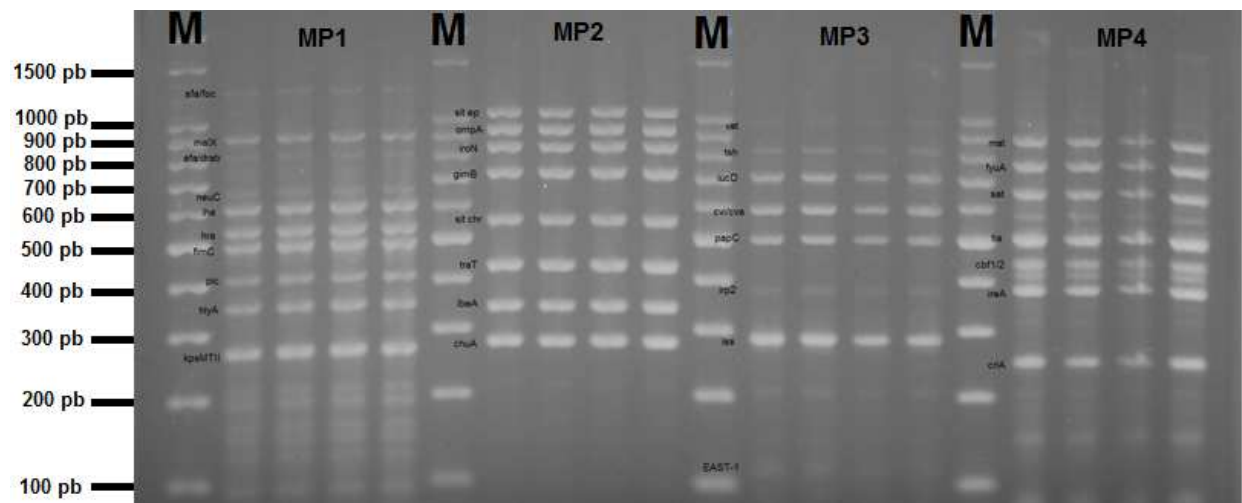
Como indicador de massa molecular foi utilizado, em cada eletroforese, um marcador de 100 pb (*Invitrogen*®).

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Ensaios de PCR

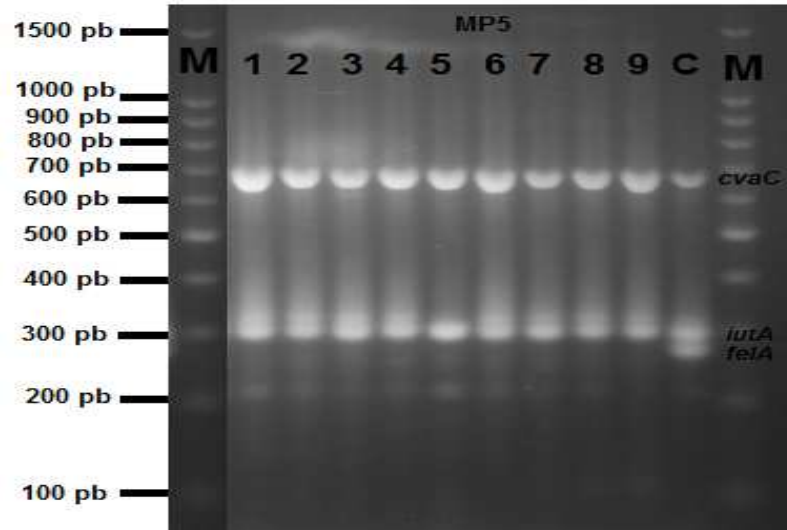
O conjunto dos seis ensaios de multiplex PCR conseguiu amplificar os 38 genes associados à virulência, sendo que 33 genes foram amplificados conforme Ewers *et al.* (2007) (Figura 1), 3 genes conforme Rocha (2008) (Figura 2) e 2 genes conforme multiplex-PCR desenvolvido pelo CDPA (Figura 3).

Figura 1 – Produtos de amplificação de quatro ensaios multiplex-PCR (MP), amplificados separadamente usando conjunto de *primers*.



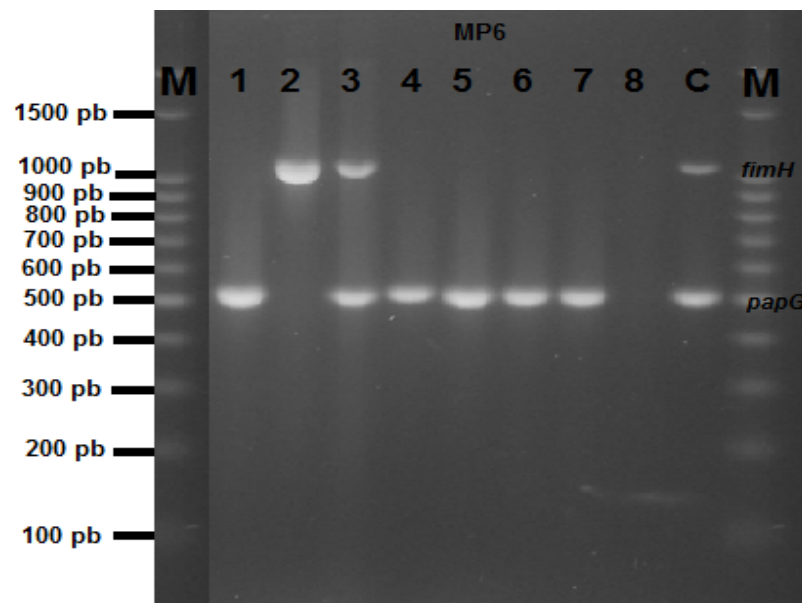
Legenda: M: Marcador de peso molecular de 100 pb. MP 1: *pool* de DNA das amostras NMEC IMT9267 e UPEC IMT7920 (amplificações: *kpsMTII* [280 pb], *hlyA* [352 pb], *pic* [409 pb], *fimC* [477 pb], *hra* [537 pb], *iha* [609 pb], *neuC* [676 pb], *afa/draB* [810 pb], *malX* [922 pb] e *sfa/foc* [1242 pb]). MP 2: amostra APEC IMT5155 (amplificações: *chuA* [278 pb], *ibeA* [342 pb], *traT* [430 pb], *sit chr.* [554 pb], *gimB* [736 pb], *iroN* [847 pb], *ompA* [919 pb] e *sit ep.* [1052 pb]). MP 3: amostra APEC IMT2470 (amplificações: *EAST-1* [116 pb], *iss* [309 pb], *irp2* [413 pb], *papC* [501 pb], *cvi/cva* [598 pb], *iucD* [714 pb], *tsh* [824 pb] e *vat* [981 pb]). MP IV: *pool* de DNA das amostras NMEC IMT9267 e UPEC IMT1200 (amplificações: *crlA* [250 pb], *ireA* [384 pb], *cnf1/2* [446 pb], *tia* [512 pb], *sat* [667 pb], *fyuA* [774 pb] e *mat* [899 pb]).

Figura 2 – Produtos de amplificação de um ensaio de multiplex-PCR (MP), amplificados separadamente usando conjunto de *primers*.



Legenda: M: Marcador de peso molecular de 100 pb. MP 5: 1 à 9 são amostras APEC isoladas de lesões de celulite. Amostra controle positivo (C) CC 192 (amplificações: *feiA* [270 pb], *iutA* [300 pb] e *cvaC* [680 pb]).

Figura 3 – Produtos de amplificação de um ensaio de multiplex-PCR (MP), amplificados separadamente usando conjunto de *primers*.



Legenda: M: Marcador de peso molecular de 100 pb. MP 6: 1 à 8 são amostras APEC isoladas de lesões de celulite. Amostra controle positivo (C) CC 158 (amplificações: *papG* [508 pb] e *fimH* [1070 pb]).

4.2 Distribuição dos genes de virulência

O conjunto de genes associados à virulência encontrado com maior frequência, foram os genes responsáveis por adesão, como *fimC* (97,12%), *fimH* (96,17%), *crl* (91,86), genes responsáveis pela resistência sérica, como *ompA* (96,65%), *traT* (90,9%), genes responsáveis por aquisição de ferro, como *iutA* (94,73%) e *iucD* (83,73%), e genes responsáveis pela invasão, como *cvaC* (80,86%), outro conjunto de genes apresentou-se com baixa frequência, incluindo genes de adesão, como *afa/draB* (0%), *sfa/focCD* (2,87%), *felA* (3,34%) e *iha* (12,44%), genes responsáveis pela produção de toxinas, como *cnf1/2* (0,47%), *hlyA* (2,39%) e *sat* (11,48%) e genes responsáveis pela invasão, como *gimB* (11,96%), além de um outro conjunto de genes apresentaram frequências variadas (Tabela 2).

As cepas APEC isoladas de lesões de celulite apresentaram de 10 a 29, dos 38 fatores de virulência investigados, com uma média de 17,8 fatores de virulência por isolado. Para todos os isolados foi detectado pelo menos um fator relacionado à adesão (*afa/draB*, *crl*, *fimC*, *fimH*, *hrlA*, *iha*, *papC*, *papG*, *sfa/focC*, *tsh*, *mat* e *felA*); em média 5,23% desses fatores foram detectados nos isolados. Para todos os isolados foi detectado pelo menos um fator relacionado a aquisição de ferro (*chuA*, *fyuA*, *ireA*, *ironA*, *irp2*, *iucD*, *sitD chr*, *sitD ep* e *iutA*); em média 5,79% desses fatores foram detectados nos isolados. Para todos os isolados foi detectado pelo menos um fator relacionado à resistência sérica (*cvi/cva*, *iss*, *neuC*, *kpsMT II*, *ompA* e *traT*); em média 4,15% desses fatores foram detectados nos isolados. Em 90,44% das amostras foi detectado pelo menos um fator relacionado à invasão (*gimB*, *ibeA*, *tia* e *cvaC*); em média 1,39% desses fatores foram detectados nos isolados. Em 64,12% das amostras foi detectado pelo menos um fator relacionado à produção de toxinas (*astA*, *cnf1/2*, *sat*, *vat* e *hlyA*); em média 0,75% desses fatores foram detectados nos isolados.

A detecção de múltiplos genes que codificam fatores de virulência por multiplex PCR é um eficiente método para identificação de várias características de amostras APEC e amostras comensais simultaneamente (BARNES *et al.*, 2008). Embora, existam muitos fatores associados à virulência de cepas APEC, ainda não foi possível definir as características desse patógeno. Os resultados encontrados neste estudo, em que as cepas APEC causadoras de lesões de celulite apresentam pelo menos um fator relacionado à adesão, um fator relacionado a aquisição de ferro e um fator relacionado à resistência sérica, corroboram com estudos realizados por Brito *et al.* (2003) e Ewers *et al.* (2007).

Tabela 2 – Frequência de genes associados a virulência em 209 amostras APEC isoladas de lesões de celulite detectados por multiplex-PCR

Funções	Gene (s) ou operon	Frequência dos genes associados à virulência (%)
Adesinas	<i>afa/draB</i>	0
	<i>crl</i>	91,86
	<i>fimC</i>	97,12
	<i>fimH</i>	96,17
	<i>hrlA</i>	44,49
	<i>iha</i>	12,44
	<i>papC</i>	25,83
	<i>papG</i>	15,78
	<i>sfa/focC</i>	2,87
	<i>tsh</i>	54,54
	<i>mat</i>	79,42
	<i>felA</i>	3,34
Invasinas	<i>gimB</i>	11,96
	<i>ibeA</i>	23,92
	<i>tia</i>	22,96
	<i>cvaC</i>	80,86
Aquisição de Ferro	<i>chuA</i>	58,85
	<i>fyuA</i>	41,62
	<i>ireA</i>	64,59
	<i>ironA</i>	78,46
	<i>irp2</i>	56,93
	<i>iucD</i>	83,73
	<i>sitD chr</i>	27,75
	<i>SitD ep.</i>	72,72
	<i>iutA</i>	94,73
Resistência Sérica	<i>cvi/cva</i>	62,72
	<i>iss</i>	76,55
	<i>neuC</i>	23,92
	<i>kpsMT II</i>	66,02
	<i>ompA</i>	96,65
	<i>traT</i>	90,9
Toxinas	<i>astA</i>	35,88
	<i>cnf1/2</i>	0,47
	<i>sat</i>	11,48
	<i>vat</i>	25,35
	<i>hlyA</i>	2,39
Outros	<i>pic</i>	24,4
	<i>malX</i>	22

Resultados apresentados por Brito *et al.* (2003), referentes a análise de 15 fatores associados a virulência em 52 amostras de celulite, mostraram uma presença média de 8,13 fatores de virulência por isolado, nossos resultados foram semelhantes na presença dos genes *fimH* (92%) e *iutA* (92%). Os fatores de virulência mais prevalentes, também foram encontrados na mesma proporção por Barbieri *et al.* (2010) para *fimC* (95,8%), *crl* (88,2%), *ompA* (95,1%) e *traT* (89,6%). Numerosos estudos tem demonstrado que esses fatores de virulência estão raramente todos presentes em um mesmo isolado, mostrando que amostras APEC constituem um grupo heterogêneo. Diferentes isolados podem abrigar diferentes associações de fatores de virulência, cada um capaz de induzir a colibacilose aviária (SCHOULER *et al.* 2012).

Atualmente, os estudos com APEC estão voltados para o desenvolvimento de estratégias de diagnóstico utilizando técnicas de multiplex-PCR, observando genes que possam caracterizar esse grupo de *E. coli* e que possam diferenciar amostras APEC de UPEC (*E. coli* uropatogênica), NMEC (*E. coli* associada à meningite neonatal), AFEC (*E. coli* fecal comensal aviária), entre outras. Johnson *et al.* (2008) desenvolveu um multiplex contendo cinco fatores de virulência, entre eles *iroN*, *ompT*, *hlyF*, *iss* e *iutA*, que foi capaz de distinguir isolados APEC de isolados AFEC e nesta mesma linha de pesquisa Schouler *et al.* (2012) identificou quatro diferentes associações de genes de virulência capazes de identificar amostras APEC.

Além dessas ferramentas de diagnóstico rápido, pesquisas relevantes e significativas estão sendo desenvolvidas com a utilização de Inteligência Artificial, em especial as Redes Neurais Artificiais. As Redes Neurais Artificiais para *E. coli* visam não apenas fornecer o perfil genético da *E. coli* em um laudo bacteriológico, mas também o grau da patogenicidade da mesma, com o objetivo de facilitar as decisões dos Médicos Veterinários de campo. A construção desta ferramenta para predizer o grau da patogenicidade de cepas APEC necessita de uma pesquisa inicial de genes responsáveis pela virulência (SALLE *et al.*, 2011), desta forma, cresce em importância a caracterização genotípica dessa bactéria.

O conhecimento sobre as características de virulência de patotipos de *Escherichia coli*, que causam frequentes infecções nos homens e animais, tem aumentado consideravelmente ao longo dos anos. Ewers *et al.* (2007) após pesquisas com cepas APEC, UPEC e NMEC suportaram quatro hipóteses: que as aves podem ser veículos ou reservatórios para amostras ExPEC (*Escherichia coli* patogênica extraintestinal) humanas, que amostras APEC servem como um reservatório de genes associados a virulência para UPEC e NMEC, que algumas

amostras ExPEC, embora de diferentes patotipos, podem compartilhar ancestrais comuns e que subgrupos APEC tem de ser considerados agentes com potencial zoonótico.

5 CONCLUSÕES

Considerando que nenhum gene ou grupo de genes define o patotipo APEC, a realização de trabalhos que caracterizam melhor estas cepas e que forneçam resultados confiáveis, como a utilização do PCR para detecção de fatores associados à virulência, poderão esclarecer mais adequadamente os mecanismos de patogenicidade desta bactéria, principalmente em relação a celulite aviária. Com os resultados encontrados no presente estudo, pode-se concluir que:

1 – Todos os 209 isolados APEC de lesões de celulite aviária apresentaram pelo menos um fator de virulência relacionado à adesão, um relacionado ao sistema de aquisição de ferro e um fator de resistência sérica.

2 – Entre os 38 fatores de virulência investigados, as cepas APEC isoladas de lesões de celulite aviária apresentaram uma média de 17,8 fatores de virulência por isolado.

3 – Os genes mais frequentes encontrados nas amostras foram: *fimC* (97,12%), *ompA* (96,65%), *fimH* (96,17%), *iutA* (94,73%), *crl* (91,86%), *traT* (90,9%), *iucD* (83,73%), *cvaC* (80,86%);

4 – Os genes menos frequentes encontrados nas amostras foram: *afa/draB* (0%), *cnf1/2* (0,47%), *hlyA* (2,39%), *sfa/focCD* (2,87%), *felA* (3,34%), *sat* (11,48%), *gimB* (11,96%), *iha* (12,44%);

A necessidade de identificar as diversas características de cepas APEC que causam lesões de celulite aviária torna-se cada vez mais importante, a fim de identificar seus mecanismos de patogenicidade, fornecer ferramentas de diagnóstico rápido e suas associações com outros patotipos de *Escherichia coli* que acometem outros animais, bem como os seres humanos. Com isso, trabalhos futuros podem ser desenvolvidos baseados nessas características iniciais (genes associados à virulência), além de outras técnicas que permitam comparar amostras APEC e que possam ajudar a elucidar sua forma de desenvolver lesões em diferentes hospedeiros.

REFERÊNCIAS

- ANDREATTI FILHO, R. L.; **Saúde aviária e doenças**. São Paulo: Roca, 2006, p. 2-133.
- ANTÃO, E.M.; WIELER, L. H.; EWERS, C. Adhesive threads of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. **Gut Pathogens**, London, v.1, n. 22, 1-12, Dec. 2009.
- ARRECUBIETA, C. *et al.* The transport of group 2 capsular polysaccharides across the periplasmic space in *Escherichia coli*. Roles for the *KpsE* and *KpsD* proteins. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 276, n. 6, p. 4245-4250, 2001.
- BARBIERI, N. L. Resistência a antibióticos, prevalência dos fatores associados à virulência, tipagem filogenética e perfil filogenético de isolados de *Escherichia coli* Patogênica Aviária (APEC). 2010. 113 f. **Dissertação** (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Centro Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2010.
- BARBIERI, N. *et al.* Resistência a antimicrobianos, prevalência de fatores associados a virulência, análise filogenética e índice de patogenicidade em isolados de *Escherichia coli* patogênica aviária. In: Congresso Latinoamericano de Microbiología, 20., 2010, Montevideo. **Anais...** Montevideo: Sociedad Uruguaya de Microbiologia, 2010.
- BARBIERI, N. *et al.* Characterization of Extraintestinal *Escherichia coli* Isolated from a Peacock (*Pavo cristatus*) with Colisepticemia. **Avian Diseases**. Kennett Square, v. 56, p. 436–440, 2012
- BARNES, H. J.; NOLAN, L. K.; VAILLANCOURT, J. P. Colibacillosis. In: Calnek, B. D. (Ed.) **Diseases of poultry**. 12th ed. Ames: University Press, 2008. p. 691-738.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Exportação**. Brasília, [2012]. Disponível em: < <http://www.agricultura.gov.br/animal/exportacao>>. Acesso em: 13 ago. 2012.
- BRÉE, A.; DHO, M.; LAFONT, J. P. Comparative infectivity for axenic and specificpathogen- free chickens of O2 *Escherichia coli* strains with or without virulence factors. **Avian Diseases**, Kennett Square, v. 33, p. 134-139, 1989.
- BRITO, B. G.; GAZIRI, L. C. J.; VIDOTTO, M. C.; Virulence factors and clonal relationships among *Escherichia coli* strains isolated from broiler chickens with cellulitis; **Infection and Immunity**, Washington, v. 71, n. 7, p. 4175–4177, July 2003.
- CLERMONT, O.; BONACORSI, S.; BINGEN, E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 10, p. 4555-4558, oct. 2000.
- DELICATO E.R. *et al.* Virulence-associated genes in *Escherichia coli* isolates from poultry with colibacillosis, **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 94, n. 2, p. 97–103, July 2003.

DEREE, J. M.; SCWILLENS, P.; VANDENBOSCH, J.F. Monoclonal-Antibodies that Recognize the P-Fimbriae F71, F72, F9 and F11 from Uropathogenic *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, Washington, v. 50, n. 3, p. 900-904, 1985.

DE RYCKE, J., MILON, A.; OSWALD, E. Necrotoxic *Escherichia coli* (NTEC): two emerging categories of human and animal pathogens. **Veterinary Research**, Les Ulis, v. 2, n. 3, p. 221-33, 1999.

DHO-MOULIN, M.; FAIRBROTHER, J. M. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). **Veterinary Research**, Les Ulis, v. 30, n. 2-3, p. 299-316, 1999.

EISENSTEIN, B. I. *Fimbriae Escherichia coli* and *Salmonella Typhimurium*: cellular and Biology. **Edited by: Neidhardt, F. C.**, Washington, D. C., v. 1, p. 84-90, 1987.

EWERS, C. *et al.* Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: how closely related are they? **International Journal of Medical Microbiology**, Jena, v. 297, n. 3, p. 163-176, June 2007.

FALLAVENA, L.C.B. Enfermidades da Pele e das Penas. In: BERCHIERI JR, A.; MACARI, M.. **Doença das aves**. Campinas: FACTA, 2000. cap. 2, p. 37-47.

FERREIRA, A. J. & KNÖBL, T. Colibacilose Aviária. In: BERCHIERI, A., MACARI, M., **Doenças das Aves**. Campinas: FACTA, 2009. p. 197-205.

FINLAY, B. B.; FALKOW, S., Common themes in microbial pathogenicity revisited. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 61, n. 2, p. 136-169, June 1997.

GOMIS, S. M. *et al.* Experimental reproduction of *Escherichia coli* cellulitis and septicemia in broiler chickens. **Avian Diseases**. Kennet Square, v. 41, n.1, p. 234-240, 1997.

GROSS, W.G. Disease due to *Escherichia coli* in poultry. In: Gyles, C. L. (Ed.) **Escherichia coli in domestic animals and humans**. Oxford: Cab International, 1994. p. 237-259.

GUYER, D. M. *et al.* Identification of *Sat*, an autotransporter toxin produced by uropathogenic *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 38, n. 1, p. 53-66, Oct. 2000.

GYLES, C. L. *Escherichia coli* in Domestic Animals and Humans, Oxford, **Cab International**, 1994. p. 242-244.

HIRSH, D. C.; ZEE, Y. C.; **Microbiologia veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003, p. 219-230.

HULL, R.A. *et al.* Construction and expression of recombinant plasmids encoding type 1 or D-mannose resistant pili from a urinary tract infection *Escherichia coli* isolate. **Infection and Immunity**, Oxford, v. 33, p. 933-938, 1981.

JANSSEN, T. *et al.* Virulence-associated genes in avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from internal organs of poultry having died from colibacillosis. **Journal of Medical Microbiology**, Jena, v. 291, n. 5, p. 371–378. Nov. 2001.

JEFREY, J. S.; CHIN, R. P.; SINGER, R.S. Assessing cellulitis pathogenicity of *Escherichia coli* isolates in broiler chickens assessed by an in vivo inoculation model. **Avian Diseases**, Kennet Square, v.43, n. 3, p.491-496, Jul. – Set. 1999.

JOHNSON, J.R.; RUSSO T.A. Molecular epidemiology of extraintestinal pathogenic (uropathogenic) *Escherichia coli*. **Journal of Medical Microbiology**, Jena, v. 295, n. 6-7, p. 383-404, Oct. 2005.

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, n. 1, p. 261–272. Jan. 2000.

JOHNSON, T. J. *et al.* DNA sequence of a ColV plasmid and prevalence of selected plasmid-encoded virulence genes among avian *Escherichia coli* strains. **Journal Bacteriol.** v. 188, n. 2, p. 745–758. Jan. 2006.

JORDAN, T.T.W.; PATTISON, M.; Colisepticaemia. In: **Poultry diseases**, 4th ed. Cambridge University Press, 1996. p. 39-41.

KAPER, J.B., NATARO, J.P., MOBLEY, H.L.T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 123-40. Feb. 2004.

KEHL-FIE, T., GEME III, J.W.ST.; Identification and characterization of an RTX toxin in the emerging pathogen *Kingella kingae*. **Journal Bacteriol.** v. 189, n. 2, p. 430–436, Jan. 2007.

KIM, K.S. Mechanisms of microbial traversal of the blood–brain barrier. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 8, p. 625–634. Aug. 2008.

KUMOR, L. W. *et al.* Cellulitis in broiler chickens: epidemiological trends, meat hygiene, and possible human health implications. **Avian Diseases**, Kennet Square, v. 42, n. 2, p.285-291. Jun. 1998.

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

LATHAM, R.H.; STAMM, W.E. Role of fimbriated *Escherichia coli* in urinary tract infections in adult women: correlation with localization studies. **The Journal of Infectious Diseases**, v.149. n.6, p.835-840. Jun. 1984.

LI, G., *et al.* Identification of genes required for avian *Escherichia coli* septicemia by signature- tagged mutagenesis. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 5, p. 2818-2827. May 2005.

LOVATO, M.; Disciplina de doenças das aves. **Coleção Ciências Rurais**. Santa Maria, UFSM / CCR / DMVP, p. 8, 2009.

- MAURER, J.J. *et al.* The occurrence of ambient temperature-regulated adhesins, curli, and the temperature-sensitive hemagglutinin tsh among avian *Escherichia coli*. **Avian Diseases**, Kennet Square, v. 42, n. 1, p. 106–118. Jan – Mar 1998.
- MÉNARD, L. P.; DUBREUIL, J. D. Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 (EAST1): a new toxin with an old twist. **Critical Reviews in Microbiology**, Boca Raton, v.28, n. 1, p. 43-60, 2002.
- MELLATA, M. *et al.* Role of virulence in resistance of avian pathogenic *Escherichia coli* to serum and pathogenicity. **Infection and Immunity**, Washington, v. 71, n. 1, p. 536-540, 2003.
- MONTGOMERIE, J.Z. *et al.* Association of hydroxamate siderophore (aerobactin) with *Escherichia coli* isolated from patients with bacteremia. **Infection and Immunity**, Washington, v.46, n.3, p.835-838,1984.
- NGELEKA, M. *et al.* *Escherichia coli* cellulitis in broiler chickens: clonal relationships among strains and analysis of virulence-associated factors of isolates from diseased birds. **Infection and Immunity**, Washington, v. 64, n. 8, p. 3118-3126, Aug. 1996.
- NOLAN, L. K. *et al.* Resistance to serum complement, iss, and virulence of avian *Escherichia coli*. **Veterinary Research Communications**, v. 27, p. 101-110, 2003.
- 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 autotransporter toxin. **Infection and Immunity**, Washington, v. 71, n. 9, p. 5087-5096, 2003.
- PARREIRA, V. R.; YANO, T. Cytotoxin produced by *Escherichia coli* isolated from chickens with swollen head syndrome (SHS). **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 62, n. 2, p.111–119. May 1998.
- POUTTU, R. *et al.* *matB*, a common fimbriin gene of *Escherichia coli*, expressed in a genetically conserved, virulent clonal group. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 16, p. 4727–4736. Aug. 2001.
- PROVENCE, D. L.; CURTISS, R. Isolation and characterization of a gene involved in hemagglutination by an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. **Infection and Immunity**, Washington, v. 62, n.4, p. 1369-1380. Apr. 1994.
- QUINN, P. J. *et al.* **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**, Porto Alegre: Artmed, 2005. p. 197-208.
- REVOLLEDO, L.; FERREIRA, A. J. P.; **Patologia aviária**, Barueri: Manole, 2009. p. 2-510.
- RODRIGUES-SIEK, K. E. *et al.* Comparison of *Escherichia coli* isolates implicated in human urinary tract infection and avian colibacillosis. **Microbiology**. v. 151, n. 6, p. 2097–2110. Jun.2005.

RUSSO, T. A.; JOHNSON, J. R. Proposal for a new inclusive designation for extra-intestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 181, n. 5, p. 1753-1754. May 2000.

RUSSO, T. A.; CARLINO, U. B.; JOHNSON, J. R. Identification of a new ironregulated virulence gene, *ireA*, in an extraintestinal pathogenic isolate of *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, Oxford, v. 69, n. 10, p. 6209–6216. Oct. 2001.

SABRI, M.; LE VEILLE, 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. Mar. 2006.

SALLE, C. T. P. *et al.* Use of Artificial Intelligence (Artificial Neural Networks) to classify the pathogenicity of *Escherichia coli* isolates from broilers. In: WESTERN POULTRY DISEASE CONFERENCE, 60., 2011, Sacramento, **Proceedings...**, Sacramento: [s. n.], 2011.

SCHUBERT, S. *et al.* Prevalence of the ‘high-pathogenicity island’ of *Yersinia* species among *Escherichia coli* strains that are pathogenic to humans. **Infection and Immunity**. Oxford, v. 66, n. 2, p. 480–485. Feb. 1998.

SCHUBERT, S. *et al.* *Yersinia* high-pathogenicity island contributes to virulence in *Escherichia coli* causing extraintestinal infections. **Infection and Immunity**, Oxford, v. 70, n. 9, p. 5335-5337. Sep. 2002.

SCHOULER, C. *et al.* Diagnostic Strategy for Identifying Avian Pathogenic *Escherichia coli* Based on Four Patterns of Virulence Genes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 5, p. 1673–1678. May 2012.

SMYTH, C. J.; MARRON, M.; SMITH, S. G. J. Fimbriae of *Escherichia coli* in Domestic Animals as Humans. In: Gyles, C. L. (Ed.), **Cab International**, Oxford, p. 399-435, 1994.

SMITH, H.W.; GYLES, C.L. The relationship between two apparently different enterotoxins produced by enteropathogenic strains of *Escherichia coli* of porcine origin. **Journal of Medical Microbiology**, v. 3, p. 387-401. Dec. 1970.

SRINIVASAN, U.; FOXMAN, B.; MARRS, C. F. Identification of a gene encoding heat-resistant agglutinin in *Escherichia coli* as a putative virulence factor in urinary tract infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 285-289. Jan. 2003.

SUKUPOLVI, S.; O'CONNOR, D. TraT lipoprotein, a plasmid-specified mediator of interactions between gram-negative bacteria and their environment. **Microbiological Reviews**, v. 54, n. 4, p. 331-341. Dec. 1990.

SUSSMAN, M. *Escherichia coli* and human disease. In: SUSSMAN, M. **Escherichia coli mechanisms of virulence**. Cambridge: University Press, 1997. p. 3-48.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUN, F. **Microbiologia**. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2008. p. 271-276.

UBABEF – União Brasileira de Avicultura. **Relatório Anual. 2010 -2011**. Disponível em: <http://www.abef.com.br/ubabef/publicacoes_relatoriosanuais.php>. Acesso em: 13 ago. 2012.

VIDOTTO, M. C. *et al.* Virulence factors of avian *Escherichia coli*. **Avian Diseases**, v. 34, n. 3, p. 531- 538. Jul – Sep. 1990.

VIEIRA, T. B. *et al.* Celulite em frangos de corte abatidos sob inspeção sanitária: aspectos anatomopatológicos associados ao isolamento de *Escherichia coli*. **Revista brasileira de Ciências Veterinárias**, v. 13, n. 3, p. 174-177, 2006.

YAMAMOTO, T.; ECHEVERRIA, P. Detection of the enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 gene sequences in enterotoxigenic *E. coli* strains pathogenic for humans. **Infection and Immunity**. Oxford, v. 64, n. 4, p. 1441–1445. Apri.1996.

WATT, S. *et al.* *Escherichia coli* strains from pregnant women and neonates: intraspecies genetic distribution and prevalence of virulence factors. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 5, p. 1929–1935. May 2003.

WOODROW, G. C. *et al.*. Mutations affecting the citrate-dependente iron uptake system in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 133, n. 3, p. 1524-1526, 1978.

WOOLEY, R.E. *et al.* Colonization of the chicken trachea by an avirulent avian *Escherichia coli* transformed with plasmid pHK11. **Avian Diseases**. Kennet Square, v. 42, n. 1, p. 194-198. Jan. – Mar. 1998.