

COMUNICAÇÃO CIENTÍFICA

ÍNDICE DE PATOGENICIDADE, PRODUÇÃO DE HEMOLISINA E SOROGRUPO DE AMOSTRAS DE *ESCHERICHIA COLI* ISOLADAS DE AVES DE POSTURA COMERCIALE.A.L. Guastalli¹, N.M.S.Q. Gama¹, M.R. Buim¹, R.A. Oliveira¹, A.J.P. Ferreira², D.S. Leite³

¹Instituto Biológico, Centro Avançado de Pesquisa Tecnológica do Agronegócio Avícola, Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento de Bastos, Av. Gaspar Ricardo, 1700, CEP 17690-000, Bastos, SP, Brasil. E-mail: guastalli@biologico.sp.gov.br

RESUMO

Este estudo avaliou o índice de patogenicidade, a produção de hemolisina e a determinação de sorogrupos de cepas de *Escherichia coli* isoladas de fígado de aves de postura comercial com um dia de idade. Para este estudo, foram analisados 32 lotes, dos quais 15 foram positivos para o isolamento de *E. coli* no fígado, totalizando vinte e quatro amostras. A patogenicidade dos isolados foi determinada por inoculação no saco aéreo de pintinhos e classificada como alta, intermediária, baixa ou não-patogênica. Os sorogrupos foram identificados utilizando um conjunto de antissoros anti-O (O1 a O180). A produção de hemolisina foi determinada por semeadura em ágar sangue de galinha (8%) e em placas de ágar sangue de carneiro (8%). Do total de amostras estudadas, 17 (70,83%) foram classificadas como não patogênica, 6 (25%) como de baixa patogenicidade e 1 (4,17%) de alta patogenicidade. Foram identificados 14 sorogrupos diferentes: O1, O2, O5, O8, O15, O18, O22, O36, O64, O70, O75, O115, O132, O141. Cinco cepas não tiveram o sorogrupo identificado. Com relação ao teste de produção de hemolisina, todas as cepas foram consideradas negativas, tanto para o teste realizado com ágar sangue de galinha quanto para o de carneiro. Os resultados obtidos neste estudo demonstram a importância de se identificar as cepas prevalentes de *E. colinas* diferentes regiões produtoras, podendo ser utilizados em estudos epidemiológicos.

PALAVRAS-CHAVE: *Escherichia coli*, APEC, pintainhas, patogenicidade, sorogrupo, hemolisina.

ABSTRACT

PATHOGENICITY INDEX, PRODUCTION OF HEMOLYSIN AND SEROGROUP OF SAMPLES OF *ESCHERICHIA COLI* ISOLATED FROM COMMERCIAL LAYING HENS. This work evaluated the index of pathogenicity, the production of hemolysin and determination of serogroups in *Escherichia coli* strains isolated from liver of commercial laying hens with one day of age. Thirty-two lots were analyzed, of which 15 were positive for the isolation of *E. coli* in the liver, for a total of 24 samples. The pathogenicity in one-day-old chicks was determined by inoculation in air sac and was classified as high, intermediate or low pathogenicity, or non-pathogenic. Serogroups were identified using a set of anti-O antisera (O1 to O180). The production of hemolysin was determined by plating on chicken blood agar (8%) and sheep blood agar (8%). Of the samples studied, 17 (70.83%) were classified as non-pathogenic, 6 (25%) as low pathogenicity and 1 (4.17%) as high pathogenicity. Fourteen different serogroups were identified: O1, O2, O5, O8, O15, O18, O22, O36, O64, O70, O75, O115, O132 and O141, while 5 samples were non-typable. Regarding the test for production of hemolysin, all strains were considered negative for both the test performed with chicken blood agar and that with sheep blood agar. The results of this study demonstrate the importance of identifying the prevalent strains of *E. coli* in different producing regions, as this information can be used in epidemiological studies.

KEY WORDS: *Escherichia coli*, APEC, chicks, pathogenicity, serogroups, hemolysin.

²Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Patologia, São Paulo, SP, Brasil.

³Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, Departamento de Microbiologia e Imunologia, Campinas, SP, Brasil.

Na avicultura industrial a *Escherichia coli* é considerada um dos principais agentes de doença, acarretando grandes prejuízos econômicos no mundo inteiro (MORRIS, 1989; DHO-MOULIN, 1993; YOGARATNAM, 1995; ELFADIL *et al.*, 1996; BARNES *et al.*, 2003). As cepas patogênicas para aves (APEC) são responsáveis por quadros infecciosos sistêmicos (BARNES *et al.*, 2003) e vários sorogrupos estão relacionados com a colibacilose aviária no Brasil e no mundo (FERREIRA; KNÖBL, 2000). Existem cerca de 170 sorogrupos de *E. coli*, segundo GROSS (1994), as cepas de APEC pertencem principalmente aos sorogrupos O1, O2, O8, O15, O18, O35, O78, O88, O109 e O115. No Brasil, os sorogrupos mais prevalentes são: O2, O21, O36, O50, O78, O88, O119 e O152 (FERREIRA; KNÖBL, 2000).

E. coli faz parte da microbiota entérica dos mamíferos e das aves e estão presentes em 10^6 UFC/g de fezes, sendo que 10 a 20% são potencialmente patogênicas (FERREIRA; KNÖBL, 2000). São excretadas de forma contínua, o que torna a sua distribuição cosmopolita, permanecendo nas criações por longos períodos, contaminando o alimento e a água que servirão como via de transmissão. Roedores e aves silvestres também podem funcionar como reservatório do agente (KNÖBL, 2005).

A casca do ovo é uma das principais vias de transmissão de *E. coli* patogênica para pintinhos. A contaminação fecal permite sua penetração da superfície para o interior do ovo (FERREIRA; KNÖBL, 2000). Existe a possibilidade de transmissão vertical transovariana de galinhas infectadas, pois a bactéria pode atingir o oviduto devido sua proximidade com as membranas do saco aéreo abdominal esquerdo ou por infecções ascendentes a partir da cloaca. Os embriões infectados que sobrevivem ao nascimento e a disseminação da bactéria nos primeiros quatro dias pode resultar em casos de infecções graves e comprometer o desenvolvimento das aves (BARNES *et al.*, 2003). As perdas econômicas são elevadas, podendo estender-se por toda vida da ave. Os pintinhos acometidos apresentam um desenvolvimento deficiente ou se tornam aves portadoras, susceptíveis a várias enfermidades (FERREIRA; KNÖBL, 2000).

De modo geral, qualquer fator ambiental, nutricional ou infeccioso, assim como aqueles que interferem no bom funcionamento do sistema imunológico, podem tornar a ave susceptível à infecção por APEC (YODER *et al.*, 1989; LANG, 1992; GROSS, 1994). O isolamento de *E. coli* de órgãos internos de aves já indica que a amostra pode ser patogênica para a espécie aviária. A inoculação *in vivo* em pintinhos de um dia é fundamental para estabelecer uma classificação da patogenicidade dessas bactérias, pois muitas amostras podem ser de origem fecal, contaminar os órgãos, mas não estar associada à doença em

aves (FERREIRA; KNÖBL, 2000). O presente estudo visou determinar os sorogrupos, produção de hemolisina e a patogenicidade de cepas de *E. coli* isoladas do fígado de aves com um dia de idade.

Trinta e dois lotes de aves de postura comercial de granjas do Estado de São Paulo foram analisados para a presença de *E. coli* no fígado. No momento do recebimento das aves, na granja, dez pintainhas com um dia de idade, de cada lote estudado, foram aleatoriamente separadas e transportadas ao laboratório, onde foi realizada eutanásia pelo método de deslocamento cervical (aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal - CETEA - IB, protocolo nº 74/08) e o fígado de todas as aves do lote assepticamente colhido. Os órgãos foram acondicionados em um único frasco esterilizado, formando, assim, um "pool". As amostras foram maceradas, enriquecidas com solução salina peptonada 1% tamponada (1:10), (Difco 21805) e incubadas a 37° C/24 horas. Após esse período, foram semeadas em placas de ágar Verde Brillante Modificado (Difco 1880) e ágar Eosina Azul de Metileno (Oxoid CM069), sendo incubadas 37° C/24 horas. As colônias com características sugestivas de *E. coli* foram confirmadas por testes bioquímicos (KONEMAN *et al.*, 2001; QUINN *et al.*, 2005).

As cepas identificadas bioquimicamente como *E. coli* foram submetidas ao teste de patogenicidade pela inoculação de 0,1 mL da cultura bacteriana, padronizada em 10^7 unidades formadoras de colônias/mL (UFC/mL) no saco aéreo torácico esquerdo de pintinhos de um dia de idade, como descrito por DHO; LAFONT (1982). As aves foram mantidas em observação durante 10 dias e, de acordo com o índice de mortalidade, as amostras foram classificadas em alta (mortalidade $\geq 80\%$), intermediária (mortalidade $> 50\%$ e $< 80\%$), baixa patogenicidade (mortalidade $\leq 50\%$) e não patogênica (mortalidade zero). Após o décimo dia, foi realizada eutanásia em todas as aves que sobreviveram pelo método de deslocamento cervical (aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal - CETEA - IB, protocolo nº 74/08).

Para o teste de produção de hemolisina, as cepas de *E. coli* em estudo foram semeadas em placas de ágar sangue base enriquecidos com sangue de galinha (8%) e em placas de ágar sangue base enriquecido com sangue de carneiro (8%) e incubadas a 37° C por 24 horas. Aquelas que apresentavam halo de hemólise, parcial ou total ao seu redor, foram consideradas como produtora de hemolisina.

A determinação do sorogrupo foi realizada de acordo com a técnica de microplaca (GUINÉE *et al.*, 1972; BLANCO *et al.*, 1992) utilizando a coleção de antissoros anti-O (O1 a O180) do Laboratório de Antígenos Bacterianos II do Departamento de

Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas.

Dos 32 lotes de pintainhas analisados, 15 (46,87%) foram positivos para o isolamento de *E. coli* no fígado. Dentre esses 15 lotes, em nove foram isoladas duas amostras dessa bactéria e nos demais, ou seja, em seis lotes, apenas uma, que totalizaram 24 amostras estudadas.

A inoculação em pintainhos de um dia revelou que 17 (70,83%) das cepas isoladas do fígado foram não-patogênicas, seis (25%) eram de baixa patogenicidade e um (4,17%) de alta patogenicidade. No teste de produção de hemolisina todas as cepas apresentaram resultado negativo. Na sorotipagem foram identificados 14 sorogrupos: O1 (N = 1), O2 (N = 2), O5 (N = 1), O8 (N = 1), O15 (N = 2), O18 (N = 1), O22 (N = 2), O36 (N = 1), O64 (N = 1), O70 (N = 1), O75 (N = 1), O115 (N = 3), O132 (N = 1) e O141 (N = 1). Cinco das 24 cepas não puderam ser sorotipadas, sendo uma delas rugosa.

As amostras não patogênicas pertenciam aos sorogrupos O8, O15, O18, O22, O64, O70, O75, O115, O132, O141, as de baixa patogenicidade aos sorogrupos O5, O115, O36 e O1. Não foi identificada a presença de cepas com patogenicidade intermediária e a única cepa de alta patogenicidade pertencia ao sorogrupo O2. Três cepas foram classificadas como pertencentes ao sorogrupo O115, sendo que duas delas apresentaram baixa patogenicidade e uma foi classificada como não-patogênica (Tabela 1).

Em granjas destinadas à produção de ovos comerciais, as aves são recebidas com um dia de idade e devem chegar saudáveis e sem sinais de infecção, principalmente por *E. coli*. Esta bactéria é responsável por diferentes quadros clínicos, que variam com o sorogrupo e as características de patogenicidade da cepa, podendo causar infecção sistêmica, septicemia e morte em pintinhos (BARNES *et al.*, 2003).

Tabela 1- Resultados dos testes realizados com as cepas de *E. coli* isoladas do fígado de pintainhas de um dia de idade dos lotes de postura comercial.

Lotes (positivos)	<i>E. coli</i> isoladas ^a	Classificação da patogenicidade	Sorogrupo 'O'	Hemolisina
A	1	NP ^b	15	- ^d
	2	NP	15	-
B	3	NP	NT ^c	-
C	4	NP	64	-
	5	NP	NT	-
D	6	Baixa	5	-
	7	NP	132	-
E	8	Alta	2	-
F	9	NP	8	-
G	10	NP	115	-
	11	Baixa	115	-
H	12	Baixa	NT	-
	13	NP	18	-
I	14	NP	NT	-
J	15	NP	22	-
K	16	NP	22	-
L	17	Baixa	115	-
	18	NP	Rugosa	-
M	19	NP	141	-
	20	NP	70	-
N	21	NP	8	-
	22	NP	75	-
O	23	Baixa	36	-
	24	Baixa	1	-

^aO número de *E. coli* isoladas do pool de fígado de todas as aves do lote, designado de 1 a 24.

^bNP = Não Patogênica,

^cNT = estes isolados foram classificados como não tipáveis;

^dNegativo.

Através do teste de patogenicidade, foi possível observar que a maioria das amostras 17/24 foi não patogênica, porém, podemos constatar que, dos quinze lotes positivos estudados, em seis (40%) deles (D, E, G, H, L e O) encontramos cepas de *E. coli* de alta e baixa patogenicidade. Podemos assim concluir que essas aves já chegaram infectados por *E. coli* e permaneceram portadoras e veiculadoras de amostras patogênicas ao ambiente, comprometendo aves provenientes de outros lotes e de outras idades que se encontram na granja. Essas amostras patogênicas podem ter sido provenientes do incubatório, de transmissão vertical, de contaminação fecal do ovo, ou de outras fontes que podem ocorrer durante a expedição e o transporte.

Matrizes com salpingite podem transmitir cepas de *E. coli* para a progênie, de acordo com DHO; FAIRBROTHER (1999). MONROY *et al.* (2005) estudaram 30 cepas de *E. coli* isoladas de ovidutos de matrizes com salpingite e encontraram sete sorogrupos diferentes e 40% das cepas pertenciam ao sorogrupo O1, O2, O5 e O36, que também foram encontradas entre as cepas identificadas no presente estudo. Portanto, as cepas encontradas nos lotes de pintinhos deste estudo podem ser decorrentes de matrizes que apresentavam salpingite causada por *E. coli* e a transmitiram para sua progênie.

Foi observada uma diversidade de sorogrupos, constatando-se também a presença de diferentes sorogrupos entre aves de um mesmo lote. No presente estudo seis sorogrupos (O1, O2, O8, O15, O18 e O115) encontrados estão entre os citados por GROSS (1994), que informa que entre as APEC é comum encontrar os sorogrupos O1, O2, O8, O15, O18, O35, O78, O88, O109 e O115. Segundo FERREIRA; KNÖBL (2000), dos sorogrupos prevalentes no Brasil: O2, O21, O36, O50, O78, O88, O119 e O152, no presente estudo foram encontrados dois, os sorogrupos O2 e O36. O sorogrupo O78, frequentemente encontrado nos casos de colibaciloses em vários países, não foi isolado no presente estudo. Das 24 cepas estudadas, cinco (20,83%) foram não tipáveis, o que está de acordo com MENÃO *et al.* (2002), que aponta que o percentual de amostras não tipáveis pode oscilar entre 14% e 39%. Porém, em trabalho desenvolvido por SILVEIRA *et al.* (2002), com aves apresentando sinais clínicos de onfalite, septicemia, síndrome da cabeça inchada e aves normais, obteve uma oscilação de amostras não tipáveis que variou de 9,09 a 50%. O maior número de amostras não tipáveis foi obtido do grupo de aves que apresentava onfalite e o menor de aves normais.

Com relação ao teste de detecção de hemolisina, nenhuma das amostras analisadas no estudo foi positiva, estando de acordo com os trabalhos realizados por VIDOTTO *et al.* (1990), EMERY *et al.* (1992) e ROCHA *et al.* (2002).

Devido aos prejuízos econômicos decorrentes da colibacilose e as dificuldades de controle da doença, é importante que se identifique as cepas prevalentes de *E. coli*, os sorogrupos e a classificação da patogenicidade das cepas, após o isolamento, nas diferentes regiões produtoras. Portanto, os dados gerados neste estudo são importantes para a elaboração de programas de controle de *E. coli* nas aves reprodutoras e comerciais destinadas à produção de carne e ovos. Além disso, é preciso delinear e desenvolver estudos futuros para conhecer melhor a epidemiologia da colibacilose, para diminuir os prejuízos causados na avicultura industrial.

REFERÊNCIAS

- BARNES, H.J.; VAILLANCOURT, J.P.; GROSS, W.B. Colibacillosis In: SAIF, Y.M. (Ed.). *Disease of poultry*. 11.ed. Ames: Iowa State University Press, 2003. p.631-656.
- BLANCO, J.; BLANCO, M.; ALONSO, M.P.; BLANCO, J.E.; GARABAL, J.I.; GONZALEZ, E.A. Serogroups of *Escherichia coli* strains producing cytotoxic necrotizing factors CNF1 and CNF2 FEMS. *Microbiology Letters*, v.96, p.155-160, 1992.
- DHO, M.; LAFONT, J.P. *Escherichia coli* colonization of the trachea in poultry: comparison of virulent strains in gnotoxenic chickens. *Avian Diseases*, v.26, p.187-197, 1982.
- DHO, M.; FAIRBROTHER, J.M. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC), *Veterinary Research*, v.30, p.299-316, 1999.
- DHO-MOULIN, M. Les *Escherichia coli* pathogènes des volailles. *Annales de Médecine Vétérinaire*, v.137, p.353-357, 1993.
- ELFADIL, A.A.; VAILLANCOURT, J.P.; MEEK, A.H.; JULIAN, R.J.; GYLES, C.L. Description of cellulitis lesions and associations between cellulites and other categories of condemnation. *Avian Diseases*, v.40, p.690-698, 1996.
- EMERY, D.A.; NAGAJARA, K.V.; SHAW, J.; NEWMAN A.; WHITE D.G. Virulence factors of *Escherichia coli* associated with colisepticemia in chickens and turkeys. *Avian Diseases*, v.36, p.504-511, 1992.
- FERREIRA, A.J.P.; KNÖBL, T. Colibacilose aviária. In: BERCHIERI JUJIOPR, A.; MACARI, M. (Ed.). *Doença das aves*. Campinas: Facta, 2000. p.197-207.
- GROSS, W.G. Diseases due to *Escherichia coli* in Poultry. In: GYLES, C.L. (Ed.). *Escherichia coli in domestic animals and humans*. UK: Cab International, 1994. p.237-260.

GUINÉE, P.A.M.; AGTERBER, C.M.; JANSEN, W.H. *Escherichia coli* O typing by means of a mechanized microtechnique. *Applied Microbiology*, v.24, p.127-131, 1972.

KARIUKI S., GILKS, J.M.; MUYODI J. GETTTY B., HART C.A. Carriage of potentially pathogenic *Escherichia coli* in chickens. *Avian Diseases*, v.46, p.721-724, 2002.

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

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN JUNIOR, W.C. *Diagnóstico microbiológico*. 5.ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2001. 1488p.

LANG, M. Controle da doença respiratória de frangos de corte. *Avicultura e Suinocultura Industrial*, N.992, p.78-79, 1992.

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*, São Paulo, v.69, n.4, p.15-17, 2002.

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 & Infectious Diseases*, v.28, p.1-15, 2005.

MORRIS, M. Poultry health issue. *Poultry Times*, n.3 p.3-11, 1989.

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

ROCHA, A.C.G.P. da; SILVA A.B. da; BRITO B.G.; MORAES H.L.S.; PONTES A.P.; CÉ M.C.; NASCIMENTO V.P.; SALLE C.T.P. Virulence factors of avian pathogenic *Escherichia coli* isolated from broilers from the south of Brazil. *Avian Diseases*, v.46, p.749-753, 2002.

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

VIDOTTO, M.C.; MULLER, J.C.; FREITAS, J.C.; ALFIERI, A.A.; GUIMARÃES I.G.; SANTOS, D.S. Virulence factors of avian *Escherichia coli*. *Avian Diseases*, v.34, p.531-538, 1990.

YODER, H.W.; BEARD, C.W.; MITCHELL, B.W. Pathogenicity of *Escherichia coli* in aerosol for young chickens. *Avian Diseases*, v.33, n.4, p.676-683, 1989.

YOGARATNAM, V. Analysis of the causes of high rates of carcass rejection at a poultry processing plant. *Veterinary Record*, v.137, p.215-217, 1995.

Recebido em 17/12/08
Aceito em 23/1/10