UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

GENES DE VIRULÊNCIA EM *Escherichia coli* ISOLADA DE FRANGOS DE CORTE DE CRIAÇÕES INDUSTRIAIS E ALTERNATIVAS

Tatiane Martins Rocha
Orientadora: Prof. Dra. Maria Auxiliadora Andrade

GOIÂNIA
2013

Termo de Ciência e de Autorização para Disponibilizar as Teses e Dissertações Eletrônicas (TEDE) na Biblioteca Digital da UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás–UFG a disponibilizar gratuitamente através da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações – BDTD/UFG, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. **Identificação do material bibliográfico**: ☐ **Dissertação** ☒ **Tese**

2. **Identificação da Tese ou Dissertação**

Autor: **Tatiane Martins Rocha** E-mail: **tatvet2@gmail.com**

Seu e-mail pode ser disponibilizado na página? ☒ Sim ☐ Não

Vínculo Empregatício do autor: Agência de fomento:

País: UF: CNPJ: Sigla:

Título: **Genes de virulência em *Escherichia coli* isolada de frangos de corte de criações industriais e alternativas**

Palavras-chave: **aves, colibacilose, genes de virulência, suscetibilidade**

Título em outra língua: **Virulence genes in *Escherichia coli* isolated from industrial and alternative broiler breeding**

Palavras-chave em outra língua: **colibacillosis, poultrys, susceptibility, virulence genes**

Área de concentração: **Sanidade animal, Higiene e Tecnologia de alimentos**

Data defesa: (dd/mm/aaaa) **13/12/2013**

Programa de Pós-Graduação: **Programa de pós-graduação em Ciência Animal**

Orientador(a):**Profa. Dra. Maria Auxiliadora Andrade** E-mail: **maa@ufg.br**

Co-orientador(1):**Profa. Dra. Iolanda Aparecida Nunes** E-mail: **iolanda_nunes2000@yahoo.com.br**

Co-orientador(2): **Prof. Dr. José Henrique Stringhini** E-mail: **jhstring@hotmail.com**

3. **Informações de acesso ao documento:**

Liberação para disponibilização?[1] ☒ total ☐ parcial

Em caso de disponibilização parcial, assinale as permissões:

[ ] Capítulos. Especifique:

[ ] Outras restrições:

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.

O Sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.

Goiânia 31 de dezembro de 2013

Tatiane M. Rocha

Assinatura do(a) autor(a)

[1] Em caso de restrição, esta poderá ser mantida por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Todo resumo e metadados ficarão sempre disponibilizados.

TATIANE MARTINS ROCHA

GENES DE VIRULÊNCIA EM *Escherichia coli* ISOLADA DE FRANGOS DE CORTE DE CRIAÇÕES INDUSTRIAIS E ALTERNATIVAS

Tese apresentada para obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal junto à Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás

Área de Concentração
Sanidade Animal, Higiene e Tecnologia de Alimentos

Orientadora
Prof. Dra. Maria Auxiliadora Andrade

Comitê de Orientação:
Prof. Dr. José Henrique Stringhini
Prof. Dr. Iolanda Aparecida Nunes

GOIÂNIA
2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Rocha, Tatiane Martins.
R672g Genes de virulência em *Escherichia coli* isolada de frangos de corte de criações industriais e alternativas [manuscrito] / Tatiane Martins Rocha. - 2013.
75 f. : il.

Orientador (a): Profa. Dra. Maria Auxiliadora Andrade.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Goiás,
Escola de Veterinária e Zootecnia, 2013.
Bibliografia.

1. *Escherichia coli* – Frangos de corte 2. *Escherichia coli* – Genes de virulência 3. Frangos de corte – Genes de virulência I. Título

CDU:598.261.7:579

TATIANE MARTINS ROCHA

Tese defendida e aprovada em **13/12/2013** pela Banca Examinadora constituída pelos professores:

Profa. Dra. Maria Auxiliadora Andrade
(ORIENTADOR (A))

Prof. Dr. Marcelo Vasconcelos Meireles – UNESP/SP

Profa. Dra. Karyne Oliveira Coelho - UEG/GO

Prof. Dr. Marcos Barcelos Café (memoria)

Prof. Dr. Guido Fontgalland Coelho Linhares

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a DEUS porque sem Sua presença em minha vida eu nada seria capaz. Ele é o responsável por estar realizando este grande sonho;

Agradeço à Universidade Federal de Goiás, à Escola de Veterinária e Zootecnia, ao Programa de Pós-graduação e aos funcionários, pelos ensinamentos e amizade, os quais sempre estavam prontos para esclarecimentos e sugestões;

Agradeço, especialmente, à minha orientadora, Profa. Dra. Maria Auxiliadora Andrade. Obrigada por sua paciência, dedicação, por sempre estar disposta a ajudar com tanto carinho e pelos ensinamentos de vida proporcionados durante o período de pós-graduação e de realização deste trabalho. Saiba que a senhora é um presente de Deus em minha vida e só Ele para compensar o que a senhora fez por mim e que sempre serei sua grande admiradora tanto pela competência profissional quanto pelo lado pessoal e que guardarei com muito carinho todos os ensinamentos e dedicação que a senhora tem e teve por mim;

Ao CNPq e MAPA pela disponibilização de recursos, tão necessários para execução deste estudo;

Agradeço, especialmente, ao Marcos Sotero Nunes, meu esposo, meu braço direito e companheiro, obrigada por me ouvir, apoiar, ajudar e incentivar em todos os momentos. Aproveito também para homenagear e agradecer ao meu querido filho Pedro que é o meu presente de Deus, meu maior incentivador, me dando tantas alegrias;

Agradeço a meus pais, Regina Evangelista da Rocha Martins e Décio José Martins, pelos ensinamentos de vida, por sempre me apoiarem, ajudarem em todos os momentos e pelo amor incondicional, por ouvirem minhas lamentações e sempre me orientarem. Ao meu irmão, Danilo Umberto Martins, pelo incentivo e carinho, minhas avós, Lídia Rosa dos Santos e Sônia Maria da Costa, pelas lições de vida e paciência. E a todos os meus familiares que tiveram grande compreensão com meu pouco tempo disponível;

Agradeço em especial a Pastora, Iraci Eliezer Naves, e Jonas dos Santos e seus familiares pela amizade e dedicação, pois sem este carinho e orações tudo seria muito difícil;

À banca de qualificação composta pela Profa. Dra. Cíntia Silva Minafra e Rezende, Profa. Dra. Iolanda Aparecida, Prof. Dr. José Henrique Stringhini e Prof. Dr. Marcos Barcellos Café, bem como a banca de defesa composta pela Profa. Dra. Karyne Oliveira Coelho, Prof. Dr. Marcelo Vanconcelos Meireles, Prof. PhD. Guido Fontgallad

Linhares, Prof. Dr. Marcos Barcellos Café (Memória) por apresentarem sugestões que muito contribuíram para aprimoramento deste trabalho;

Ao Prof. Antônio José Piantino Ferreira da Escola de Veterinária da Universidade de São Paulo (USP) que tão gentilmente cedeu os controles positivos utilizados neste trabalho e a Profa. Dra. Terezinha Knobl que intermediou o envio dos isolados com tanto carinho e presteza;

Aos meus chefes durante o período de curso: Médicos Veterinários João Rabelo e Eurípedes Divino Amorim pela confiança dispensada e auxílio sempre constante para execução das atividades do curso;

Ao (A): Ana Maria, Profa. Dra. Sabrina, Winder, Prof. Dr. Emannuel, Prof. Dr. Guido, Prof. Dr. Jurij, Profa. Dra. Valéria e a todos os professores pelo carinho, amizade e pelo auxílio constante;

Aos estagiários e colegas de curso: Agna, Aline, André, Cíntia, Dunya, Eliete, Fernanda, Maria Auxiliadora Leão, Samantha, Thiago e Taynara por sempre estarem dispostos a ajudar, verdadeiros parceiros e indispensáveis para execução deste experimento;

E a todos que contribuíram para a realização deste sonho.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS..... 01

INTRODUÇÃO..... 01

REVISÃO DE LITERATURA..... 04

REFERÊNCIAS..... 08

CAPÍTULO 2- GENES DE VIRULÊNCIA EM *Escherichia coli* DE FRANGOS DE CORTE INDUSTRIAIS 14

RESUMO..... 14

ABSTRACT..... 14

INTRODUÇÃO..... 15

MATERIAL E MÉTODOS..... 16

RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 20

CONCLUSÃO..... 27

REFERÊNCIAS..... 27

CAPÍTULO 3- GENES DE VIRULÊNCIA EM ISOLADOS DE *Escherichia coli* DE FRANGOS DE CORTE DE CRIAÇÕES ALTERNATIVAS 33

RESUMO..... 33

ABSTRACT..... 33

INTRODUÇÃO..... 34

MATERIAL E MÉTODOS..... 35

RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 40

CONCLUSÃO..... 49

REFERÊNCIAS..... 50

CAPÍTULO 4- GENE *iss* E SUA RELAÇÃO COM RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS EM ISOLADOS DE E*scherichia coli* OBTIDOS DE FRANGOS DE CORTE DE CRESCIMENTO LENTO E RÁPIDO 55

RESUMO..... 55

ABSTRACT..... 55

INTRODUÇÃO..... 56

MATERIAL E MÉTODOS..... 57

RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 61

CONCLUSÃO..... 69

REFERÊNCIAS..... 70

CAPÍTULO 5- CONSIDERAÇÕES FINAIS...... 74

RESUMO

O presente trabalho foi desenvolvido com objetivos de detectar genes de virulência em *Escherichia coli* isoladas de órgãos de frangos de corte de criações industriais e alternativas, bem como identificar o perfil de resistência aos antimicrobianos utilizados em medicina humana e veterinária. Para tanto foram coletadas 496 amostras de órgãos de 32 lotes em abatedouros de diferentes regiões do Estado de Goiás com lesões de hepatite, pericardite, aerossaculite e celulite. *E. coli* foi identificada em 76,21% (378/496) das amostras pesquisadas com os seguintes resultados: 76,92% (80/104) em hepatite, 73,88% (99/134) em pericardite, 77,95% (99/127) em aerossaculite e 77,95% (100/131) em celulite. Nos isolados de *E. coli*, foi feita a pesquisa dos genes *papC*, *tsh*, *iuc* e *iss*. O gene *tsh* e o *iuc* foram os que apresentaram maiores valores, 44,4% (32/72) e 45,8% (33/72), respectivamente. Para a detecção simultânea dos genes, o maior valor ($p<0,05$) foi observado para *tsh*-*iuc* com 12,5% (9/72), entre *tsh*-*iuc*-*iss* com 11,1% (8/72) e entre os quatro genes deste estudo com 13,9% (10/72). Em criações alternativas, foram coletadas amostras de 32 propriedades onde aves não apresentavam quadros respiratórios e 32 onde apresentavam quadros respiratórios. Durante as necropsias, as alterações clínicas e anatomopatológicas foram avaliadas e fragmentos de fígado e coração, bem como conteúdo intestinal e suabes de traquéia e sacos aéreos foram coletados de cada ave. *E. coli* foi isolada de aves sem quadro respiratório em 5,3% (5/95), 7,4% (7/95), 4,2% (4/95), 3,2% (3/95) e 3,2% (3/95) em amostras de fígado, coração, sacos aéreos, intestino e traquéia respectivamente. Em aves com sinais respiratórios, *E. coli* foi identificada em 22,7% (35/154), 18,2% (28/154), 22,7% (35/154), 18,3% (29/154) e 18,3% (29/154) das amostras de fígados, coração, sacos aéreos, intestino e traquéia respectivamente. As frequências de isolamento de *E. coli* e de achados anatomopatológicos à necropsia foram menores ($p<0,05$) para criações sem quadro respiratório quando comparadas as com quadro respiratório. Para o grupo sem quadro respiratório, diferiram a detecção entre *iuc,* 36,4% (8/22), e *iss*, 9,1% (2/22). A detecção simultânea entre *iuc*-*iss* apresentou ($p<0,05$) os maiores resultados, 10,1% (7/69), para o grupo com quadro respiratório. Em relação à determinação do perfil de resistência e a presença do *iss*, para amostras de frangos de corte industrial, os maiores valores foram para doxiciclina, oxitetraciclina e enrofloxacina quando o *iss* esteve presente. Em isolados de frangos de corte de criações alternativas, quando o gene *iss* esteve presente, obteve-se maior percentual de resistência para ampicilina e ciprofloxacina. Conclui-se que os genes *pap*, *tsh, iuc* e *iss* estiveram presentes em isolados de *E. coli*, determinando maior atuação quando ocorreu associação entre pelo menos dois genes e que os níveis de resistência aos antimicrobianos foram elevados em isolados de *E. coli* independente do sistema de criação das aves.

Palavras-chave: aves, colibacilose, genes de virulência, suscetibilidade.

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1.1 Introdução

A evolução nos parâmetros de produção de frangos de corte de crescimento rápido demonstra claramente o progresso obtido pela avicultura industrial. A seleção genética, bem como melhorias na nutrição, manejo, sanidade e nas condições ambientais têm resultado em desenvolvimento mais eficiente de frangos de corte, e tem atendido demandas e exigências dos mercados consumidores com maior inserção no mercado internacional.

Neste sentido, o Brasil ostentou no “ranking” internacional em 2012, o posto de maior exportador e terceiro maior produtor, a produção brasileira de carne de frango foi de 12,645 milhões de toneladas com exportação de mais de 3,9 milhões de toneladas do produto (UBABEF, 2013).

Contudo, este rápido crescimento de frangos de corte tem sido associado com alguns distúrbios que muitas vezes reduzem o bem-estar e desempenho das aves. Além disso, há uma parcela da sociedade que possui preferência sensorial por outro tipo de carne, o de criação alternativa, uma vez que aves com crescimento lento apresentam atributos diferenciados na qualidade da carne, como maior textura e coloração da carne mais acentuada, diferente do rosa pálido das carnes dos frangos industriais (SANTOS, 2004).

As criações alternativas de frangos de corte, diferentemente da avicultura industrial, são abatidas com no mínimo 85 dias (BRASIL, 1999). Na avicultura brasileira, as principais linhagens utilizadas em criações alternativas são: *Label Rouge*, *Redbro Plumé*, ou pesadão e *Gris Barre Plumé*, conhecida como Carijó. Os principais fatores de controle relacionados às características sensoriais da carne de frangos de corte deste tipo de criação são a idade ao abate, sexo, tipos de linhagens e a alimentação utilizada (RIZZI et al., 2007).

Outro destaque deste tipo criação na avicultura se deve a exigência de alimentos sem resíduos químicos e com produção mais natural em consonância com o bem estar, preservação ambiental e saúde pública. Esta nova realidade tem dado impulso à criação em sistemas que reduzem ou eliminem a utilização de

antimicrobianos e ingredientes de origem animal (ANDRADE, 2005). Pesquisas em frangos de crescimento lento e seu sistema de produção têm se intensificado com o intuito de garantir uma atividade rentável para os produtores e um produto final de qualidade com valor agregado (NASCIMENTO et al., 2009; PINHEIRO et al., 2011).

Nota-se, no entanto, que nem sempre as medidas de biossegurança são obedecidas, mesmo em criações industriais, uma vez que os galpões muitas vezes apresentam alta densidade, ou mesmo o manejo empregado predispõem a enfermidades, principalmente doenças respiratórias, que podem ser agravadas pela ação de *Escherichia coli* que pode desencadear níveis significativos de mortalidade e morbilidade no lote. Sabe-se que infecções causadas por esta bactéria, denominadas de colibacilose avícola, transformaram-se em ameaça econômica à produção de aves no mundo (ANTÃO et al., 2008). Na espécie avícola, as amostras de *E. coli* patogênica para aves (APEC) são responsáveis por uma doença sistêmica que começa com infecção do trato respiratório e evolui para septicemia (MOULIN-SCHOULEUR et al., 2007), além de causar o agravamento de outras doenças (TIVENDALE et al., 2004).

A severidade da infecção é, em parte, dependente da patogenicidade da cepa e atribuída à presença de genes de virulência (KWON et al., 2008). Diferentes isolados podem induzir a colibacilose aviária, bem como abrigar diferentes associações de genes de virulência (SCHOULER et al., 2012). Embora já tenha sido relatado que alguns genes que codificam fatores de virulência estejam presentes em plasmídeos conjugativos envolvidos na letalidade dos embriões, dados sobre a associação entre estes tem sido restritos (OH et al., 2012).

TEJKOWSKI (2012) afirmou que cepas APEC determinantes de lesões apresentam pelo menos um fator relacionado à adesão, um à aquisição de ferro e um à resistência sérica, porém a frequência de alguns genes tem apresentado variações de forma significativa em diversos trabalhos com APEC.

Aliado à importância conferida às cepas APEC e a tendência de criações com menor utilização de antimicrobianos, tem-se em saúde pública a questão do crescente aumento de resistência aos antimicrobianos. Muito destes antimicrobianos têm sido utilizados como promotores de crescimento na produçã

de frangos de corte há décadas, sustentando a cadeia avícola, melhorando o desempenho animal, a conversão alimentar e diminuindo a mortalidade causada por infecções clínicas (FUKAYAMA et al., 2005). Além de reduzirem o custo de produção, a idade ao abate e a incidência de doenças (GÓRNIAK & SPINOSA, 2007).

Após anos de uso de antimicrobianos como promotores de crescimento na alimentação de aves, alguns questionamentos foram levantados. Dentre eles, se resíduos destes antimicrobianos poderiam permanecer na carne e serem veiculados ao consumidor final (FUKAYAMA et al., 2005). O uso abusivo destas drogas agrava o desenvolvimento da resistência bacteriana, sendo cada vez mais evidente tanto em humanos quanto animais (WALLMANN, 2006), dificultando o tratamento das infecções bacterianas.

O fato é que a resistência de *E. coli* a classes de agentes antimicrobianos é um achado comum, tanto na medicina humana quanto na veterinária, o que tem causado um crescente impacto no que seriam opções terapêuticas viáveis (BAUM & MARRE, 2005). Com *iss*o, é cada vez mais frequente a necessidade de monitorar a resistência a antimicrobianos como fator determinante para eleição e êxito do tratamento (BARROS et al., 2012).

Em estudo desenvolvido por ABREU (2010) se verificou resistência a múltiplos antimicrobianos pode indicar um possível potencial patogênico das cepas de *E. coli* para todos os tipos de aves, animais e mesmo para o homem. Também GONÇALVES et al. (2012) verificaram que isolados de *E. coli* apresentaram resistência a antimicrobianos de uso comum no tratamento de enfermidades em frangos de corte, os quais podem permitir o surgimento de resistência cruzada com outras enterobactérias, representando um risco de seleção de cepas patogênicas para aves assim como para seres humanos.

A preocupação acerca da resistência aos antimicrobianos e sua transmissão a isolados de origem humana é muito relevante uma vez que bactérias resistentes podem colonizar o trato intestinal humano e os genes de resistência serão d*iss*eminados para as bactérias endógenas humanas (SAHOO et al. 2012). Inclusive, frangos de corte podem ser considerados como veículo

importante para d*iss*eminação de *E. coli* resistente a antimicrobianos (LITERAK et al., 2013).

1.2 REVISÃO DE LITERATURA

A indústria avícola de frangos de corte é viável apenas por meio da criação em alta densidade. Como consequência, o ar respirado torna-se de qualidade ruim e pode determinar lesões no trato respiratório, propiciando condições ideais para a instalação e a multiplicação de agentes infecciosos (GAMA, 2004). Em criações alternativas, as múltiplas idades em um mesmo ambiente também facilitam a instalação da colibacilose. Desta forma, é necessário considerar que fatores ambientais como altas concentrações de amônia no galpão, deficiência na ventilação, variações climáticas, umidade da cama, criações com alta densidade e deficiência no processo de desinfecção são fatores de risco para disseminação deste patógeno e devem ser avaliados para promoção de medidas de controle eficazes (ANDREATTI FILHO, 2006).

Ressalta-se que, na maior parte dos casos, os problemas respiratórios diagnosticados em frangos de corte não envolvem apenas um agente. Diversos patógenos podem estar implicados com as enfermidades respiratórias em frangos, porém *E. coli* participa com frequência de tais enfermidades. Os vírus, os imunossupressores, os fungos e as bactérias se relacionam de modo complexo, facilitando a invasão no trato respiratório por *E. coli* (NASCIMENTO, 2000).

As cepas de *E. coli* são divididas em patótipos com base nas diferentes síndromes e características clínicas causadas: enteropatogênicos (EPEC), enterotoxigênicos (ETEC), enteroinvasivos (EIEC), enterohemorrágicos (EHEC), difusamente aderente (DAEC), meningite (NMEC), uropatogênicos (UPEC) e *E. coli* patogênica para aves (APEC) (GERMANO & GERMANO, 2008). A estrutura da *E. coli* patogênica para aves (APEC) é composta de segmentos antigênicos que contribuem para a diferenciação sorológica dos sorotipos de *E. coli,* baseada na identificação dos antígenos flagelares (H), capsulares (K), somáticos (O) e fimbrias (F) (FERREIRA & KNÖBL, 2009).

Os antígenos flagelares embora sejam auxiliares na locomoção bacteriana, não são utilizados com frequência na identificação antigênica das amostras de *E. coli* e a presença de flagelo não tem sido correlacionada com patogenicidade. Os antígenos capsulares K, por sua vez, possuem polissacarídeos capsulares que protegem a membrana externa da parede do ataque do sistema complemento e impedem a fagocitose (FERREIRA & KNÖBL, 2009). Estudos sugerem que cápsulas K1 estão associadas com a resistência sérica ao sistema complemento e colonização de órgãos internos (MELLATA et al., 2003).

O antígeno somático "O" é constituído por uma cadeia de polissacarídeo que se projeta para o espaço extracelular e sua composição é extremamente variável entre as bactérias da mesma espécie. Sendo que esta estrutura determina a existência de vários sorogrupos (FERREIRA & KNOBL, 2009). Embora a distribuição e a frequência dos sorogrupos possam variar devido a fatores geográficos e temporais (YANG et al., 2004), deve-se ressaltar que cepas de *E. coli* O78 patogênicas e O157: H7 de origem animal representam alto risco de infecções para humanos (ADIRI et al., 2003).

As APEC não são patogênicas para o homem, porém uma informação preocupante é que amostras avícolas apresentam similaridade com as 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 (RUSSO & JOHNSON, 2003). CHANTELOUP et al. (2011) detectaram uma amostra de *E. coli* extra-intestinal de origem avícola com capacidade de aderir e invadir pneumócitos humanos e hepatócitos aviários. A bactéria invadiu hepatócitos com maior eficiência do que pneumócitos. Esta diferença observada com relação à invasão de células específica pode estar relacionada ao tipo celular e/ou à origem da espécie das amostras. O importante é que este trabalho reforçou os estudos precedentes e demonstrou a proximidade filogenética entre as APEC de origem avícola e humana e sugeriu que esta bactéria pode representar um risco zoonótico.

Aliado a isso, sabe-se que severidade do quadro anatomopatológico depende do potencial de virulência do agente que é determinado pelo conjunto de

genes localizado nas ilhas de patogenicidade (PAIs) (KARIYAWASAM et al., 2006). Essas estruturas são constituídas de segmentos de DNA inseridos no cromossomo bacteriano que possuem mecanismos de virulência determinados pelos genes que o microrganismo possui (VIEIRA, 2009).

O mecanismo de virulência das amostras de *E. coli* patogênicas para aves (APEC) têm sido continuamente estudado e acredita-se ser multifatorial. Certas propriedades associadas a amostras virulentas vêm sendo identificadas em amostras de *E. coli* isoladas de aves (KNÖBL et al., 2008; ROCHA et al., 2008). Em exame de microscopia eletrônica, bactérias dos isolados mais patogênicos, foram observadas frequentemente em macrófagos, nos sacos aéreos e nos pulmões (POURBAKHSH et al., 1997).

A adaptação ao hospedeiro e a virulência de alguns patótipos de *E. coli* são atribuídos à aquisição horizontal de genes específicos por cepas não patogênicas que, então, tornam-se patogênicas (DOZOIS et al., 2003).

NEGLEKA et al.(2002) evidenciaram a importância dos antígenos de fimbrias e outras adesinas, como a produzida pelos genes *papC* e *tsh*. Estes genes têm importante papel nos estágios iniciais da infecção e são frequentemente considerados para delineamento de vacinas. Outro aspecto descrito por DELICATO et al.(2002) é que quando o gene *papC* está ausente, a função de adesão pode ser desempenhada pelo gene *tsh*, o que é comum nos isolados virulentos e de ocorrência rara em E. coli comensal.

Amostras de *E. coli* de origem aviária usualmente sequestram o ferro através da produção de aerobactina (MONROY et al., 2005). O “operon” aerobactina contém o gene responsável pela produção de hidroxamato sideróforo aerobactina, o gene *iuc*, sendo, por esta razão, importante na sobrevivência extracelular da bactéria (LING et al., 2013). Outro importante gene é o *iss.* Este gene está localizado no plasmídio ColV, de aproximadamente 100 kilobases, juntamente com outros genes de virulência e de resistência a antimicrobianos e pode ser transferido, por conjugação, para outras bactérias avirulentas, inclusive *E. coli* (JOHNSON et al., 2006). Através da conjugação, bactérias comensais, inclusive de espécies diferentes, podem se tornar mais patogênicas e resistentes (SKYBERG et al., 2003).

Comparando a presença do gene *iss* entre aves com manifestações relacionadas à colibacilose e aves saudáveis, o gene *iss* foi mais prevalente nas aves doentes (MCPEAKE et al., 2005). TIVENDALE et al. (2004), ao estudarem cepas de APEC, observaram que o gene *iss* estava relacionado a altos níveis de virulência.

Em alguns países, as informações epidemiológicas de APEC e possibilidade de transmissão de isolados clínicos de *E. coli* são bem documentadas, porém no Brasil, há pouco conhecimento sobre a epidemiologia, sorogrupos e distribuição de genes de virulência entre os isolados de *E. coli*, o que restringe o emprego de medidas de prevenção e controle epidemiológico (IKUNO et al., 2006).

Neste sentido, é cada vez mais frequente a necessidade de se monitorar a resistência a antimicrobianos como fator determinante para eleição e êxito do tratamento, evitando-se assim a transferência de genes relacionados à patogenicidade (BARROS et al., 2013). A resistência de *E. coli* a classes de agentes antimicrobianos é um achado comum, tanto na medicina humana quanto na veterinária, o que tem causado um crescente impacto no que seriam opções terapêuticas viáveis (BAUM & MARRE, 2005).

A resistência a múltiplos antimicrobianos pode indicar um possível potencial patogênico das cepas de *E. coli* para todos os tipos de aves, animais e mesmo para o homem. Autores têm desenvolvido estudos com a finalidade de verificar os níveis de resistência aos antimicrobianos, como é o caso de SALLE (2009) que pesquisou em 246 isolados de *E. coli* de frangos de corte e observou resistência a pelo menos duas das 14 drogas utilizadas. Ainda BARROS et al. (2013) avaliaram o perfil de sensibilidade a 13 antimicrobianos em 35 diferentes isolados de *E. coli* de aves comerciais com ou sem envolvimento com processos infecciosos. Os testes utilizados demonstraram que 94,28% dos isolados foram resistentes a três ou mais antimicrobianos. E LITERAK et al. (2013) analisaram um total de 114 isolados de *E. coli* quanto à resistência aos antimicrobianos e estas foram detectadas em 82% dos isolados.

Diante do exposto, este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de detectar genes de virulência em *E. coli* isoladas de órgãos de frangos de corte de

criações industriais e alternativas, bem como identificar o perfil de suscetibilidade a alguns antimicrobianos utilizados em medicina humana e veterinária.

REFERÊNCIAS

1. ABREU, D. L. DA C.; FRANCO, R. M.; NASCIMENTO, E. R.; PEREIRA, V. LÉO DE 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.

2. ADIRI, R.S.; GOPHNA, U.; RON, E.Z. Multilocus sequence typing (MLST) of *Eschericha coli* O78 strains. **FEMS Microbiology Letters**, v.222, p.199-203, 2003.

3. ANDRADE, M. A. Inoculação de *Salmonella enterica* subespecie *enterica* sorovar Enteritidis Fagotipo 4 em ovos embrionados de duas linhagens de frango de corte. Goiânia: Universidade Federal de Goiás. **Tese de doutorado.** 120p., 2005.

4. ANDREATTI FILHO, R. L. Colibacilose aviária. IN: ANDREATTI FILHO, R. L. **Saúde aviária e doenças**. São Paulo: Roca. p.112-117, 2006.

5. ANTÃO, E. M.; GLODDE, S.; LI, G.; SHARIFI, R.; HOMEIER, T.; LATURNUS A, C.; DIEHL , I.; BETHE, A.; PHILIPP, H.; PREISINGER, C. R.; WIELER, L. H.; EWERS, C. The chicken as a natural model for extraintestinal infections caused by avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). **Microbial Pathogenesis**. v. 45, p. 361-369, 2008.

6. BARROS, L. S. S.; SILVA, R. M.; SILVA, I. M.; BALIZA, M. D.; VIRGÍLIO, F. F. *Escherichia coli* from cellulitis lesions in broilers. **Journal of Food Measurement and Characterization.** v. 7, n.1, p. 40-45, 2013.

7. BAUM, V, H; MARRE, R. Antimicrobial Resistance of *Escherichia coli* and Therapeutic implications. **International Journal of Medical Microbiology**. v.295, p. 503-511, 2005.

8. BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO-Diário Oficial da República Federativa do Brasil. **Normatização e comercialização do frango Caipira ou frango Colonial, também denominado "Frango Tipo ou Estilo Caipira" ou "Tipo ou Estilo Colonial".** Ofício Circular DOI/DIPOA Nº 007/99, de 19 de maio de 1999.

9. 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 intracellulary. **Veterinary Microbiology.** v. 27, p.435-439, 2011.

10. DELICATO, E.R.; BRITO, B.G.; KONOPATZKI, A.P.; GAZIRI, L.C.; VIDOTTO, M.C. Occurrence of the temperature sensitive hemagglutinin among avian *Escherichia coli*. **Avian Diseases,** v.46, p.713-776, 2002.

11. DOZOIS, C. M.; DAIGLE, F.; CURTIS, R. Identification of pathogen-specific and conserved genes expressed in vivo by an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. **Proceedings of the National Academy,** v. 100, n. 1, p. 247-252, 2003.

12. FERREIRA, A. J. P.; KNOBL, T. Colibacilose. IN: JUNIOR, A. B.; SILVA, E. N.;FÁBIO, J. D.; SESTI, L. ZUANAZE, M. A. **Doença das aves.** 2 ed. Campinas: Fundação APINCO. p.457-471, 2009.

13. FUKAYAMA, E. H.; BERTECHINI, A. G.; GERALDO, A.; KANJI KATO, R. SOLIS MURGAS, L. D. Extrato de orégano como aditivo em rações para frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n. 6, p. 2316-2326, 2005.

14. GAMA, N. M. S. Laringotraqueíte: o caso brasileiro. In: CONFERÊNCIA APINCO 2004 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, Santos, **Anais...**Santos FACTA, 2004, p. 85-92.

15. GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. Qualidade das matérias primas, doenças transmitidas por alimentos, treinamento de recursos humanos. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos.** 3 ed. São Paulo: Livraria Varella, 2008.

16. GONÇALVES, P. M. R.; PEREIRA, V. L. DE A.; SILVA, R. DE C. FIGUEIRA ; OLIVEIRA, L. A. T. DE; NASCIMENTO, E. R. Perfil de resistência antimicrobiana de isolados de E*scherichia coli* positiva para gene *iss* em frangos de corte na idade de abate. **Enciclopédia Biosfera**, v.8, n.15; p. 2012.

17. GÓRNIAK, S. L.; SPINOSA, H. S. Antimicrobianos na Avicultura- Usos e Restrições, In: **Saúde Aviária e Doenças**, p. 35-40, 2007.

18. IKUNO, A. A.; GUASTALLI, M. R.; BUIM, N. M.; GAMA, 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, p.68-72, 2006.

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

20. KARIYAWASAM, S.; JOHNSON, T. J.; DEBROY, C.; NOLAN, L. K. Occurrence of pathogenicity island lAPEC-O1 genes among *Escherichia coli* implicated in avian colibacillosis. **Avian Diseases,** v.50, p.405-410, 2006.

21. KNÖBL, T.; GODOY, S. N.; MATUSHIMA, E. R.; GUIMARÃES, M. B.; FERREIRA, A. J. P. Caracterização molecular dos fatores de virulência de estirpes de *Escherichia coli* isoladas de papagaios com colibacilose aviária. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal *Science***, v. 45, p. 54-60, 2008.

22. KWON, S. G., CHA, S. Y.; CHOI, E. J.; KIM, B.; SONG, H. J; JANG, H. K. Epidemiological prevalence of avian pathogenic *Escherichia coli* differentiated by multiplex PCR from commercial chickens and hatchery in Korea. **Journal of Bacteriology and Virology,** v. 38, p.179-188, 2008.

23. LING, J.; PAN, H.; GAO, Q.; XIONG, L.; ZHOU, Y.; ZHANG, D.; GAO, S.; LIU, X. Aerobactin synthesis genes *iuc*A and *iuc*C contribute to the pathogenicity of avian pathogenic *Escherichia coli* O2 strain E058. **Plos One**, v.8, n.2, p.1-10, 2013.

24. LITERAK, I.; REITSCHMIED, T.; BUJNAKOVA, D.; DOLEJSKA, M.; CIZEK, A.; BARDON, J.;POKLUDOVA, L.; ALEXA, P.; HALOVA, D.; JAMBOROVA, I. Broilers as a Source of Quinolone-Resistant and Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* in the Czech Republic. **Microbial Drug Resistance,** v.19, n.1, 2013.

25. McPEAKE, S. J. W.; SMYTH, J. A.; BALL, H. J. Characterisation of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) associated with colisepticaemia compared to faecal isolates from healthy birds. **Veterinary Microbiology**, v. 110, p. 245-253, 2005.

26. MELLATA, M.; DHO-MOULIN, M.; DOZOIS, C.M.; CURTISS III, R.; BROWN, P.K.; ARNÉ, P.; BRÉE, A .; DESAUTELS, C.; FAIRBROTHER, J.M. Role of virulence factors resistance of avian pathogenic *Escherichia coli* to serum and in pathogenicity. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 1, p. 536-540, 2003.

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

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

29. NASCIMENTO, E. R. Micoplasmoses. In: BERCHIERI JR, A; MACARI, M. **Doença das Aves.** Campinas: FACTA. Cap. 4, p. 217-224. 490p, 2000.

30. NASCIMENTO, D. C. N.; SAKOMURA, N. K.; SIQUEIRA, J. C.; DOURADO, L. R. B. FERNANDES, J. B. K.; MALHEIROS, E. B. Exigências de lisina digestível para aves de corte da linhagem ISA Label criadas em semiconfinamento. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia,** v.61, n.5, p.1128-1138, 2009.

31. NEGLEKA, M.; BRERETON, L.; BROWN, G.; FAIRBROTHER, J. M. Pathotypes of avian *Escherichia coli* as related to *tsh*-, *papC*-, pil-, and *iuc*-DNA sequences, and antibiotic sensitivy of isolates from internal tissues and the cloacae of broilers. **Avian diseases,** v.46, n.1, p.143-152, 2002.

32. OH, J. Y.; KANG, M. S.; YOON, H.; CHO, H. W.; AN, B. K.; SHIN, E. G.; KIM, Y. J.; KIM, M. J.; KWON, J. H.; KWON, Y. K. The embryo lethality of *Escherichia coli* isolates and its relationship to the presence of virulence-associated genes**. Poultry Science**, v.91, p.370–375, 2012.

33. PINHEIRO, S. R. F.; SAKOMURA, N. K.; SIQUEIRA, J. C.; MARCATO, S. M. ; DOURADO, L. R. B.; FERNANDES, J. B. K.; MALHEIROS, E. B. Níveis nutricionais de cálcio para aves de corte ISA Label criadas sob semiconfinamento. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia,** v.63, n.1, p.231-238, 2011.

34. POURBAKHSH, S. A.; BOULIANNE, M.; MARTINEAU-DOIZ, B.; FAIRBROTHER, J. M. Virulence mechanisms of avian fimbriated *Escherichia coli* in experimentally inoculated chickens. **Veterinary Microbiology.** V. 58, p. 195-213, 1997.

35. RIZZI, C.; MARANGON, A.; CHIERICATO, G. M. Effect o genotype on slaughtering performance and meat physical and sensory characteristics of organic laying hens. **Poultry. Science**, v.86, p.128-135, 2007.

36. 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 case of poultry. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, p.183-186, 2008.

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

38. SAHOO,T. K.; SAHOO, L.; SARANGI, L. N.; PANDA, S. K.; PANDA, H. K. Prevalence, Isolation, Characterisation and Antibiogram Study of Pathogenic *Escherichia coli* from Different Poultry Farms of Odisha. **Journal of Advanced Veterinary Research,** v. 2, p. 169-172, 2012.

39. SALLE, F. O. Utilização da inteligência artificial (redes neurais artificiais) para a classificação da resistência a antimicrobianos e do comportamento bioquímico de amostras de *Escherichia coli* isoladas de frangos de corte. **Doutorado.** Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Veterinária. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, 2009.

40. SANTOS, A. L. Potencial de crescimento, desempenho, rendimento de carcaça e qualidade da carne de diferentes linhagens de frango de corte convencional e tipo caipira. Jaboticabal: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias**. Dissertação** (Mestrado em Zootecnia). 95p., 2004.

41. SCHOULER, C.; SCHAEFFER, B.; BRÉE, A.; MORA, A.; DAHBI, G.; BIET, F.; OSWALD, E.; MAINIL, J.; BLANCO, J. 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, 2012.

42. 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.

43. TEJKOWSKI, T. M. Prevalência de fatores associados a virulência em amostras de *Escherichia coli* patogênica aviária (APEC) isoladas de lesões de celulite aviária. **Monografia**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária. 35p, 2012.

44. 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, n. 11, p. 6554-6560, 2004.

45. UBABEF. **Relatório anual da União Brasileira de Avicultura**, 57p., 2013.

46. VIEIRA, M. A. M. Ilhas de patogenicidade. **O Mundo da Saúde**, v. 33, n.4, p. 406-414, 2009.

47. WALLMANN, J. Monitoring of antimicrobial resistence in pathogenic bacteria from livestock animals. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 41, p.81-86, 2006.

48. YANG, H.; CHEN, S.; WHITE, D.G.; ZHAO, S.; MCDERMOTT, P.; WALKER, R.; MENG, J. Characterization of multiple-antimicrobial-resistant *Escherichia coli* isolates from diseased chickens and swine in China. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 8, p. 3483-3489, 2004.

CAPÍTULO 2- GENES DE VIRULÊNCIA EM *Escherichia coli* isolada de lesões DE FRANGOS DE CORTE INDUSTRIAIS

RESUMO: O presente trabalho foi proposto com os objetivos de investigar a presença dos genes *papC*, *tsh, iuc* e *iss* de *E. coli* em amostras de órgãos macroscopicamente lesionados em frangos de corte. Para tanto foram coletadas 496 amostras de órgãos de 32 lotes em abatedouros de diferentes regiões do Estado de Goiás com lesões indicativas de hepatite, pericardite, aerossaculite e celulite. *E. coli* foi identificada em 76,21% (378/496) das amostras pesquisadas com os seguintes resultados: 76,92% (80/104) em hepatite, 73,88% (99/134) em pericardite, 77,95% (99/127) em aerossaculite e 77,95% (100/131) em celulite. O gene *tsh* e o *iuc* foram os que apresentaram maiores valores, 44,4% (32/72) e 45,8% (33/72), respectivamente. Para a detecção simultânea entre os genes, o maior valor ($p<0,05$) foi observado para *tsh-iuc* com 12,5% (9/72), entre *tsh-iuc-iss* com 11,1% (8/72) e entre os quatro genes deste estudo com 13,9% (10/72). Conclui-se que *E. coli* está presente em alta frequência em lesões de pericardite, hepatite, aerossaculite e celulite em frangos de corte industriais e que os genes *papC*, *tsh, iuc* e *iss* estiveram presentes nos isolados de *E. coli* e a detecção simultânea destes genes foi frequente.

Palavras-chave: abate, aves, colibacilose, lesões, PCR

CHAPTER 2- VIRULENCE FACTOR GENES IN *Escherichia coli* ISOLATED OF LESIONS FROM INDUSTRIAL BROILERS

ABSTRACT: The present study aimed to investigate the presence of genes *papC*, *tsh*, *iuc* and iss in *E. coli* samples of macroscopically bruised organs of broilers. Therefore, we collected 496 samples of organs with lesions indicative of hepatitis, pericarditis, aerosaculitis and cellulitis from 32 slaughterhouses in lots of different regions of the State of Goiás. *E. coli* was identified in 76.2 % (378/496) of the samples with the following results: 76.9% (80/ 104) hepatitis, 73.9% (99 /134) pericarditis, 77.9% (99/127) airsacculitis and 77.9% (100 /131) cellulite. The gene *tsh* and *iuc* presented the highest values, 44.4% (32/72) and 45.8 % (33/72), respectively. For the association among the genes, the highest value ($p < 0.05$) was observed for *tsh - iuc* with 12.5 % (9/72), among *tsh - iuc - iss* with 11.1% (8/72) and among the four genes in this study with 13.9%(10/72). We could conclude that *E. coli* is present in high frequency in lesions of pericarditis, hepatitis, aerosaculitis and cellulitis in industrial broilers and that *papC, tsh, iuc* and *iss* genes were present in isolates of *E. coli* and the simultaneous detection of these genes was common.

Keywords: colibacillosis, lesions, PCR, poultry, slaughter

INTRODUÇÃO

E. coli é conhecida como importante patógeno causadores de doenças em aves e mamíferos seja como agente primário ou secundário (KWON et al., 2008). Em aves, amostras de *E. coli* com a presença de alguns fatores de virulência são denominadas *E. coli* patogênica para aves (APEC) (ROCHA, 2008) e estão associados à infecções extra-intestinais de ordem sistêmica e/ou respiratória (SAHOO et al., 2012). Lesões de peri-hepatite, aerossaculite e pericardite são as lesões mais comuns causadas por esta bactéria, embora outras síndromes como salpingite, onfalite e osteomielite possam ser observadas. Destaque é atribuído a aerossaculite e celulite por desencadearem perdas consideráveis em abatedouros, principalmente quando a lesão é extensa, onde ocorre condenação de vísceras e carcaças (SAHOO et al. 2012). Ressalta-se ainda, que a perda de peso das aves, causada pela aerossaculite ocasiona desuniformidade do lote e com isso, falhas tecnológicas durante o abate podem propiciar corte do trato digestivo e consequente contaminação de carcaças por bactérias patogênicas (RUSSEL, 2003).

A adaptação ao hospedeiro e a virulência de alguns patótipos de *E. coli* são atribuídos à aquisição horizontal de genes específicos por cepas não patogênicas que, então, tornam-se patogênicas (DOZOIS et al., 2003). Estudos envolvendo cepas de APEC apontam os fenômenos de aderência bacteriana, crescimento em restrição do íon ferro e resistência sérica como principais responsáveis pela patogenia da doença (FERREIRA & KNÖBL, 2009). Nestas funções, destaque deve ser conferido ao gene relacionado à fímbria P (*papC), ao* relacionado ao fenômeno de adesão *(*gene *tsh)*, o gene *iuc* que codifica a aerobactina e o gene *iss* que codifica uma proteína promotora de resistência lítica.

O gene *papC* é uma adesina fimbrial com função de aderência, tem-se ainda relatos que este contribui também para prevenir a fagocitose de amostras de APEC e que está relacionado à colonização do epitélio respiratório (ROCHA et al., 2008). Entre as APEC, os antígenos de fimbria e outras adesinas, como a produzida pelo gene *tsh,* têm um importante papel nos primeiros estágios da infecção e frequentemente são consideradas para o delineamento de vacinas (NEGLEKA et al., 2002). Nos isolados em que o gene *papC* está ausente, a

função de adesão pode ser desempenhada pelo gene *tsh*, que é comum nos isolados virulentos e raro em comensais (DELICATO et al., 2002).

Já o sistema aerobactina é um sistema de aquisição de ferro, necessário ao crescimento bacteriano em hospedeiros, sendo mecanismo de virulência de cepas de APEC (CHOUIKHA et al., 2008). Estudos reforçam que a associação da aerobactina codificada pelo gene *iuc* e a proteína de resistência ao soro, codificada pelo gene *iss*, estão fortemente relacionadas com *E. coli* patogênicas, tanto para aves como para outras espécies animais (NEGLEKA et al., 2002) que pode ser transferido, por conjugação, para outras bactérias (JOHNSON et al., 2006).

Diante do exposto, o presente estudo foi desenvolvido com objetivos de investigar a presença de *E. coli* em órgãos coletados em abatedouros, com lesões sugestivas de colibacilose, bem como identificar a presença dos genes de virulência, *papC*, *tsh*, *iuc* e *iss* em isolados de *E. coli* destas lesões.

MATERIAL E MÉTODOS

Local

As coletas foram realizadas em abatedouros de frangos de corte sob inspeção no Estado de Goiás. As análises bacteriológicas foram realizadas no Laboratório de Bacteriologia e as de detecção dos genes de virulência no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Medicina Veterinária da Escola de Veterinária e Zootecnia (EVZ) da Universidade Federal de Goiás (UFG). Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA-PRPPG-UFG- Protocolo n. 018/11.

Coleta de amostras

Foram coletadas durante o período de um ano, amostras de 32 lotes de frangos de corte, num total de 496 órgãos, em abatedouros de 18 municípios de diferentes regiões do Estado de Goiás. No total, cada lote foi composto em média

por 1.600 frangos de corte. Coletou-se um órgão macroscopicamente alterado de cada ave e obteve-se o total de 496 amostras distribuídas em: 104 amostras de fígado (hepatite), 134 de coração (pericardite), 131 de pele (celulite) e 127 de suabes de sacos aéreos torácicos (aerossaculite).

Análise bacteriológica

Após a coleta asséptica, as amostras foram armazenadas em sacos plásticos individuais e então, acondicionadas em caixas térmicas com gelo e transportadas ao Laboratório de Bacteriologia da EVZ da UFG para análise bacteriológica de acordo com OLIVEIRA (2012). Os suabes e fragmentos de órgãos foram repicados em Ágar MacConkey e em caldo Brain Heart Infusion Broth (BHI) e imediatamente incubados a 37ºC/24h. Após esse tempo, se não fosse observado crescimento, novo repique era realizado em Agar MacConkey, a partir do caldo BHI, e então incubado a 37ºC/24h. De cada placa de ágar MacConkey, eram selecionadas três colônias, com características morfológicas da bactéria e repicadas em ágar tríplice açúcar ferro (TSI). Os tubos de TSI com crescimento característico de *E. coli,* foram submetidos a uma série de provas bioquímicas (INVIC) para identificar a bactéria. Os isolados de *E. coli* foram estocados em caldo BHI com glicerol e mantidos a -20ºC para posterior extração de DNA e realização da pesquisa dos genes de virulência.

Amostragem para detecção dos genes de virulência

Do total de 496 amostras, foram obtidos 378 isolados de *E. coli.* Estes isolados foram agrupados de acordo com o município onde as aves foram criadas, totalizando-se 18 grupos. Realizou-se então, um sorteio e cada grupo ficou composto por uma amostra de cada órgão. Foram selecionados, desta forma, 72 isolados de *E. coli* (18 municípios multiplicado por quatro órgãos), obtendo-se assim, 72 reações para cada gene pesquisado, e um total de 288 reações de PCR (72 isolados multiplicado por quatro genes).

Extração de DNA dos isolados de *E. coli*

Para detecção dos genes *papC, tsh, iuc* e *iss* foi utilizada a técnica de extração térmica descrita por SILVA et al. (2011). Assim, 1,0 mL da suspensão da cultura bacteriana em caldo BHI a 37ºC/24h foi coletado e centrifugado a 13.200 rpm/5min. O sobrenadante foi descartado e 800µL de água miliQ foram adicionados. Após homogeneização, os isolados foram submetidos a uma nova centrifugação nas mesmas condições mencionadas anteriormente. O sobrenadante foi descartado e 80µL de água miliQ foi adicionado. Após essa etapa, as amostras foram aquecidas à temperatura de 96º/10 min e o sobrenadante removido e congelado em tubos de polipropileno a -20ºC até o momento da análise.

Técnica de PCR para detecção dos genes de virulência

Para realização da PCR convencional foi estabelecido o volume de 50µL para o *mix* de reação, composto por 35,75 µL de água ultra pura (*DNase/RNase-Free Distilled Water – Invitrogen*), 5 µL de Tampão para PCR 10X (*Invitrogen,* concentração final de 1X), 2,0 µL de Cloreto de Magnésio 50 mM (*Invitrogen,* concentração final de 2 mM); 1µL de dNTP [dCTP, dATP, dGTP, dTTP] a 10 mM (*Amersham Biosciences*, concentração final de 0,2 mM); 0,5 µl a 10 µM (concentração final de 0,1 µM) do iniciador sense, 0,5 µL a 10 µM (concentração final de 0,1 µM) do iniciador anti-sense, 0,25 µl de Taq 5 U/µL (*Invitrogen,* concentração final de 1,25U) e 5 µL do produto de extração de DNA dos isolados.

Para as reações dos diferentes genes de virulência foram empregados pares de oligonucleotídeos para “*papC*” (JANSEN et al., 2001), “*tsh*” (MAURER et al., 1998), “*iuc*” (YAMAMOTO et al., 1995) e “*iss*” (HORNE et al., 2000). As sequências dos iniciadores estão descritas no Quadro 1.

QUADRO 1 - Iniciadores utilizados para a amplificação de genes de virulência de *E. coli*, pela PCR

Gene alvo	Sequência dos oligonucleotídeos (5´- 3´)	Tamanho do fragmento amplificado	Ta
papC	TGA TAT CAC GCA GTC AGT AGC	501pb	61ºC
	CCG GCC ATA TTC ACA TAA C		
tsh	GGG AAA TGA CCT GAA TGC TGG	400pb	55ºC
	CCG CTC ATC AGT CAG TAC CAC		
iuc	TAC CGG ATT GTC ATA TGC AGA CCG T	602pb	63ºC
	AAT ATC TTC CTC CAG TCC GGA GAA G		
iss	GTG GCG AAA ACT AGT AAA ACA GC	760pb	49ºC
	CGC CTC GGG GTG GAT AA		

Ta: temperatura de anelamento do par de iniciadores

O processo de amplificação foi realizado em termociclador (*Mastercycler Personal*, *Eppendorf*) programado para um ciclo inicial de 94^{o}C/2 min, seguido de 35 ciclos repetidos de 94^{o}C/30s, temperatura de anelamento (Ta) por 30 segundos e 72^{o}C/ 1 min. Após o último ciclo a reação foi terminada com uma etapa de extensão a 72^{o} C/2 min.

Para o controle negativo o volume referente à amostra foi substituído por água ultrapura (*DNase/RNase-Free Distilled Water – Invitrogen*). Os controles positivos utilizados neste trabalho pertencem à coleção de culturas do Laboratório de Ornitopatologia da FMVZ-USP (Quadro 2) e foram gentilmente cedidos pelo professor Antônio José Piantino Ferreira e pela professora Terezinha Knobl da Escola de Veterinária da Universidade de São Paulo (USP).

QUADRO 2 – Controles positivos utilizados na PCR para pesquisa de genes de virulência de *E. coli*

Numeração	Identificação do controle positivo
EC T27	Sorogrupo O78, positiva para os genes *papC, tsh, iss e iuc*
EC T33	Sorogrupo O8, positiva para os genes *papC, iuc e iss*
EC T14	Sorogrupo O2, positiva para os genes tsh, *iuc* e iss
EC T36	Sorogrupo O143, positiva para os genes tsh, *iuc* e iss

Os produtos de amplificação (10 µL) foram submetidos à eletroforese a 90 volts, durante 60 min, em gel de agarose 1,2% (Amersham Biosciences) e tampão TBE 1x. Como marcador de massa molecular foi utilizado o DNA Ladder 100 pb (Invitrogen). Após esta etapa, os géis foram corados por imersão em solução de brometo de etídio (0,6 µg/mL) por 10 min. A visualização foi feita em aparelho transiluminador de UV (Electronic UV Transilluminator, Ultra-Lum), em ambiente escuro e a documentação fotográfica dos resultados das eletroforeses efetivada em equipamento fotodocumentador de géis (Vilber Lourmat).

Análise Estatística

As respostas qualitativas foram analisadas pelo teste não paramétricos de qui-quadrado (X^2) a 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não houve diferença estatística entre os resultados de isolamento de *E. coli* em amostras coletadas de frangos de corte (Tabela 1).

TABELA 1- Frequência de *E. coli* em órgãos com alteração macroscópica oriundos de abatedouros de frangos de corte localizados em diferentes municípios do Estado de Goiás

Órgãos	N	n(positivo)	%
Fígado	104	80	76,9
Coração	134	99	73,9
Sacos aéreos	127	99	77,9
Pele	131	100	76,3
Total	496	378	76,2

Sem diferença significativa utilizando teste de qui-quadrado a 5%.

A frequência de *E. coli* nos sacos aéreos foi de 77,9% (99/127), o que confirma a participação deste agente em caso de aerossaculite. Esta bactéria após colonizar o trato respiratório, penetra na circulação sanguínea e pode invadir órgãos como fígado e coração, segundo MOULIN-SCHOULEUR et al. (2007). A detecção no fígado 76,9% (80/104) e coração 73,9% (99/134) também foram elevadas e não diferiram estatisticamente da frequência dos sacos aéreos o que sugere que as colocações de MOULIN-SCHOULEUR et al.,(2007) condizem com os resultados obtidos neste trabalho. SILVA et al. (2012) identificaram *E. coli* em 62 fígados de frangos de corte provenientes de abatedouros avícolas e isolaram esta bactéria em 45,5% das amostras. Destaca-se a importância das lesões nestes órgãos, pois representam perdas consideráveis em abatedouros, principalmente quando a lesão é extensa, com condenação de vísceras e/ou carcaças (BRASIL, 1998).

Neste estudo, detectou-se 76,3% (100/131) de *E. coli* em amostras *de* pele com lesões indicativas de celulite. SANTOS (2012) identificou 37% (11/25) de amostras positivas de *E. coli*, frequências menores ao encontrado neste trabalho. Por outro lado, BARROS et al. (2013) e VIEIRA et al. (2006), respectivamente, obtiveram frequências de 82,5% e 100% de *E. coli* em amostras com lesões de celulite. A variabilidade na frequência de isolados de *E. coli* em casos de celulite pode ser explicada pela patogênese da *E. coli* na pele, pois de acordo com pesquisas as lesões aparecem em horas ou dias e podem permanecer por semanas e serem totalmente reabsorvidas (GOMIS et al., 2002).

Na Figura 1 estão disponíveis fotos de eletroforeses realizadas para pesquisa dos genes *papC*, *tsh*, *iuc* e *iss*.

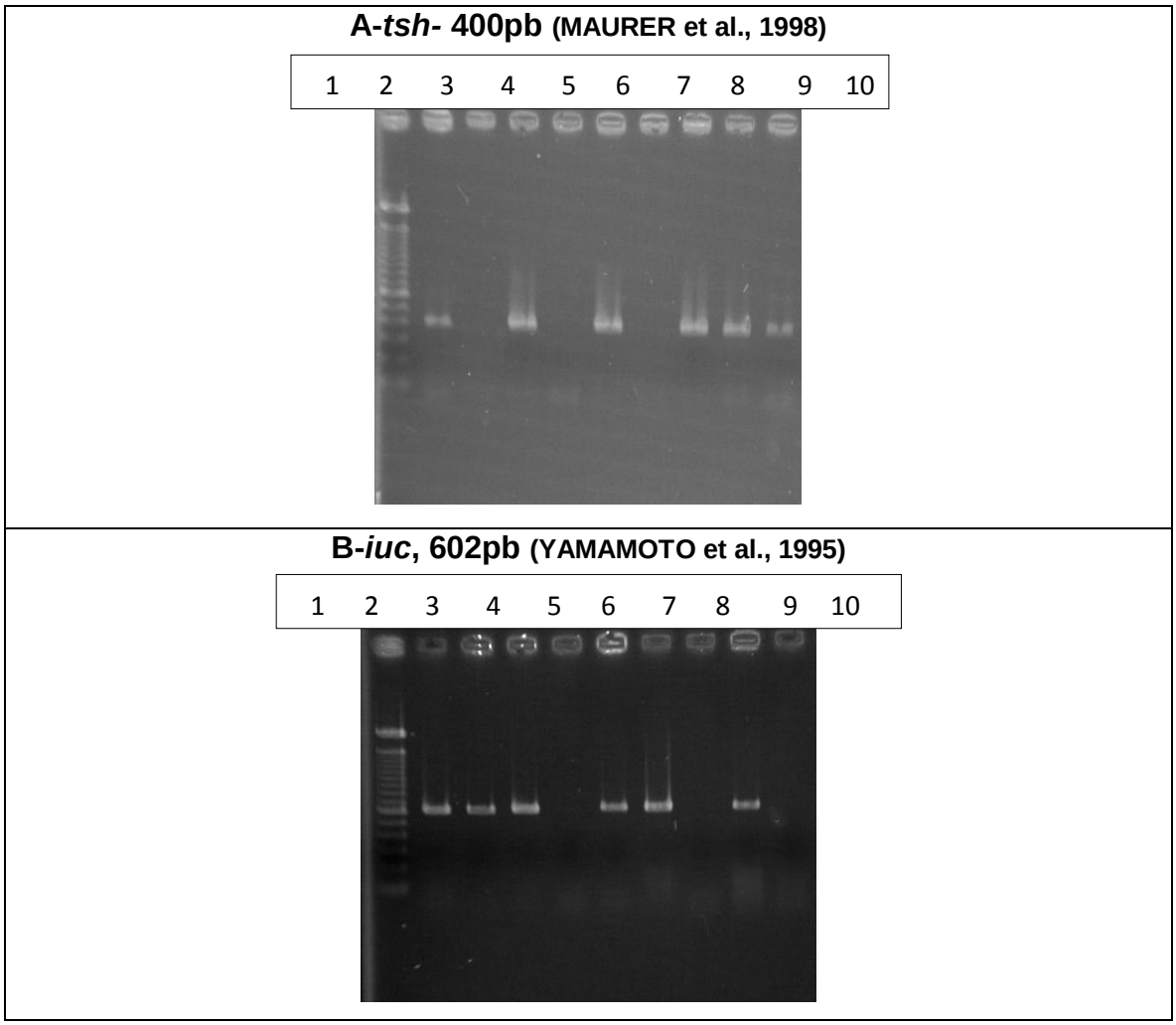


FIGURA 1: Eletroforese da PCR para detecção de genes de virulência de isolados de *E. coli* obtidos de frangos de corte de criações alternativas localizados em diferentes regiões do Estado de Goiás. A- 1: marcador de peso molecular, 2 e 3- controle positivo e negativo, respectivamente, 4, 6, 8 a 10- amostras positivas, 5 e 7- amostras negativas; B- 1: marcador de peso molecular, 2 a 4, 6 e 7- amostras positivas, 5 e 8-amostras negativas, 9 e 10-controle positivo e negativo, respectivamente.

Na Tabela 2 estão distribuídos os dados referentes à frequência total de detecção para os genes *papC, tsh, iuc e iss* em isolados de *E. coli* de abatedouros de frangos de corte. Observa-se que os genes *tsh* e *iuc* foram os que apresentaram as maiores frequências, diferindo estatisticamente dos genes *pap* e *iss*.

Os genes estudados foram detectados em todos os órgãos, e a frequência de genes distribuídos por órgãos não apresentou diferença significativa (Tabela 2).

TABELA 2- Frequência dos genes *papC*, *tsh*, *iuc e iss* detectados por PCR em isolados de *E. coli* obtidos de órgãos com alteração macroscópica oriundos de abatedouros de frangos de corte localizados em diferentes regiões do Estado de Goiás

Órgãos	*papC*			*tsh*			*iuc*			*iss*		
	N	n+*	%	N	n+	%	N	n+	%	N	n+	%
Fígado	18	5	27,8	18	8	44,5	18	8	44,5	18	4	22,2
Coração	18	4	22,2	18	9	50	18	10	55,6	18	5	27,8
Sacos aéreos	18	5	27,8	18	8	44,5	18	8	44,5	18	6	33,3
Pele	18	5	27,8	18	7	38,9	18	7	38,9	18	5	27,8
Total	72	19	26,4 a	72	32	44,4 b	72	33	45,8 b	72	20	27,8 a

* n(+): n positivo. Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas utilizando teste de qui-quadrado a 5%.

Neste trabalho, o gene *papC* esteve presente em 26,4% (19/72) dos isolados de *E. coli* no fígado, coração, pele e sacos aéreos lesionados. Provavelmente, este gene contribuiu para a ocorrência das lesões nestes órgãos, considerando as suas principais funções, que se constituem em um adesina fimbrial, com função de aderência e colonização de células epiteliais (KAWANO et al., 2006; ROCHA et al., 2008) as quais possibilitam *E. coli* invadir os tecidos, acessar à corrente sanguínea e desenvolver em órgãos sistêmicos como o coração e o figado (SZEMLAKO et al., 2013) .

Estes resultados podem ser confirmados com os resultados obtidos por DOZOIS et al. (1994) e POURBAKHSH et al. (1997) que inocularam aves, experimentalmente, via saco aéreo, com isolados de *E. coli* que expressavam as fímbrias P do gene *papC* e como resultado verificaram lesões nos sacos aéreos, pulmões e coração.

Os resultados foram semelhantes aos encontradas por JANBEN et al. (2001), VANDEMAELE et al. (2003) e ROCHA et al. (2008), que detectaram o gene *pap* em isolados de *E. coli* oriundos frangos de corte em 30%, 29% e 24%, respectivamente.

Por outro lado, IKUNO et al. (2006), KWON et al. (2008), WON et al. (2009) e ARABI et al. (2013) observaram frequências de 0%, 11%, 15% e 82,1%, para o *papC* em isolados de frangos de corte. As diferenças observadas entre este trabalho e de outros pesquisadores podem ser pelas variações regionais e/ou temporais entre os locais de condução dos estudos.

Adicionalmente deve-se considerar que o gene *papC* não foi detectado em todos os isolados de APEC. Isto permite inferir que, além deste gene outros fatores atuaram no processo infeccioso. O que se respalda em KARIYAWASAM & NOLA (2011) os quais descreveram que o gene *pap* desempenha um papel significativo no desenvolvimento de lesões da *E.coli*, entretanto não é essencial para a sua patogênese.

A presença do gene *tsh* foi verificada em sacos aéreos, fígado, coração e em lesões de celulite numa frequência de 44,4% (32/72). Este gene codifica uma adesina afimbrial que também desempenha papel importante na adesão bacteriana à célula hospedeira durante ligação à membrana bacteriana (KWON et al., 2008) e auxilia nos estágios iniciais de infecções em aves (ROCHA et al., 2002). Trabalhos desenvolvidos por DOZOIS et al., (2000) e DELICATO et al., (2003) condizem com os resultados deste estudo os quais relacionaram o depósito de fibrina e aumento da colonização da bactéria nos sacos aéreos.

As maiores frequências observadas, neste trabalho, para o gene *tsh* quando comparado ao gene *papC*, provavelmente tem respaldo no fato de que quando o gene *papC* está ausente, a função de adesão pode ser desempenhada pelo gene *tsh*, o que é comum nos isolados virulentos e de ocorrência rara em *E. coli* comensal (DELICATO et al., 2002).

Também para este trabalho, foram verificados isolados de *E. coli* que não possuíam o gene *tsh.* Pode ser que em alguns isolados de *E. coli* a função referente ao gene *tsh*, tenha sido desempenhada pelo gene *papC* ou ainda por outro gene não pesquisado neste trabalho.

MAURER et al. (1998) assim como OH et al. (2012) constataram frequências semelhantes do gene *tsh* e sugeriram a relação deste gene com a patogenicidade de APEC. Já KWON et al. (2008) e ROCHA et al. (2008), encontraram frequências mais elevadas do que a verificada neste trabalho.

Outro importante fator de virulência de cepas APEC é a capacidade de crescimento em meios sem ferro. O gene *iuc* utiliza o mecanismo de sequestro de ferro pela produção de aerobactina (MONROY et al., 2005),e foi detectado em 45,8% (33/72) das APEC e em conjunto com o *tsh* apresentaram as maiores frequências no total das amostras analisadas. Provavelmente, os genes *iuc* e *tsh* sejam mais importantes na invasão e/ou colonização dos órgãos de frangos que os demais genes estudados neste trabalho.

Resultados semelhantes ao presente trabalho, foram obtidos por WON et al. (2009), que mostraram que das 118 cepas de APEC, 47% continham o gene *iuc.* Por outro lado, maiores frequências aos deste estudo foram obtidos por EWERS et al. (2004), SOMEYA et al. (2007), KWON et al. (2008) e ARABI et al. (2013), os quais detectaram o gene *iuc* em 78,0%, 100,0%, 83% e 85,7% de APEC analisadas, respectivamente.

Nota-se também (Tabela 2) que nem todos os isolados de *E. coli* apresentaram o gene *iuc,* no entanto esta função pode ser compensada pela presença de *operons* cromossômicos que substituem a perda de *iuc* e tornam possível a captação de ferro (LING et al., 2013).

O gene *iss* foi detectado em 27,8% (20/72) dos isolados de coração, figado, sacos aéreos e peles lesionados. Este gene foi associado a casos de celulite e a colisepticemia por JEFFREY et al., (2002) e citado como o mais prevalente em cepas patogênicas por OZAWA et al.(2008). Estes resultados estão provavelmente relacionados a resistência sérica atribuída a ação deste gene (MONROY et al., 2005), que apesar de não ser o único mecanismo utilizado para alcançar os órgãos internos das aves e causar infecção, propicia habilidade em resistir aos fatores séricos inibitórios e escapar da ação do sistema complemento bem como da fagocitose nos processos de infecção sistêmica (MELLATA et al., 2003).

Os dados obtidos neste trabalho para o gene *iss*, foram menores que os comumente observados na literatura. Em trabalhos conduzidos por IKUNO et al. (2006), KWON et al. (2008), WON et al. (2009), ABREU et al. (2010) e BARROS et al. (2013) o gene *iss foi* detectado em 50%, 100%, 41%, 55% e 87,9%, respectivamente, das estirpes APEC.

Na Tabela 3 observam-se os dados referentes à detecção simultânea entre os genes de isolados de *E. coli* em abatedouros obtidos neste trabalho.

TABELA 3- Detecção simultânea dos genes *papC*, *tsh*, *iuc e iss,* em 72 isolados de *E. coli* obtidos de órgãos com alteração macroscópica oriundos de abatedouros de frangos de corte localizados em diferentes regiões do Estado de Goiás

Genes	**n(positivo)**	**%**
Nenhum gene	31	43,1 B
01 gene	08	11,1 A
02 genes		
pap – tsh	01	1,4 a
pap-iuc	02	2,8 a
pap-iss	00	0,0 a
tsh-iuc	09	12,5 b
tsh-iss	00	0,0 a
iuc-iss	01	1,4 a
Total	13	18,1 A
03 genes		
pap-tsh-iuc	01	1,4 a
pap-tsh-iss	00	0,0 a
pap-iuc-iss	00	0,0 a
tsh-iuc-iss	08	11,1 b
Total	09	12,5 A
04 genes *(pap-tsh-iuc-iss)*	11	15,3 Ab

Letras minúsculas/maiúsculas na mesma coluna indicam diferenças significativas utilizando teste de qui-quadrado a 5%.

Observa-se na Tabela 3 que há distintos perfis de combinação entre os genes. Os perfis foram compostos por 43,1% (31/72) para detecção de nenhum gene, 11,1% (8/72) de um gene único, 18,1% (13/72) com perfil duplo em diferentes combinações de genes, com 12,5% (9/72) com três genes e 15,3% (11/72) com 4 genes.

Verifica-se que para 43,1% (31/72) dos isolados de *E. coli* não ocorreu detecção dos genes pesquisados neste trabalho, por isso sugere-se que especificamente nestes isolados, as lesões observadas estiveram relacionadas a outros fatores ou a outros genes de virulência que não os deste estudo.

Nota-se ainda que as maiores frequências foram observadas para detecção simultânea dos genes *tsh-iuc*, *tsh-iuc-iss* e entre os quatro genes. A presença destes genes num mesmo isolado sugere que a lesão se desenvolveu

quando havia pelo menos dois genes que codificam fatores de virulência no isolado. São descritos muitos fatores associados à virulência de *E. coli* patogênica aviária, embora TEJKOWSKI (2012) relate que ainda não é possível estabelecer ou identificar todos os elementos causadores de lesões de colibacilose aviária. De acordo com RODRIGUES-SIEK et al. (2005) é possível que existam muitos perfis de genes relacionados à infecção aviária, já que as APECS podem determinar lesões extraintestinais com infecções localizadas como no caso de lesões de celulite ou sistêmicas, como no casos de lesões de coração, fígado, sacos aéreos. Um aspecto observado e que se embasa em BRITO et al., (2003), EWERS et al., (2007) e TEJKOWSKI (2012) que afirmaram que para uma cepa ser patogênica é necessária a presença de pelo menos um fator de adesão, outro de aquisição de ferro e outro de resistência sérica.

Mesmo considerando que a virulência de isolados de *E. coli* resulte da uma soma de genes de 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 seria confirmada apenas com a realização de outros testes experimentais como o teste de infecção *in vivo*.

CONCLUSÕES

Conclui-se que *E. coli* está presente em alta frequência em lesões de pericardite, hepatite, aerossaculite e celulite em frangos de corte industriais e que os genes *papC*, *tsh, iuc* e *iss* estiveram presentes em isolados de *E. coli* e a detecção simultânea destes genes foi detectada nas lesões.

REFERÊNCIAS

1. ABREU, D. L. DA C.; FRANCO, R. M.; NASCIMENTO, E. R.; PEREIRA, V. LÉO DE 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.

2. ARABI, S.; JAFARPOUR, M.; MIRINARGESI, M.; ASL, S. B.; NAGHSHBANDI, R.; 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.

3. BARROS, L. S. S.; SILVA, R. M.; SILVA, I. M.; BALIZA, M. D.; VIRGÍLIO, F. F. *Escherichia coli* from cellulitis lesions in broilers. Journal of Food Measurement and Characterization**.** v. 7, n.1, p. 40-45, 2013.

4. BRASIL. Ministério Da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. **Regulamento Técnico da Inspeção Tecnológica e Higiênico-Sanitária de Carne de Aves**. Portaria n° 210 de 10 de novembro de 1998.

5. BRITO, B. G.; GAZIRI, L. C. J.; VIDOTTO, M. C. Virulence factors and clonal relationships among E. coli strains isolated from broiler chickens with cellulitis. **Infection and Immunity**, v.71, n. 7, p. 4175-4177, 2003.

6. CHOUIKHA, I.; BREE, A.; MOULIN-SCHOULEUR, M.; GILOT, P.; GERMON, PIERRE .Differential expression of iutA and ibeA in the early stages of infection by extra-intestinal pathogenic *E. coli.* **Microbes and Infection**. v. 10, p. 432-438, 2008.

7. DELICATO, E.R.; BRITO, B.G.; KONOPATZKI, A.P.; GAZIRI, L.C.; VIDOTTO, M.C. Occurrence of the temperature sensitive hemagglutinin among avian *Escherichia coli*. **Avian Diseases,** v.46, p.713-776, 2002.

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

9. DOZOIS, C. M. ;N. CHANTELOUP, M.; DHO-MOULIN, A.; BREE, C.; DESAUTELS, J.M. FAIRBROTHER, Bacterial colonization and in vivo expression of F1 (type 1) fimbrial antigens in chickens experimentally infected with pathogenic *Escherichia coli*. **Avian Diseases.** v. 38, p.231-239, 1994.

10. DOZOIS, C. M.; DHO-MOLULIN, M., BREE, A.; FAIRBROTHER, C.; CURTIS, R. Relationship between the *Tsh* autotrasporter and pathogenicity of avian *Escherichia coli* isolated from septicemic chickens and turkeys. **Infection and Immunity,** Washington, v.68, p. 713-716, 2000.

11. DOZOIS, C. M.; DAIGLE, F.; CURTIS, R. Identification of pathogen-specific and conserved genes expressed in vivo by an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. **Proceedings of the National Academy.** v. 100, n. 1, p. 247-252, 2003.

12. EWERS, C.; JANβEN, T.; KIESSLING, S; PHILIP, H. C.; WIELER, L. H. Molecular epidemiology of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from colisepticemia in poultry. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 104, n. 1-2, p. 91-101, 2004.

13. EWERS, C.; LI, G.; WILKING, H.; KIESSLING, S.; ANTAO, E. M. Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: how closely related are they? **International Journal of Medical Microbiology.** v. 297, p.163–76, 2007.

14. FERREIRA, A. J. P.; KNOBL, T. Colibacilose. IN: JUNIOR, A. B.; SILVA, E. N.; FÁBIO, J. D.; SESTI, L. ZUANAZE, M. A. **Doença das aves.** 2 ed. Campinas: Fundação APINCO. p. 457-471, 2009.

15. GOMIS, S.; AMOAKO, K.; NGELEKA, M.; BELANGER, L.; ALTHOUSE, B.; KUMOR, L.; WATERS, E.; STEPHENS, S.; RIDDELL, C. Histopathologic and bacteriologic evaluations of cellulitis detected in legs and caudal abdominal regions of turkeys. **Avian Diseases.** v.46, n.1, p. 192-197, 2002.

16. GONÇALVES, P. M. R.; PEREIRA, V. L. DE A.; SILVA, R. DE C. FIGUEIRA ; OLIVEIRA, L. A. T. DE; NASCIMENTO, E. R. Perfil de resistência antimicrobiana de isolados de E*scherichia coli* positiva para gene *iss* em frangos de corte na idade de abate. **Enciclopédia Biosfera**, v.8, n.15; p. 2012.

17. HORNE, S.M.; PFAFF-MACDONOUGH, S.J.; GIDDINGS, C.W.; NOLAN, L.K. Cloning and sequencing of the *iss* gene from a virulent *Avian Escherichia coli.* **Avian Diseases**, v.44, p.179-184, 2000.

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

19. 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.

20. JEFFREY, J.S.; NOLAN, L.K.; TONOOKA, K.H.; WOLFE, S.; GIDDINGS, C.W.; HORNE, S.M.; FOLEY, S.L.; LYNNE, A .M.; EBERT, J.O.; ELIJAH, L. Virulence factors of *Escherichia coli* from cellulitis or colisepticemia lesions in chickens. **Avian Diseases**, v. 46, p. 48-52, 2002.

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

22. KARIYAWASAM, S.; NOLAN, L. K. *PapC*A gene of avian pathogenic *Escherichia coli*. **Avian diseases**, Kennet Square, v.55, n.1, p.532-538, 2011.

23. 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**, Tokyo, v. 50, n. 12, 961-966, 2006.

24. KNÖBL, T.; GODOY, S. N.; MATUSHIMA, E. R.; GUIMARÃES, M. B.; FERREIRA, A. J. P. Caracterização molecular dos fatores de virulência de estirpes de *Escherichia coli* isoladas de papagaios com colibacilose aviária. **Brazilian Journal of *V*eterinary Research and Animal *Science***. São Paulo, v. 45, suplemento, p. 54-60, 2008.

25. KWON, S. G., CHA, S. Y.; CHOI, E. J.; KIM, B.; SONG, H. J; JANG, H. K. Epidemiological prevalence of avian pathogenic *Escherichia coli* differentiated by multiplex PCR from commercial chickens and hatchery in Korea. **Journal of Bacteriology and Virology,** v. 38, p.179-188, 2008.

26. LING, J.; PAN, H.; GAO, Q.; XIONG, L.; ZHOU, Y.; ZHANG, D.; GAO, S.; LIU, X. Aerobactin synthesis genes *iuc*A and *iuc*C contribute to the pathogenicity of avian pathogenic *Escherichia coli* O2 strain E058. **Plos one**, v.8, n.2, p.1 -10,2013.

27. 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**, kennett Square, v. 42, n. 1, p.106-118, 1998.

28. MELLATA, M.; DHO-MOULIN, M.; DOZOIS, C.M.; CURTISS III, R.; BROWN, P.K.; ARNÉ, P.; BRÉE, A .; DESAUTELS, C.; FAIRBROTHER, J.M. Role of virulence factors resistance of avian pathogenic *Escherichia coli* to serum and in pathogenicity. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 1, p. 536-540, 2003.

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

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

31. NEGLEKA, M.; BRERETON, L.; BROWN, G.; FAIRBROTHER, J. M. Pathotypes of avian *Escherichia coli* as related to *tsh*-, *papC*-, pil-, and *iuc*-DNA sequences, and antibiotic sensitivy of isolates from internal tissues and the cloacae of broilers. **Avian diseases**, v. 46, n.1, p.143-152, 2002.

32. OH, J. Y.; KANG, M. S.; YOON, H.; CHO, H. W.; AN, B. K.; SHIN, E. G.; KIM, Y. J.; KIM, M. J.; KWON, J. H.; KWON, Y. K. The embryo lethality of *Escherichia coli* isolates and its relationship to the presence of virulence-associated genes**. Poultry Science**, v.91, p.370–375, 2012.

33. OLIVEIRA, S.J.; **Guia bacteriológico prático**. Ulbra: Canoas, 2012. 260p.

34. OZAWA M., HARADA K., KOJIMA A., ASAI T. & SAMESHIMA T. Antimicrobial susceptibilities, serogroups, and molecular characterization of avian pathogenic *Escherichia coli* isolates in Japan. **Avian Diseases**. v. 52, n.3, p.392-397, 2008.

35. POURBAKHSH, S. A.; DHO-MOULIN, M.; BRÉE, A.; DESAUTELS, C.; DOIZE, B. M.; FAIRBROTHER, J. M. Localization of the *in vivo* expression of P and F1 fimbriae in chickens experimentally inoculated with pathogenic *Escherichia coli*. **Microbiology Pathogenesis**, v. 22, p. 331-341, 1997.

36. ROCHA, A. C. G. P.; SILVA, A. B.; BRITO, B. G.; MORAES, H. L.; PONTES, A. P.; CÉ, M. C.; NASCIMENTOS, 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, n.3, p. 749-753, 2002.

37. ROCHA, A. C. G. P. Genes associados à patogenicidade de *Escherichia coli* patogênica para aves (APEC) isoladas de frangos de corte com sintomatologia clínica respiratória**. Pesquisa Veterinária Brasileira.** v. 28, n.3, p. 183-186, 2008.

38. 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 case of poultry. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, p.183-186, 2008.

39. RODRIGUEZ-SIEK, K. E. GIDDINGS, C. W. DOETKOT, 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, 2005.

40. RUSSEL, S. M. The effect of airsacculitis on bird weights, uniformity, fecal contamination, processing errors, and populations of Campylobacter spp. and *Escherichia coli*. **Poultry Science**, v. 82, p. 1326-1331, 2003.

41. SAHOO,T. K.; SAHOO, L.; SARANGI, L. N.; PANDA, S. K.; PANDA, H. K. Prevalence, Isolation, Characterisation and Antibiogram Study of Pathogenic *Escherichia coli* from Different Poultry Farms of Odisha. **Journal of Advanced Veterinary Research,** v. 2, p. 169-172, 2012.

42. SANTOS, M. M. dos. Resistência antimicrobiana em cepas bacterianas isoladas de celulite aviária. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, **Dissertação de Mestrado**. 66p, 2012.

43. SILVA, I. M. M.; EVÊNCIO-NETO, J.; SILVA, R .M.; LUCENA-SILVA, N.; MAGALHÃES, J.; BALIZA M. Caracterização genotípica dos isolados de *Escherichia coli* provenientes de frangos de corte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.63, n.2, p.333-339, 2011.

44. SILVA, I. de M. M. da; BALIZA, M.; SANTOS, M. P.; REBOUÇAS, L. T.; ROCHA, E.; Verônica da S.; SANTOS, V. A. dos; SILVA, R. M. da; EVÊNCIO-NETO, J. Presença de *Escherichia coli* em fígados de frangos provenientes de abatedouros avícolas. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal,** v.13, n.3, p.694-700, 2012.

45. SOMEYA, A.; OTSUKI, K., MURASE, T. Characterization of *Escherichia coli* strains obtained from layer chickens affected with colibacillosis in a commercial egg-producing farm. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 69, n. 10, p.1009-1014, 2007.

46. TEJKOWSKI, T. M. Prevalência de fatores associados a virulência em amostras de *Escherichia coli* patogênica aviária (APEC) isoladas de lesões de celulite aviária.**Monografia**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária. 35p.2012.

47. VANDEMAELE, F. J.; MUGASA, J. P.; VANDEKERCHOVE, D.; GODDEERIS, B. M. Corrigendum to Predominance of the papGII allele with high sequence homology to that of human isolates among avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). **Veterinary Microbiology**. V. 97, n. 3-4, p. 245-257, 2003.

48. VIEIRA, T. B.; FRANCO, R. M.; MAGALHÃES, H.; PRAXEDES, C. I. S.; TORTELLY, R. Celulite em frangos de corte abatidos sob inspeção sanitária:aspectos anatomopatológicos associados ao isolamento de *Escherichia coli*. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária.** v. 13, n. 3, p. 174-177, 2006.

49. WON, G.Y., B.M.MOON, I.G. OH, K. MATSUDA, A.A. CHAUDHARI, J. HUR, S.K. EO, I. YU, Y.J. LEE, J.H. PARK, S.K. Y.S.LEE, B.S. KIM AND J.H. LEE. Profiles of virulence-associated genes of avian pathogenic *Escherichia coli* isolates from chicken colibacillosis. **Journal of Poultry Science**,v. 46, p.260-266, 2009.

50. YAMAMOTO, S.; TERAI, A.; YURI, K.; KURAZONO, H.; TAKEDA, Y.; YOSHIDA, O. Detection of urovirulence factors in *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. **FEMS Immunology and Medical Microbiology,** v.12, p. 85-90, 1995.

CAPÍTULO 3- GENES DE VIRULÊNCIA EM ISOLADOS DE *Escherichia coli* DE FRANGOS DE CORTE DE CRIAÇÕES ALTERNATIVAS

RESUMO: Foram atendidas 64 propriedades de criações alternativas, com objetivo de investigar as principais alterações anatomopatológicas geradas por *E. coli* e sua relação a genes de virulência. Para tanto, foram coletadas amostras de 32 propriedades onde as aves não apresentavam quadros respiratórios e 32 onde apresentavam quadros respiratórios. Durante as necropsias, alterações clínicas e anatomopatológicas foram registradas e fragmentos de fígado e coração, bem como conteúdo intestinal e suabes de traquéia e sacos aéreos foram coletados de cada ave. *E. coli* foi identificada de aves sem quadro respiratório em 5,3% (5/95), 7,4% (7/95), 4,2% (4/95), 3,2% (3/95) e 3,2% (3/95) das amostras de fígado, coração, sacos aéreos, intestino e traquéia respectivamente. Em aves com sinais respiratórios, *E. coli* foi identificada em 22,7% (35/154), 18,2% (28/154), 22,7% (35/154), 18,3% (29/154) e 18,3% (29/154) das amostras de fígados, coração, sacos aéreos, intestino e traquéia, respectivamente. As frequências de isolamento de *E. coli* e de achados à necropsia foram maiores para criações com quadro respiratório. Para o grupo sem quadro respiratório, diferiram a detecção entre *iuc,* 36,4% (8/22) e *iss*, 9,1% (2/22). Também se observou que a detecção simultânea de *iuc-iss* ($p<0,05$) apresentou as maiores frequências no grupo com quadro respiratório. Conclui-se que *E. coli* está presente em lesões de aerossaculite, traqueíte, pericardite e enterite e que os genes *papC*, *tsh, iuc* e *iss* foram detectados nos isolados de *E. coli* tanto em detecção simultânea quanto isoladamente.

Palavras-chave: aves, crescimento lento, colibacilose, genes, necropsia

CHAPTER 3- VIRULENCE GENES IN ISOLATES OF *Escherichia coli* FROM ALTERNATIVE BROILER BREEDING

ABSTRACT: We attended 64 alternative breeding properties, in order to investigate the main pathological changes generated by *E. coli* and their relation with virulence genes. Therefore, samples were collected from 32 farms where birds did not present any respiratory alterations and from 32 where they did. During the necropsies, clinical and pathological data were evaluated and fragments of liver and heart, intestinal contents and swabs from trachea and air sacs were collected from each bird. *E. coli* was identified in birds with no respiratory alterations in 5.3% (5/ 95), 7.4% (7 /95), 4.2 % (4 /95), 3.2% (3/ 95) and 3.2% (3/95) of liver, heart, air sacs, intestine and trachea samples, respectively. In birds with respiratory alterations, *E. coli* was identified in 22.7% (35/154), 18.2% (28/154), 22.7% (35/154), 18.3% (29/154) and 18.3% (29/154) of liver, heart, air sacs, intestine and trachea samples, respectively. The isolation of *E. coli* and findings at necropsies were lower ($p < 0.05$) for birds without respiratory symptoms when compared with birds with respiratory alterations. For the group without respiratory symptoms, detection between *iuc,* 36.4% (8/22), and *iss*, 9.1% (2/22), differed. The gene showed *iuc* ($p < 0.05$) for the group with respiratory symptoms compared to the iss gene. The association between *iuc - iss*

presented ($p < 0.05$) the greatest results, 10.1% (7/69) for the group with respiratory symptoms. We could conclude that *E. coli* is present in lesions of aerosaculitis, tracheitis, pericarditis and enteritis and that *papC, tsh, iuc* and *iss* genes were detected in isolates of *E. coli* in both simultaneous and isolated detection.

Keywords: colibacillosis, genes, necropsy, poultry, slow growth broilers

INTRODUÇÃO

Nos mercados de produtos avícolas, existe um segmento diferenciado, composto por consumidores que buscam um produto com características diferentes daquelas encontradas no frango convencional criado em sistema intensivo (NASCIMENTO et al., 2009). Para alguns destes, as criações alternativas de frangos de corte mostram-se uma alternativa apropriada, uma vez que neste sistema de produção, qualidades sensoriais como textura e coloração. Por isso é necessário que haja incentivo ao crescimento deste setor, uma vez que além do fator nutricional e/ou de predileção do consumidor, este tipo de criação de aves é fonte de renda principalmente para pequenos agricultores.

As condições de produção de aves alternativas apresentam maior risco sanitário do que as criações de aves convencionais, já que medidas de biossegurança nem sempre são consideradas. Contribuem para isso fatores como, a criação de aves com idades múltiplas dentro de um mesmo galpão e a diversidade dos sistemas de produção, sendo que uns reproduzem pintos de um dia na propriedade e outros adquirem os mesmos em agropecuárias ou em incubatórios (FIGUEIREDO et al., 2001). Dentre estas doenças grande destaque deve ser atribuído a colibacilose e também a doenças respiratórias crônicas em aves, cujo agente mais envolvido tem sido a *Escherichia coli.*

Este microrganismo geralmente é eliminado nas excretas e a colonização do trato intestinal ocorre logo após o nascimento, permanecendo como componente importante da microbiota normal do intestino por toda a vida do seu hospedeiro (MOREIRA, 2007). Porém, além das cepas comensais, existem cepas de *E. coli* patogênica para aves (APEC) que são responsáveis por vários processos patológicos extra-intestinais como agente primário ou secundário (PIATTI & BALDASSI, 2007).

Essas amostras patogênicas de *E. coli*, muitas vezes auxiliadas por condições ambientais ou outros agentes infecciosos, acabam determinando a invasão do sistema respiratório pela bactéria (ANDREATTI FILHO, 2006), com colonização de traquéia, sacos aéreos e pulmão (REESE et al., 2006). Após invadir a corrente circulatória, ocorre uma síndrome complexa, denominada colibacilose, com lesões em múltiplos órgãos e quadros de septicemia (LAMARCHE et al., 2005).

Lesões de aerossaculite, peri-hepatite e pericardite, oriundo destas lesões, geram prejuízos econômicos decorrentes de menor desenvolvimento corpóreo, pior conversão alimentar, mortalidade embrionária, aumento da mortalidade e custos com medicamentos. Sendo por isso, um dos principais problemas da avicultura (ROCHA, 2008). A severidade do quadro anatomopatológico depende da virulência do agente, que é geralmente determinado pelo conjunto de genes que o microrganismo possui (KARIYAWASAM et al., 2006).

O mecanismo de virulência das amostras de *E. coli* patogênicas para aves (APEC) têm sido continuamente estudado e acredita-se ser multifatorial. Genes associados a amostras virulentas vêm sendo identificados em amostras de *E. coli* isoladas de aves, dentre estas destacam-se o *papC* (fímbria P*),* gene *tsh (adesão)*, o gene *iuc (*aerobactina) e o gene *iss (*resistência lítica) (ROCHA et al., 2008; KNÖBL et al., 2008).

Diante do exposto, o presente estudo foi desenvolvido visando investigar as principais alterações anatomopatológicas à necropsia determinados pelos isolados de *E. coli*, bem como a presença dos genes *papC*, *tsh, iuc* e *iss* nestes isolados.

MATERIAL E MÉTODOS

Local

O experimento foi realizado no Núcleo Experimental de Doenças de Aves, as análises bacteriológicas no Laboratório de Bacteriologia e as de

detecção dos genes de virulência no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP) da Escola de Veterinária e Zootecnia (EVZ) da Universidade Federal de Goiás (UFG). Este trabalho tem aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA-PRPPG-UFG- Protocolo número 018/11.

Coleta de amostras

As aves doentes foram atendidas no Núcleo Experimental de Doenças de Aves da EVZ/UFG efetuando-se os registros de históricos das mesmas em fichário próprio. Em seguida, as mesmas foram acomodadas em gaiolas no Setor de Doenças de Aves da EVZ/UFG até o momento da necropsia e coleta de amostras. Para cada lote, o número médio de aves alojadas era de 2.000 aves, com faixa de variação de 600 a 3000 de diferentes linhagens de frangos de corte de criações alternativas.

Durante as necropsias, as alterações patológicas encontradas eram anotadas e o conteúdo intestinal da região do divertículo de Meckel, fragmentos de fígado e coração, bem como suabes de traquéia e sacos aéreos de cada ave coletados. Este procedimento foi realizado em 32 lotes para criações sem problema respiratório, com um total de 95 amostras por órgão e em 32 lotes de criações com problemas respiratórios, com um total de 154 amostras de cada órgão. Desta forma, foram coletadas 1.245 amostras de órgãos de criações alternativas.

Análises bacteriológicas

Após a coleta asséptica utilizando bico de bunsen e placas de petri, pinças e tesouras esterilizadas, as amostras foram transportadas ao Laboratório de Bacteriologia do DMVP da EVZ/UFG, sob refrigeração em caixas de isopor com gelo, para confirmação de diagnóstico de acordo com OLIVEIRA (2012). Os suabes e fragmentos de órgãos foram repicados em ágar MacConkey e em caldo BHI (Brain Heart Infusion) e imediatamente incubados a 37ºC/24h. Após esta etapa, se não fosse observado crescimento no ágar MacConkey, novo repique

era realizado no mesmo a partir do Caldo BHI, e então incubado a 37ºC/24h. Foram selecionadas três colônias de cada colônia típica, e então repicadas em ágar tríplice açúcar ferro (TSI). Os tubos de TSI com crescimento característico de *E. coli,* foram submetidos a uma série de provas bioquímicas (INVIC) para identificar a bactéria.

Amostragem

Do total de 1245 amostras, 178 amostras foram confirmadas como *E. coli*, sendo 22 isolados de frangos de corte com quadro respiratório e 156 isolados de frangos com quadro respiratório. Estas amostras foram agrupadas de acordo com o município de criação das aves e então submetidas a um sorteio aleatório. Portanto, selecionaram-se 91 amostras (69 isolados do grupo com quadro respiratório e 22 sem quadro respiratório), obtendo-se assim, 91 reações para cada gene pesquisado, e um total de 364 reações de PCR. Ressalta-se que foi coletado um isolado de cada órgão por município.

Extração de DNA dos isolados de *E. coli*

Para detecção dos genes *papC, tsh, iuc* e *iss* foi utilizada a técnica de extração térmica descrita por SILVA et al. (2011). Assim, 1 mL da suspensão da cultura bacteriana em caldo BHI a 37ºC/24h foi coletado e centrifugado a 13.200 rpm/ 5min. O sobrenadante foi descartado e 800µL de água miliQ foram adicionados. Após homogeneização, os isolados foram submetidos a uma nova centrifugação nas mesmas condições mencionadas anteriormente. O sobrenadante foi descartado e 80µL de água miliQ foi adicionado. Após essa etapa, as amostras foram aquecidas à temperatura de 96º/10 min e o sobrenadante removido e congelado em tubos de polipropileno a -20ºC até o momento da análise.

Técnica de PCR para detecção dos genes de virulência

Para realização da PCR convencional foi estabelecido o volume de 50µL para o *mix* de reação, composto por 35,75 µL de água ultra pura (*DNase/RNase-Free Distilled Water – Invitrogen*), 5 µL de Tampão para PCR 10X (*Invitrogen,* concentração final de 1X), 2,0 µL de Cloreto de Magnésio 50 mM (*Invitrogen,* concentração final de 2 mM); 1µL de dNTP [dCTP, dATP, dGTP, dTTP] a 10 mM (*Amersham Biosciences*, concentração final de 0,2 mM); 0,5 µl a 10 µM (concentração final de 0,1 µM) do iniciador sense, 0,5 µL a 10 µM (concentração final de 0,1 µM) do iniciador anti-sense, 0,25 µl de Taq 5 U/µL (*Invitrogen,* concentração final de 1,25U) e 5 µL do produto de extração de DNA dos isolados.

Para as reações dos diferentes genes de virulência foram empregados pares de oligonucleotídeos para "*papC*" (JANSEN et al., 2001), "*tsh*" (MAURER et al., 1998), "*iuc*" (YAMAMOTO et al., 1995) e "*iss*" (HORNE et al., 2000). As sequências dos iniciadores estão descritas no Quadro 1.

QUADRO 1 - Iniciadores utilizados para a amplificação de genes de virulência de *E. coli*, pela PCR

Gene alvo	Sequência dos oligonucleotídeos (5´- 3´)	Tamanho do fragmento amplificado	Ta
papC	TGA TAT CAC GCA GTC AGT AGC	501pb	61ºC
	CCG GCC ATA TTC ACA TAA C		
tsh	GGG AAA TGA CCT GAA TGC TGG	400pb	55ºC
	CCG CTC ATC AGT CAG TAC CAC		
iuc	TAC CGG ATT GTC ATA TGC AGA CCG T	602pb	63ºC
	AAT ATC TTC CTC CAG TCC GGA GAA G		
iss	GTG GCG AAA ACT AGT AAA ACA GC	760pb	49ºC
	CGC CTC GGG GTG GAT AA		

Ta: temperatura de anelamento do par de iniciadores

O processo de amplificação foi realizado em termociclador (*Mastercycler Personal*, *Eppendorf*) programado para um ciclo inicial de 94^{o}C/2 min, seguido de 35 ciclos repetidos de 94^{o}C/30s, temperatura de anelamento (Ta)

por 30 segundos e 72°C/ 1 min. Após o último ciclo a reação foi terminada com uma etapa de extensão a 72° C/2 min.

Para o controle negativo o volume referente à amostra foi substituído por água ultrapura (*DNase/RNase-Free Distilled Water – Invitrogen*). Os controles positivos utilizados neste trabalho pertencem à coleção de culturas do Laboratório de Ornitopatologia da FMVZ-USP (Quadro 2) e foram gentilmente cedidos pelo professor Antônio José Piantino Ferreira e pela professora Terezinha Knobl da Escola de Veterinária da Universidade de São Paulo (USP).

QUADRO 2 – Controles positivos utilizados na PCR para pesquisa de genes de virulência de *E. coli*

Numeração	Identificação do controle positivo
EC T27	Sorogrupo O78, positiva para os genes *papC, tsh, iss e iuc*
EC T33	Sorogrupo O8, positiva para os genes *papC, iuc e iss*
EC T14	Sorogrupo O2, positiva para os genes tsh, *iuc* e iss
EC T36	Sorogrupo O143, positiva para os genes tsh, *iuc* e iss

Os produtos de amplificação (10 µL) foram submetidos à eletroforese a 90 volts, durante 60 min, em gel de agarose 1,2% (Agarose NA – Amersham Biosciences) e tampão TBE 1x. Como marcador de massa molecular foi empregado o DNA Ladder 100 pb (Invitrogen). Após esta etapa, os géis foram corados por imersão em solução de brometo de etídio (0,6 µg/mL) por 10 min. A visualização foi feita em aparelho transiluminador de UV (Electronic UV Transilluminator, Ultra-Lum), em ambiente escuro e a documentação fotográfica dos resultados das eletroforeses foi efetivada em equipamento fotodocumentador de géis (Vilber Lourmat).

Análise Estatística

As respostas qualitativas foram analisadas pelo teste não paramétricos de qui-quadrado (X^2) a 5%. Para verificar a relação entre o isolamento de *Escherichia coli* e as lesões observadas à necropsia foi utilizado o teste de McNemar´s a 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nota-se na Tabela 1, que para alterações macroscópicas identificadas à necropsia, as maiores frequências (p<0,05) foram observadas para amostras de criações com quadro respiratório quando comparadas a criações sem quadro respiratório, exceto para os quadros de hepatite.

TABELA 1-Frequência de isolados de *E. coli* em órgãos de frangos de corte de criações alternativas com e sem sinais respiratórios, localizados em diferentes regiões do Estado de Goiás

Alterações macroscópicas e clínicas					Isolamento de *E. coli*		
Lesões	Sinais	N	n(+) *	%	n(+)	%	p**
Hepatite	Sem	95	28	29,5 a	05	5,3 a	<0,001
	Com	154	56	36,4 a	35	22,7 b	<0,001
Pericardite	Sem	95	04	4,2 a	07	7,4 a	NS
	Com	154	23	14,9b	28	18,2 b	NS
Aerossaculite	Sem	95	02	2,1a	04	4,2 a	NS
	Com	154	76	49,4 b	35	22,7 b	<0,001
Enterite	Sem	95	16	16,8 a	03	3,2 a	<0,001
	Com	154	49	31,8 b	29	18,3 b	<0,001
Traqueíte	Sem	95	04	4,2 a	03	3,2 a	NS
	Com	154	32	20,8 b	29	18,3 b	NS

*n(**+**): n positivo; **Resultados utilizando teste McNemar's a 5%. Ho (p>0,05): não há relação entre os tratamentos; H1 (p<0,05): há relação entre os tratamentos. Letras minúsculas na mesma coluna indicam diferenças significativas entre cada órgão com ou sem sinais respiratórios utilizando teste de qui-quadrado a 5%.

Observam-se, ainda na Tabela 1, que as amostras isoladas de criações sem quadro respiratório apresentaram (p<0,05) menores frequências de isolamento quando comparadas aos dados obtidos de criações com quadro respiratório.

Também na Tabela 1, estão dispostos os dados referentes à concordância entre achados patológicos à necropsia e frequência de isolamento de *E. coli*. É possível afirmar que houve relação entre estes dois parâmetros nos tratamentos relativos a enterite e também hepatite e no caso da aerossaculite somente em criações com quadro respiratório.

Diversos quadros anatomopatológicos, incluindo os do trato respiratório, estão relacionados às APECs (LYNNE et al., 2012). Neste trabalho, a presença de aerossaculite e traqueíte foi maior ($p<0,05$) em aves com sinais respiratórios: 49,4%(76/154) e 20,8%(32/154) respectivamente, bem como, o isolamento de *E. coli* com frequências de 22,7% (35/154) e 18,3% (29/154) para aerossaculite e traqueíte, respectivamente. Desta forma, destaca-se a atuação de *E. coli* no desenvolvimento de quadros respiratórios em frangos de corte.

No caso da aerossaculite, percebeu-se ainda neste trabalho, que há uma relação significativa entre a presença da bactéria e lesões encontradas em sacos aéreos somente em criação com quadro respiratório. Sugere-se assim, que a aerossaculite é uma lesão relacionada à infecção por *E. coli* e a ação desta bactéria em doenças respiratórias se respalda em estudo desenvolvido por ARABI et al. (2013) no qual amostras de *E. coli* foram isoladas de diferentes órgãos, incluindo sacos aéreos de aves com colibacilose.

Outros autores também abordaram a detecção de *E. coli* em órgãos respiratórios e obtiveram resultados semelhantes ao deste trabalho, como foi o caso de GONÇALVES et al. (2012), que avaliaram a presença de *E. coli* patogênica em sacos aéreos e traquéias de frangos de corte. Das 120 amostras estudadas, *E. coli* foi isolada em 17,8% (21/118) das amostras de sacos aéreos, 16,1% (19/118) das traquéias e 66,1% (78/118) dos sacos aéreos e traquéias. SAHOO et al. (2012) analisaram 182 amostras de aves com suspeita de colibacilose e obtiveram 31% de sacos aéreos positivos para *E. coli*, reforçando a importância dessa bactéria em doenças respiratórias na avicultura, fato também constatado neste trabalho.

Após invasão do sistema respiratório por *E. coli*, pode ocorrer a disseminação para o sistema circulatório. Esta afirmativa foi constatada neste estudo, uma vez que tanto para achados relativos ao coração, 14,9% (23/154), como para fígado, 36,4% (56/154), foram observadas maiores frequências de

isolamento de *E. coli* ($p<0,05$) quando analisados os dados de criações alternativas com quadro respiratório. Além disso, observou-se uma relação significativa entre a detecção de *E. coli* e lesões de fígado, o que permite sugerir que este agente determina lesões no fígado e estas lesões não estão envolvidas somente a casos de doenças respiratórias.

As maiores frequência obtidas neste trabalho para fígado e coração, encontram respaldo na circunstância de que na espécie avícola, isolados de *E. coli*, após entrarem na circulação sanguínea, determinam uma síndrome complexa, denominada colibacilose, caracterizada por lesões em múltiplos órgãos com quadros de septicemia, peri-hepatite e pericardite (LAMARCHE et al., 2005). Resultados semelhantes ao deste trabalho foram obtidos por SAHOO et al. (2012) ao analisarem 182 aves com suspeita de colibacilose. Do total de isolados, foram obtidos isolamentos médios de 34% para fígado. Em estudo desenvolvido por ARABI et al. (2013), em amostras de 105 frangos de corte, no Irã, durante os anos de 2009 e 2010, *E. coli* também foi isolada do coração e fígado.

Nos resultados referentes ao intestino, nota-se que aves com quadro respiratório apresentaram ($p<0,05$) maiores frequências tanto para isolamento de *E. coli* quanto para presença de enterite. Os resultados referentes ao intestino demonstram que há relação entre a presença de enterite e o isolamento de *E. coli*, pois houve relação de concordância significativa entre estes dados. Porém mesmo com estes resultados, o isolamento de *E. coli* em lesões não confirma a sua ação nos casos de enterite, sendo necessários estudos experimentais de patogênese de *E. coli* em aves para esta confirmação. Isto porque esta bactéria normalmente coloniza o trato intestinal das aves logo após o nascimento, permanecendo como componente importante da microbiota normal do intestino por toda a vida do seu hospedeiro (KASNOWSKI, 2004; MOREIRA, 2007), com isso, provavelmente esta bactéria esteve presente no trato intestinal, porém o responsável pelas lesões foi outro agente.

Na Figura 1 estão disponíveis fotos de eletroforeses realizadas para pesquisa dos genes *papC*, *tsh*, *iuc* e *iss*.

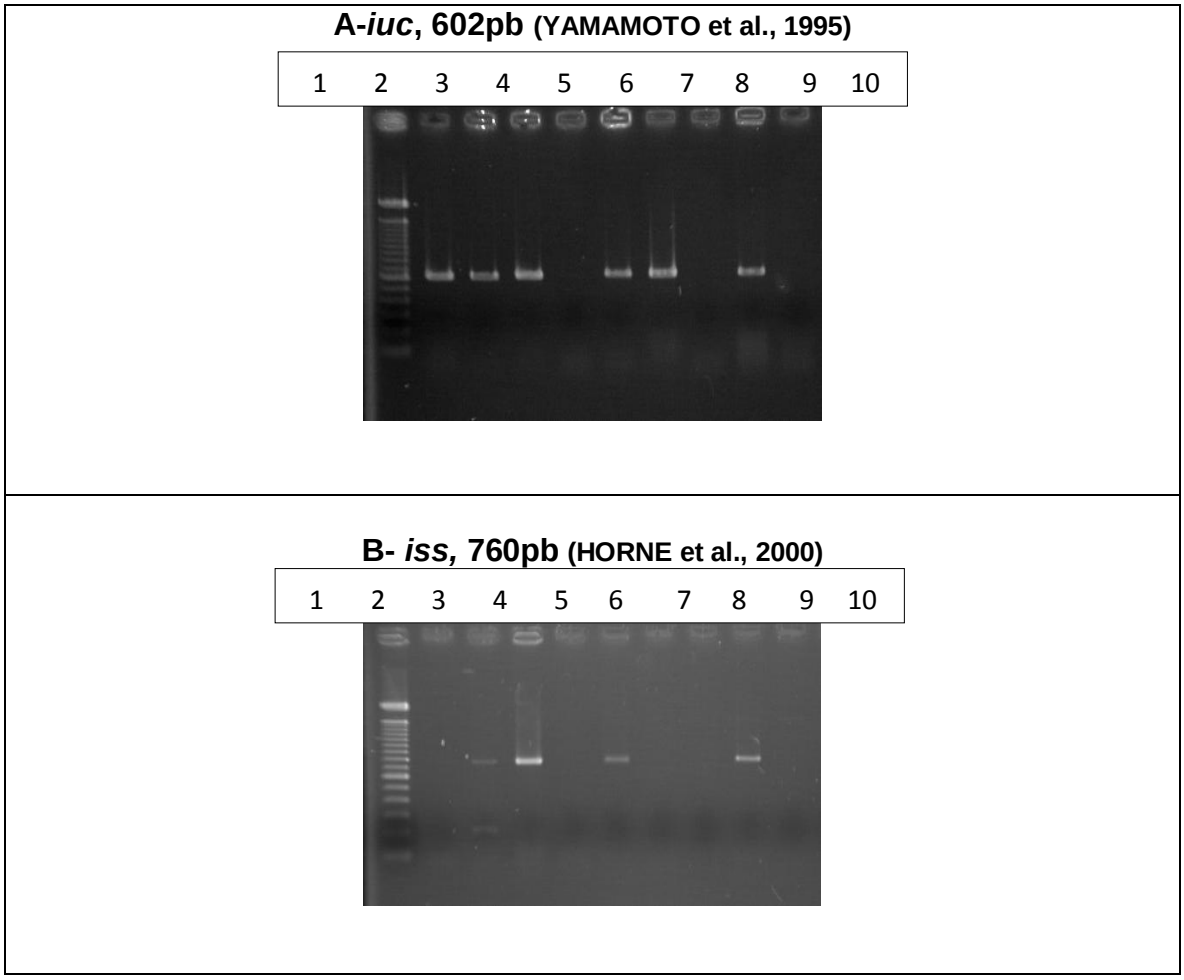


FIGURA 1: Eletroforese do PCR para detecção de genes de virulência de isolados de *E. coli* obtidos de órgãos com alteração macroscópica oriundos de abatedouros de frangos de corte localizados em diferentes regiões do Estado de Goiás. A- 1: marcador de peso molecular, 2 a 4, 6 e 7- amostras positivas, 5 e 8- amostras negativas, 9-10 controle positivo e negativo, respectivamente; B- 1: marcador de peso molecular, 3, 4 e 6- amostras positivas, 2, 5, 7 e 8- amostras negativas, 9-10 controle positivo e negativo, respectivamente.

Ao se analisar os dados deste trabalho presentes na Tabela 2, verificou-se que o gene *papC* esteve presente em 11,6% (8/69) e 22,27% (6/22) dos isolados de *E. coli* de frangos de corte com e sem quadro respiratório, respectivamente.

Ainda na abordagem dos dados relativos ao gene *papC* (Tabela 2), quando se compara os grupos com e sem quadro respiratório, observam-se diferenças ($p<0,05$) para os órgãos coração e traquéia, com maiores frequências do gene *papC* para o grupo sem quadro respiratório. Apesar de se verificar

ausência para os órgãos citados anteriormente, em outros órgãos coletados durante este trabalho, o gene *papC* foi detectado. Estes resultados podem ser justificados pelo fato que o gene *papC* é descrito como não essencial para a patogênese da APEC, mas quando presente desempenha um papel significativo nesse processo (KARIYAWASAM & NOLAN, 2011). Com isso, sugere-se que este gene não foi essencial para atuação de *E. coli* no coração e traquéia, porém pode ter auxiliado no processo infeccioso nos outros órgãos pesquisados neste trabalho.

TABELA 2—Frequência, por órgãos, dos genes *papC, tsh, iuc e iss*, de isolados de *E. coli* identificados em frangos de corte de criações alternativas sem e com sinais respiratórios, localizados em diferentes regiões do Estado de Goiás

	% (n+*/N)				
	papC	*tsh*	*iuc*	*iss*	p
Sinais	Fígado				
Sem	20 (1/5)	20 (1/5)	20 (1/5)	0,0 (0/5)	NS**
Com	26,7 (4/15)	46,7 (7/15)	33,3 (5/15)	46,7 (7/15)	NS
p	NS	NS	NS	NS	
	Coração				
Sem	28,6 (2/7)	28,6 (2/7)	42,9 (3/7)	14,3 (1/7)	NS
Com	0,0 (0/15) a	13,3 (2/15) a	53,3 (8/15) b	33,3 (5/15) b	0,004
p	0,03	NS	NS	NS	
	Sacos Aéreos				
Sem	50 (2/4)	25 (1/4)	50 (2/4)	0,0 (0/4)	NS
Com	26,6 (3/16) ab	0,0 (0/16) a	37,5 (6/16) b	50 (8/16) b	0,008
p	NS	NS	NS	NS	
	Intestino				
Sem	0,0 (0/3)	33,3 (1/3)	33,3 (1/3)	33,3 (1/3)	NS
Com	9,1 (1/11)	9,1 (1/11)	27,3 (3/11)	9,1 (1/11)	NS
p	NS	NS	NS	NS	
	Traquéia				
Sem	33,3 (1/3)	0,0 (0/3)	33,3 (1/3)	0,0 (0/3)	NS
Com	0,0 (0/12)	16,7 (2/12)	33,3 (4/12)	25 (3/12)	NS
p	0,04	NS	NS	NS	
TOTAL					
Sem	27,3 (6/22) ab	22,7 (5/22) ab	36,4 (8/22)b	9,1(2/22)Aa	0,03
Com	11,6 (8/69) a	17,4 (12/69) a	37,7 (26/69)b	34,8 (24/69)Bb	<0,01

*n(**+**): n positivo. ** NS- Diferença não significativa estatisticamente. Letras minúsculas/maiúsculas na mesma linha/coluna indicam diferenças significativas utilizando teste de qui-quadrado a 5%.

Outra justificativa para a baixa frequência e/ou ausência do gene *papC*, observada em alguns órgãos neste trabalho, pode ser a circunstância de que quando o gene *papC* está ausente, a função de adesão pode ser desempenhada pelo gene *tsh* principalmente (DELICATO et al., 2002).

Neste contexto, abordando a frequência total do gene *papC*, semelhantes resultados foram observados por JANBEN et al. (2001), VANDEMAELE et al. (2003), KNÖBL et al., (2008), KWON et al. (2008), e ROCHA et al. (2008), WON et al. (2009), que detectaram o gene *pap* em isolados de *E. coli* oriundos de aves comerciais em 30%, 29%, 37,5%, 11%, 24% e 15%, respectivamente. Maiores frequências ao deste estudo foram encontrados por ARABI et al. (2013), que analisaram amostras de frangos de corte e obtiveram o valor de 82,1% para *papC*. Porém, alguns autores não encontraram o gene em nenhuma das estirpes isoladas de aves com colibacilose, como é o caso de IKUNO et al. (2006), resultado que condiz com o obtido neste trabalho, para detecção do gene *papC* para coração e traquéia.

Ainda na Tabela 2, para o gene *tsh* foram observadas as seguintes frequências: 17,4% (12/69) e 22,7% (05/22) com ou sem quadro respiratório, respectivamente. Observa-se também que para os isolados de *E. coli* dos sacos aéreos, as menores frequências ($p<0,05$) de detecção foram para o gene *tsh*, com isso pode ser que o mesmo não tenha ação importante na colonização deste órgão. Apesar do gene *tsh* provavelmente não ter tido ação importante na colonização dos sacos aéreos obtidos de criações com quadro respiratório, é importante considerar que este gene foi detectado em órgãos coletados neste trabalho. Por isso, sugere-se a atuação do gene *tsh* em estágios iniciais da infecção e na colonização de órgãos (NEGLEKA et al., 2002).

Resultados obtidos por ZHAO et al. (2005) e WON et al. (2009), apontaram maiores frequências que deste estudo quanto a presença do gene *tsh*, com detecção de 84% e 53,9%, respectivamente. Também ROCHA et al. (2008) mostraram que de 61 linhagens APEC, 55% eram portadores do gene *tsh*. OH et al. (2012) pesquisaram a presença de nove genes associados à virulência de *E. coli* e obteve a frequência de 34,5% para o gene *tsh.* ARABI et al. (2013) obtiveram 96,4% de *tsh*+ ao pesquisarem cinco genes de virulência das APEC isoladas de frangos.

As menores frequências de detecção do gene *tsh* entre os estudos abordados e este trabalho, podem ser explicadas pelas variações nas combinações de genes presentes em isolados de *E. coli* de diferentes regiões. E no caso deste trabalho pode-se também sugerir que como a detecção do gene *papC* e do gene *tsh* está relacionada a aderência e colonização bacteriana, a presença de apenas um desses genes seria suficiente para desencadear ações. Este aspecto foi descrito por DELICATO et al., (2002), que afirmaram que quando o gene *papC* está ausente, a função de adesão pode ser desempenhada pelo gene *tsh*, por exemplo.

Outro importante fator de virulência relacionado a cepas APEC é a capacidade de crescimento em meios sem ferro, desempenhada pelo gene *iuc*. Este gene foi detectado neste trabalho (Tabela 2), com frequências de 37,7% (26/69) e 36,4% (8/22) nos isolados com ou sem quadro respiratório, respectivamente.

A maior frequência observada, neste trabalho, para o gene *iuc* e a detecção deste gene em órgãos sistêmicos, respiratórios e conteúdo intestinal, provavelmente ocorreram porque os isolados de *E. coli* utilizaram o mecanismo de sequestro *de* ferro através da produção de aerobactina, função atribuída a este gene, e que permitiu a sobrevivência da bactéria em meio extracelular (MONROY et al., 2005).

Resultados semelhantes ao deste estudo foram obtidos por WON et al. (2009) que mostraram que das 118 cepas de APEC, 47% continham o *iuc.* Por outro lado, maiores valores aos deste estudo foram obtidos na literatura. EWERS et al. (2004) detectaram esse gene em 78,0% e SOMEYA et al. (2007) em 100,0% de APEC analisadas. KWON et al. (2008) na Coréia do Sul, também estudaram este gene em 120 isolados APEC e 83% foram positivos para o gene *iuc*. Da mesma forma, ARABI et al. (2013), com o objetivo de determinar os padrões de genes de virulência de APEC em frangos observaram o valor de 85,7% para o gene *iuc*.

Na Tabela 2, observa-se que para os dados referentes ao coração, as maiores frequências de detecção ($p<0,05$) foram verificadas para os genes *iuc e iss*. Sugere-se que estes genes foram necessários para promover o acesso e invasão ao coração. Os genes *iuc e iss* obtiveram ainda as maiores frequências

de detecção no grupo com quadro respiratório, o que sugere a atuação destes genes em doenças respiratórias. O gene *iuc*, também foi detectado por IKUNO et al. (2006) em isolados provenientes de aves com quadro respiratório (26,6%) e em associados ao gene *iss* (20%).Esses resultados reforçam a afirmação que a associação da aerobactina codificada pelo gene *iuc* e a proteína de resistência ao soro, codificada pelo gene *iss*, estão fortemente relacionadas com *E*. *coli* patogênicas, tanto para aves como para outras espécies animais (NEGLEKA et al., 2002).

Além disso, ao comparar-se (Tabela 2) os grupos sem e com quadro respiratório foi observado para o gene *iss* maior ($p<0,05$) frequência para o grupo com quadro respiratório, com 34,8% (24/69) quando comparado ao sem quadro respiratório, com 9,1% (2/22). Estes dados sugerem que o gene *iss* esteja envolvido na codificação de fatores de virulência em isolados *E. coli*, com determinação de quadros respiratórios, provavelmente relacionados à resistência sérica atribuída a ação deste gene (MONROY et al., 2005). O gene *iss* apesar de não ser o único mecanismo utilizado para alcançar os órgãos das aves e causar infecção, propicia habilidade em resistir aos fatores séricos inibitórios e escapar da ação do sistema complemento bem como da fagocitose nos processos de infecção (MELLATA et al., 2003).

Um dos motivos de preocupação acerca deste gene reside no fato de sua localização em um plasmídio de virulência com outros genes de virulência e de resistência a antimicrobianos que pode ser transferido por conjugação, para outras bactérias avirulentas, inclusive *E. coli* (JOHNSON et al., 2006), e assim bactérias comensais podem se tornar resistentes e patogênicas (FOLEY et al., 2000). Esta argumentação foi confirmada em outros estudos, com maior frequência de detecção do gene *iss* em aves com manifestações de colibacilose e em isolados de aves doentes (MCPEAKE et al. 2005), fato constatado também neste trabalho.

Resultados variados foram obtidos por outros autores e alguns obtiveram frequências maiores as deste trabalho. KNOBL et al. (2008), detectaram o gene *iss* em isolados de *E. coli* na frequência de 37,5% (3/8) em amostras de colibacilose. ROCHA et al. (2008) mostraram que de 61 linhagens APEC, 73% eram portadores do gene *iss*. OH et al. (2012) pesquisaram a

presença de nove genes associados à virulência de *E. coli* e obtiveram a frequência de 58,62% para o gene *iss*. Em estudo desenvolvido por ARABI et al. (2013), em amostras de *E. coli* isoladas de frangos foi obtido o percentual de 96,4% para o gene *iss*.

Na Tabela 3 estão dispostos dados referentes à frequência de detecção simultânea para os genes em estudo em criações alternativas.

TABELA 3- Frequência da detecção simultânea dos genes *papC, tsh, iuc e iss*, pesquisados em *E. coli* isoladas de 64 propriedades de frangos de corte de criações alternativas sem e com quadros respiratórios localizadas em diferentes regiões do Estado de Goiás

	Total de genes						
Genes	N	n(+)	%	N	n(+)	%	
	Sem sinais			**Com sinais**			p
Nenhum gene	22	12	54,5 A	69	27	39,1 D	NS
1 gene	22	3	13,6 B	69	19	27,5 DC	NS
2 genes							
papC – tsh	22	1	4,5 a	69	1	1,4a	NS
papC-iuc	22	2	9,1 a	69	0	0,0 a	NS
papC-iss	22	0	0 a	69	3	4,4a	NS
tsh-iuc	22	1	4,5 a	69	1	1,4a	NS
tsh-iss	22	0	0 a	69	1	1,4a	NS
iuc-iss	22	0	0 a	69	10	14,5 b	NS
Total	-	4	18,2 B	-	16	23,2C	NS
3 genes							
papC-tsh-iuc	22	1	4,5 a	69	1	1,4a	NS
Pap-tsh-iss	22	0	0 a	69	1	1,4a	NS
Pap-iuc-iss	22	0	0 a	69	1	1,4a	NS
tsh-iuc-iss	22	1	4,5 a	69	3	4,4 a	NS
Total	-	2	9,1 Ba	-	6	8,7 B	NS
4 genes	22	1	4,5 Ba	69	1	1,4 Aa	NS

Letras minúsculas/maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas utilizando teste de qui-quadrado a 5%.

Para o grupo de aves sem quadro respiratório, ocorreu maior frequência naqueles isolados sem detecção de nenhum gene pesquisado. Sugere-se que para determinar quadros respiratórios são necessárias associações entre genes.

Nota-se (Tabela 3) ainda para o grupo com quadros respiratórios, obteve-se maior frequência de detecção simultânea entre o gene *iuc* e *iss*

($p<0,05$) em relação aos demais, o que sugere atuação destes genes em quadros respiratórios. Existem muitos fatores associados a virulência de *E. coli* patogênica aviária descritos, porém ainda não foi possível definir as características do patógeno causador da colibacilose aviária (TEJKOWSKI, 2012).

É possível que existam muitos perfis relacionados à infecção aviária (RODRIGUES-SIEK et al., 2005), já que essas podem se apresentar como infecções localizadas ou sistêmicas. Porém relata-se que para que uma cepa seja patogênica seria necessário a presença de pelo menos um fator de adesão, outro de aquisição de ferro e outro de resistência sérica (BRITO et al., 2003; EWERS et al., 2007; TEJKOWSKI, 2012), fato observado em 10,1%(7/69) dos isolados de *E. coli* deste trabalho. Com base na classificação abordada por estes autores e considerando-se que as maiores frequências observados foram para a detecção simultânea entre o gene *iuc* e *iss,* com 14,5% (10/69), sugere que outro gene ligado a aderência que não os deste trabalho pode ter exercido esta função nos isolados de *E. coli* onde não foram detectados os genes *papC* e *tsh*.

Também SKYBERG et al., (2003), desenvolveram um protocolo para detecção de genes de virulência em isolados de *E. coli* de aves com colibacilose e de aves aparentemente saudáveis. Dos isolados de aves saudáveis, 90% (9/10) mostraram apenas um dos genes descritos e 80% (8/10) de isolados de aves doentes tinham três ou mais dos genes estudados. Estes autores sugeriram que apesar da detecção individual de genes de *E. coli* é necessário que haja uma combinação de genes com diferentes funções para desencadear a infecção.

CONCLUSÕES

Conclui-se que *E. coli* está presente em alta frequência nas lesões de aerossaculite, traqueíte, pericardite e enterite e que os genes *papC*, *tsh, iuc* e *iss* estiveram presentes em alguns isolados de *E. coli*.

REFERÊNCIAS

1. ANDREATTI FILHO, R. L. Colibacilose aviária. IN: ANDREATTI FILHO, R. L. **Saúde aviária e doenças**. São Paulo: Roca. p.112-117, 2006.

2. ARABI, S.; JAFARPOUR, M.; MIRINARGESI, M.; ASL, S. B.; NAGHSHBANDI, R.; 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.

3. BRITO, B. G.; GAZIRI, L. C. J.; VIDOTTO, M. C. Virulence factors and clonal relationships among E. coli strains isolated from broiler chickens with cellulitis. **Infection and Immunity**, v.71, n. 7, p. 4175-4177, 2003.

4. DELICATO, E. R.; BRITO, B. G.; KONOPATZKI, A. P.; GAZIRI, L. C.; VIDOTTO, M. C. Occurrence of the temperature sensitive hemagglutinin among avian *Escherichia coli*. **Avian Diseases***,* v.46, p.713-776, 2002.

5. EWERS, C.; JANBEN, T.; KIESSLING, S; PHILIP, H. C.; WIELER, L. H. Molecular epidemiology of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from colisepticemia in poultry. **Veterinary Microbiology**, v. 104, n. 1-2, p. 91-101, 2004.

6. EWERS, C.; LI, G.; WILKING, H.; KIESSLING, S.; ANTAO, E. M. Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: how closely related are they? **International Journal of Medical Microbiology.** v. 297, p.163–76, 2007.

7. FIGUEIREDO, E. A P., PAIVA, D. P., ROSA, P. S., ÁVILA, V. S., TALAMIN, D. J. D. Diferentes denominações e classificações brasileiras de produção alternativa de frangos. In: CONFERÊNCIA APINCO 2001 DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS AVÍCOLAS, SIMPÓSIO SOBRE PRODUÇÃO ALTERNATIVA. Campinas. **Anais**...Campinas, v.2, p.209 -222, 2001.

8. FOLEY, S. L.; HORNE, S. M.; GIDDINGS, C. W.; ROBINSON, M.; NOLAN, L. K. Iss from a virulent *Escherichia coli*. **Avian Diseases**, v. 44, p. 185-191, 2000.

9. GONÇALVES, P. M. R.; PEREIRA, V. L. DE A.; SILVA, R. DE C. FIGUEIRA ; OLIVEIRA, L. A. T. DE; NASCIMENTO, E. R. Perfil de resistência antimicrobiana de isolados de E*scherichia coli* positiva para gene *iss* em frangos de corte na idade de abate. **Enciclopédia Biosfera**, v.8, n.15; p. 2012.

10. HORNE, S.M.; PFAFF-MACDONOUGH, S.J.; GIDDINGS, C.W.; NOLAN, L.K. Cloning and sequencing of the *iss* gene from a virulent avian *Escherichia coli.* **Avian Diseases**, v.44, p.179-184, 2000.

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

12. 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.

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

14. KARIYAWASAM, S.; JOHNSON, T. J.; DEBROY, C.; NOLAN, L. K. Occurrence of pathogenicity island lAPEC-O1 genes among *Escherichia coli* implicated in avian colibacillosis. **Avian diseases,** v.50, p.405-410, 2006.

15. KARIYAWASAM, S.; NOLAN, L. K. *PapC*A gene of avian pathogenic *Escherichia coli*. **Avian diseases**, Kennet Square, v.55, n.1, p.532-538, 2011.

16. KNÖBL, T.; GODOY, S. N.; MATUSHIMA, E. R.; GUIMARÃES, M. B.; FERREIRA, A. J. P. Caracterização molecular dos fatores de virulência de estirpes de *Escherichia coli* isoladas de papagaios com colibacilose aviária. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v. 45, p. 54-60, 2008.

17. KWON, S. G., CHA, S. Y.; CHOI, E. J.; KIM, B.; SONG, H. J; JANG, H. K. Epidemiological prevalence of avian pathogenic *Escherichia coli* differentiated by multiplex PCR from commercial chickens and hatchery in Korea. **Journal of Bacteriology and Virology,** v. 38, p.179-188, 2008.

18. LAMARCHE, M.G.; DOZOIS, C.M.; DAIGLE, F.; CAZA, M.; CURTIS III, R.; DUBREUIL, J.D.; HAREL, J**.** Inactivation of the Pst system reduces the virulence of an avian pathogenic *Escherichia coli* O78 strain. **Infection and Immunity,** v.73, n.7, p.4138-4145, 2005.

19. LYNNE, A. M.; KARIYAWASAM, S.; WANNEMUEHLER, Y.; JOHNSON, T. J.; JOHNSON, S. J.; SINHA, A. S.; LYNNE, D. K.; MOON, H. W.; JORDAN, D. M.; LOGUE, G. M.; FOLEY, S. L.; NOLAN, L. K. Recombinant *Iss* as a Potential Vaccine for Avian Colibacillosis. **Avian Diseases,** Kennet Square, v.56, n.1, p.192-199, 2012.

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

21. McPEAKE, S. J. W.; SMYTH, J. A.; BALL, H. J. Characterisation of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) associated with colisepticaemia compared to faecal isolates from healthy birds. **Veterinary Microbiology,** v. 110, p. 245-253, 2005.

22. MELLATA, M.; DHO-MOULIN, M.; DOZOIS, C.M.; CURTISS III, R.; BROWN, P.K.; ARNÉ, P.; BRÉE, A .; DESAUTELS, C.; FAIRBROTHER, J.M. Role of virulence factors resistance of avian pathogenic *Escherichia coli* to serum and in pathogenicity. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 1, p. 536-540, 2003.

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

24. MOREIRA, H. O. M. Isolamento de *E. coli* ácido-resistentes em fezes de bovines submetidos à dieta de volumoso e concentrado. **Dissertação.** Universidade de Brasília. 60p., 2007.

25. NASCIMENTO, D. C. N.; SAKOMURA, N. K.; SIQUEIRA, J. C.; DOURADO, L. R. B. FERNANDES, J. B. K.; MALHEIROS, E. B. Exigências de lisina digestível para aves de corte da linhagem ISA Label criadas em semiconfinamento. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia,** v.61, n.5, p.1128-1138, 2009.

26. NEGLEKA M., BRERETON L., BROWN G.; FAIRBROTHER J.M. pathotypes of *Escherichia coli* as relted to tsh-, pap- , pil-, and iuc-DNA sequences, and antibiotic sensitivity of isolates from internal tissues and the cloacae of broilers. **Avian Diseases,** v.46, n.1, p.143-152, 2002.

27. OH, J. Y.; KANG, M. S.; YOON, H.; CHO, H. W.; AN, B. K.; SHIN, E. G.; KIM, Y. J.; KIM, M. J.; KWON, J. H.; KWON, Y. K. The embryo lethality of *Escherichia coli* isolates and its relationship to the presence of virulence-associated genes**. Poultry Science**, v.91, p.370–375, 2012.

28. OLIVEIRA, S.J. **Guia bacteriológico prático**. Ulbra: Canoas, 2012. 260p.

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

30. REESE, S.; DALAMANI, G.; KASPERS, B. The avian lung-associated immune system: a review. **Veterinary Research**. V.37, p.311–324, 2006.

31. 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 case of poultry. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, p.183-186, 2008.

32. ROCHA, A. C. G. P. Genes associados à patogenicidade de *Escherichia coli* patogênica para aves (APEC) isoladas de frangos de corte com sintomatologia clínica respiratória**. Pesquisa Veterinária Brasileira.** v. 28, n.3, p.183-186, 2008.

33. RODRIGUEZ-SIEK, K. E. GIDDINGS, C. W. DOETKOT, 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, 2005.

34. SAHOO,T. K.; SAHOO, L.; SARANGI, L. N.; PANDA, S. K.; PANDA, H. K. Prevalence, Isolation, Characterisation and Antibiogram Study of Pathogenic *Escherichia coli* from Different Poultry Farms of Odisha. **Journal of Advanced Veterinary Research,** v. 2, p. 169-172, 2012.

35. SILVA, I. M. M.; EVÊNCIO-NETO, J.; SILVA, R .M.; LUCENA-SILVA, N.; MAGALHÃES, J.; BALIZA M. Caracterização genotípica dos isolados de *Escherichia coli* provenientes de frangos de corte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.63, n.2, p.333-339, 2011.

36. 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.

37. SOMEYA, A.; OTSUKI, K., MURASE, T. Characterization of *Escherichia coli* strains obtained from layer chickens affected with colibacillosis in a commercial egg-producing farm. **Journal of Veterinary Medical Science,** v. 69, n. 10, p.1009-1014, 2007.

38. TEJKOWSKI, T. M. Prevalência de fatores associados a virulência em amostras de *Escherichia coli* patogênica aviária (APEC) isoladas de lesões de celulite aviária. **Monografia**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária. 35p.2012.

39. VANDEMAELE, F. J.; MUGASA, J. P.; VANDEKERCHOVE, D.; GODDEERIS, B. M. Corrigendum to Predominance of the papGII allele with high sequence homology to that of human isolates among avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). **Veterinary Microbiology.** V. 97, n. 3-4, p. 245-257, 2003.

40. WON, G.Y., B.M.MOON, I.G. OH, K. MATSUDA, A.A. CHAUDHARI, J. HUR, S.K. EO, I. YU, Y.J. LEE, J.H. PARK, S.K. Y.S.LEE, B.S. KIM AND J.H. LEE. Profiles of virulence-associated genes of avian pathogenic *Escherichia coli* isolates from chicken colibacillosis. **Journal of Poultry Science**, v. 46, p.260-266, 2009.

41. YAMAMOTO, S.; TERAI, A.; YURI, K.; KURAZONO, H.; TAKEDA, Y.; YOSHIDA, O. Detection of urovirulence factors in *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. **FEMS Immunology and Medical Microbiology,** v.12, p. 85-90, 1995.

42. 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.

CAPÍTULO 4- GENE *iss* E SUA RELAÇÃO COM RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS EM ISOLADOS DE E*scherichia coli* OBTIDOS DE FRANGOS DE CORTE DE CRIAÇÕES INDUSTRIAL E ALTERNATIVA

RESUMO: O objetivo do presente estudo foi detectar o gene *iss* em isolados de *E. coli* oriundos de amostras de aves criadas em dois sistemas de produção, industrial e alternativo, e correlacionar com a suscetibilidade aos antimicrobianos. O gene *iss* foi pesquisado em 235 isolados de *E. coli,* sendo 144 obtidos de frangos de corte de criação industrial e 91 de criações alternativas. Os que apresentaram o gene *iss* foram submetidos ao teste de sensibilidade aos antimicrobianos. O gene *iss* foi detectado em 29,2% (42/144) e 28,6% (26/91) para amostras de frangos de corte e criações alternativas, respectivamente. Não ocorreram diferenças significativas entre as detecções do gene *iss* nos sistema de criação. Em relação à determinação do perfil de suscetibilidade e a presença do *iss*, para amostras de frangos de corte, os maiores valores de resistência a antimicrobianos foram para doxiciclina, oxitetraciclina e enrofloxacina quando o *iss* esteve presente. Em isolados de criações alternativas, quando o *iss* esteve presente se obteve maior percentual de resistência para ampicilina e ciprofloxacina. Abordando somente os resultados para perfil de resistência nota-se que foram identificados altos índices de resistência aos antimicrobianos, com maior resistência para amoxicilina/ ácido clavulânico, tetraciclina e sulfametoxazol em isolados de frangos de corte e também em criações alternativas. Sugere-se que o gene *iss* presente em isolados de *E. coli* tem contribuído com a alta resistência aos antimicrobianos em criações de frango de corte industrial e alternativas.

Palavras-chave: criações alternativas, aves, genes de virulência, resistência

CHAPTER 4- *iss* GENE AND ITS RELATION WITH ANTIMICROBIAL RESISTANCE IN ISOLATES OF *Escherichia coli* OBTAINED FROM INDUSTRIAL AND ALTERNATIVE BROILER BREEDING

ABSTRACT: The aim of this study was to detect the *iss* gene in isolates of *E. coli* samples originated from poultry raised on two production systems, conventional and alternative, and to correlate it with antimicrobial resistance. The gene was investigated in 235 isolates of *E. coli*, 144 obtained from broilers from industrial breeding and 91 from alternative breeding. Those who had the gene were tested for antimicrobial susceptibility. The gene was detected in 29.2% (42/144) and 28.6% (26/91) for samples of broilers and alternative breeding, respectively. No significant differences between the probes *iss* gene in the breeding systems was observed. Regarding the determination of the resistance profile and the presence of *iss*, for broiler samples, the highest values of resistance to antimicrobial agents were for doxycycline, oxytetracycline, enrofloxacin and colistin when *iss* was present. In isolates from alternative breeding higher percentage of resistance was obtained for ampicillin and ciprofloxacin, when iss was present. Considering only

the results for resistance profile we identified high rates of antimicrobial resistance, with higher resistance to amoxicillin/clavulanic, tetracycline and sulfametoxazol in isolates from broiler and from alternative breeding chicken. It can be concluded that the *iss* gene present in isolates of *E. coli* is related to the high frequency of resistance to some antimicrobials in industrial farms and in alternative breeding sysptems.

Keywords: alternative bredding, poultry, resistence, virulence genes

INTRODUÇÃO

A maioria dos casos de problemas respiratórios diagnosticados em aves não envolvem apenas um agente infeccioso. Diversos patógenos podem estar implicados com as enfermidades respiratórias em frangos, porém *E. coli* participa com frequência de tais enfermidades, com aumento significativa das taxas de mortalidade, letalidade e condenação de órgãos e/ou carcaças.

E. coli pertence à família das *Enterobateriaceae* e é considerada um dos integrantes da microbiota intestinal de animais e humanos (PIATTI & BALDASSI, 2007). Geralmente é eliminada nas excretas das aves, e a colonização do trato intestinal ocorre logo após o nascimento, permanecendo como componente importante da microbiota normal do intestino por toda a vida do seu hospedeiro (MOREIRA, 2007). Porém, além das cepas comensais, existem cepas de *E. coli* patogênicas para aves (APEC) que são responsáveis por vários processos patológicos extra-intestinais e que podem atuar como agente primário ou secundário (PIATTI & BALDASSI, 2007).

Apesar da importância conferida à enfermidade, são necessários estudos para elucidar os mecanismos de virulência das cepas APEC. Fatores de virulência têm sido associados à patogenicidade de *E. coli* em aves, mas nenhum gene específico da virulência foi identificado como sendo inteiramente responsável pela sua patogenicidade (ANTÃO et al., 2008). O que se sabe é que cepas APEC causadoras de lesões apresentam pelo menos um fator relacionado à adesão, um à aquisição de ferro e um à resistência sérica (TEJKOWSKI, 2012).

A resistência sérica é um fator importante, pois a ação de genes que a promovem está diretamente relacionada a mecanismos de resistência aos antimicrobianos utilizados na terapêutica de doenças. Aliado a isso, uma

preocupação atual se deve ao crescente aparecimento de cepas resistente a estes compostos. Sabe-se que os antimicrobianos utilizados têm alta ação destrutiva nas células bacterianas, mas mesmo com este potencial, isolados de *E. coli* estão se tornando resistentes a eles (CARDOSO et al., 2002). Além disso, esta resistência pode ser transferida para outros membros da família *Enterobacteriaceae,* dificultando o tratamento de enfermidades causadas por estas bactérias, incluindo o homem e animais (SHERLEY et al., 2004).

Potenciais genes de virulência, múltiplas resistências a antimicrobianos e a associação entre suscetibilidade a antimicrobianos e genes de virulência têm sido comumente encontrado em linhagens APEC, sugerindo que antimicrobianos devem ser usados com prudência com a finalidade de reduzir o surgimento e a disseminação de cepas resistentes portadoras de genes de virulência (WANG et al., 2010). Estudos como os de GONÇALVES et al. (2012) e LIMA-FILHO et al. (2013) têm relatado a ação do gene *iss* na conferência de resistência a antimicrobianos.

O gene *iss* está associado a altos níveis de virulência e se localiza em um plasmídio conjugativo R, denominado de ColV, com um tamanho aproximado de 100 kilobases, juntamente com outros genes de virulência e de resistência a antimicrobianos (TIVENDALE et al., 2004). Este plasmídio pode ser transferido, por conjugação, para outras bactérias avirulentas, inclusive *E. coli* (JOHNSON et al., 2006) e assim conferir resistência a diversos antimicrobianos e aos efeitos líticos do soro (EWERS et al. 2007; ABREU et al., 2010).

Diante do exposto, o presente trabalho tem como objetivo relacionar a presença do gene *iss* com a suscetibilidade a antimicrobianos em isolados de *E. coli* oriundos de amostras de frangos de corte de criações industriais e alternativas.

MATERIAL E MÉTODOS

Local

Os experimentos foram conduzidos no Estado de Goiás com coletas em abatedouros de frangos de corte sob inspeção e no Núcleo Experimental de aves com coletas de amostras de frangos de corte de criações alternativas. As análises bacteriológicas foram realizadas no Laboratório de Bacteriologia e as de detecção dos genes de virulência no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Medicina Veterinária da Escola de Veterinária e Zootecnia (EVZ) da Universidade Federal de Goiás (UFG). Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA-PRPPG-UFG com Protocolo número 018/11.

Amostragem

Após a coleta asséptica, no abatedouro e no núcleo experimental de aves, as amostras foram transportadas sob refrigeração em caixas de isopor com gelo ao Laboratório de Bacteriologia para realizar o isolamento e identificação de *E. coli*, segundo proposto por OLIVEIRA (2012).

As amostras oriundas de frangos de corte industrial foram coletadas em abatedouros. De um total de 1.016 amostras, 611 foram confirmadas como *E. coli.* Os isolados foram originados de 18 municípios de acordo com o local onde as aves eram criadas e cada município constituiu um grupo. A partir dos 18 grupos realizou-se sorteio de um isolado de *E. coli* em cada órgão e obtiveram-se 144 isolados (18 municípios multiplicado por 8 tipos de órgão), nos quais o gene *iss* foi pesquisado.

No caso das amostras de criações alternativas, do total de 1245 amostras, 178 amostras foram confirmadas como *E. coli*. Estas amostras foram agrupadas de acordo com o município de criação das aves e então submetidas a um sorteio aleatório. Portanto, selecionaram-se 91 isolados (69 com sinais respirtórios e 22 sem sinais respiratórios), que foram destinados aos testes de PCR com a finalidade de pesquisa do gene *iss*.

Ressalta-se que para os dois sistemas de criação obteve-se um isolado de cada órgão positivo/município, quando este estava presente.

Perfil de resistência a antimicrobianos

As amostras confirmadas como *E. coli* foram repicadas para ágar nutriente e armazenadas na temperatura entre 4 a 8ºC e posteriormente era realizado o teste de sensibilidade aos antimicrobianos. Os antibiogramas foram realizados somente após a confirmação da presença ou ausência do gene *iss* por PCR. Com isso, o número de antibiogramas foi determinado levando-se em consideração o número de isolados positivos para o gene *iss*. Desta forma, para frangos de corte industrial foram realizados testes de antibiograma de 84 isolados, 42 sem e 42 com gene *iss*, e para criações alternativas foram realizados testes de antibiogramas de 52 isolados, 26 sem e 26 com gene *iss*.

Para determinação de suscetibilidade a antimicrobianos foi utilizado o método descrito na NCCLS (2011). Foram testados os seguintes antimicrobianos: amoxicilina/ácido clavulânico (AMC 3 µg), ampicilina/subactam (SAM 20 µg), ceftiofur (EFT 30 µg), ciprofloxacina (CIP 10 µg), doxiciclina (DO 30 µg), enrofloxacina (ENR 5µg), gentamicina (CN 10 µg) , oxitetraciclina (OT 30 µg), sulfametoxazol (RL 25 µg), sulfametoxazol-Trimetroprim (SXT 25 µg), sulfonamidas (S 300 µg) e tetraciclina (TE 30 µg).

Extração de DNA dos isolados de *E. coli*

Para detecção do gene *iss* foi utilizada a técnica de extração térmica descrita por SILVA et al. (2011). Assim, 1,0 mL da suspensão da cultura bacteriana em caldo BHI a 37ºC/24h foi coletado e centrifugado a 13.200 rpm/ 5min. O sobrenadante foi descartado e 800µL de água miliQ foram adicionados. Após homogeneização, os isolados foram submetidos a uma nova centrifugação nas mesmas condições mencionadas anteriormente. O sobrenadante foi descartado e 80µL de água miliQ foi adicionado. Após essa etapa, as amostras foram aquecidas à temperatura de 96º/10 min e o sobrenadante removido e congelado em tubos de polipropileno a -20ºC até o momento da análise.

Técnica de PCR para detecção dos genes de virulência

Para realização da PCR convencional foi estabelecido o volume de 50µL para o *mix* de reação, composto por 35,75 µL de água ultra pura (*DNase/RNase-Free Distilled Water – Invitrogen*), 5 µL de Tampão para PCR 10X (*Invitrogen,* concentração final de 1X), 2,0 µL de Cloreto de Magnésio 50 mM (*Invitrogen,* concentração final de 2 mM); 1µL de dNTP [dCTP, dATP, dGTP, dTTP] a 10 mM (*Amersham Biosciences*, concentração final de 0,2 mM); 0,5 µl a 10 µM (concentração final de 0,1 µM) do iniciador sense, 0,5 µL a 10 µM (concentração final de 0,1 µM) do iniciador anti-sense, 0,25 µl de Taq 5 U/µL (*Invitrogen,* concentração final de 1,25U) e 5 µL do produto de extração de DNA dos isolados.

Para as reações de PCR foram empregados pares de oligonucleotídeos para "*iss*", segundo HORNE et al.(2000). As sequências dos iniciadores estão descritas no Quadro 1.

QUADRO 1 - Iniciadores utilizados para a amplificação de genes de virulência de *E. coli*, pela PCR

Gene alvo	**Sequência dos oligonucleotídeos (5´- 3´)**	**Tamanho do fragmento amplificado**	**Ta**
iss	GTG GCG AAA ACT AGT AAA ACA GC CGC CTC GGG GTG GAT AA	760pb	49ºC

Ta: temperatura de anelamento do par de iniciadores

O processo de amplificação foi realizado em termociclador (*Mastercycler Personal*, *Eppendorf*) programado para um ciclo inicial de 94^{o}C/2 min, seguido de 35 ciclos repetidos de 94^{o}C/30s, temperatura de anelamento (Ta) por 30 segundos e 72^{o}C/ 1 min. Após o último ciclo a reação foi terminada com uma etapa de extensão a 72^{o} C/2 min.

Para o controle negativo o volume referente à amostra foi substituído por água ultrapura (*DNase/RNase-Free Distilled Water – Invitrogen*). Os controles positivos utilizados neste trabalho pertencem à coleção de culturas do Laboratório

de Ornitopatologia da FMVZ-USP (Quadro 2) e foram gentilmente cedidos pelo professor Antônio José Piantino Ferreira e pela professora Terezinha Knobl da Escola de Veterinária da Universidade de São Paulo (USP).

QUADRO 2 – Controles positivos utilizados na PCR para pesquisa de genes de virulência de *E. coli*

Numeração	Identificação do controle positivo
EC T27	Sorogrupo O78, positiva para os genes *papC, tsh, iss e iuc*
EC T33	Sorogrupo O8, positiva para os genes *papC, iuc e iss*
EC T14	Sorogrupo O2, positiva para os genes *tsh*, *iuc* e *iss*
EC T36	Sorogrupo O143, positiva para os genes *tsh*, *iuc* e *iss*

Os produtos de amplificação (10 µL) foram submetidos à eletroforese a 90 volts, durante 60 min, em gel de agarose 1,2% (Agarose NA – Amersham Biosciences) e tampão TBE 1x. Como marcador de massa molecular foi empregado o DNA Ladder 100 pb (Invitrogen). Após esta etapa, os géis foram corados por imersão em solução de brometo de etídio (0,6 µg/mL) por 10 min. A visualização foi feita em aparelho transiluminador de UV (Electronic UV Transilluminator, Ultra-Lum), em ambiente escuro e a documentação fotográfica dos resultados das eletroforeses foi efetivada em equipamento fotodocumentador de géis (Vilber Lourmat).

Análise Estatística

As respostas qualitativas foram analisadas pelo teste não paramétrico de qui-quadrado (X^2) a 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 e a Figura 1 são referentes ao gene *iss*. A frequência do gene *iss* não diferiu estatisticamente entre os isolados de frangos de corte e criações alternativas (Tabela 1).

TABELA 1- Frequência do gene *iss* em amostras de *E. coli* isoladas a partir de órgãos oriundos de frangos de corte industrial e de criações alternativas de diferentes regiões do Estado de Goiás

Gene	Industrial			Alternativa		
	N	n(positivo)	%	N	n(positivo)	%
iss	144	42	29,2	91	26	28,6

Sem diferença significativa utilizando teste de qui-quadrado a 5%.

Foram verificadas as frequências de 29,2% (42/144) e 28,6% (26/91) para frangos de corte industriais e de criações alternativas, respectivamente. Dados semelhantes foram observados em estudo desenvolvido por KNOBL et al., (2008), onde o gene *iss* foi detectado em amostras de *E. coli* na frequência de 37,5% (3/8) em aves com colibacilose. No entanto, maiores frequências foram verificados por outros autores, como é o caso de ROCHA et al. (2008) que mostraram em isolados de APEC que 73% eram portadores do gene *iss,* OH et al. (2012), 58,62% e ARABI et al. (2013), 96,4%.

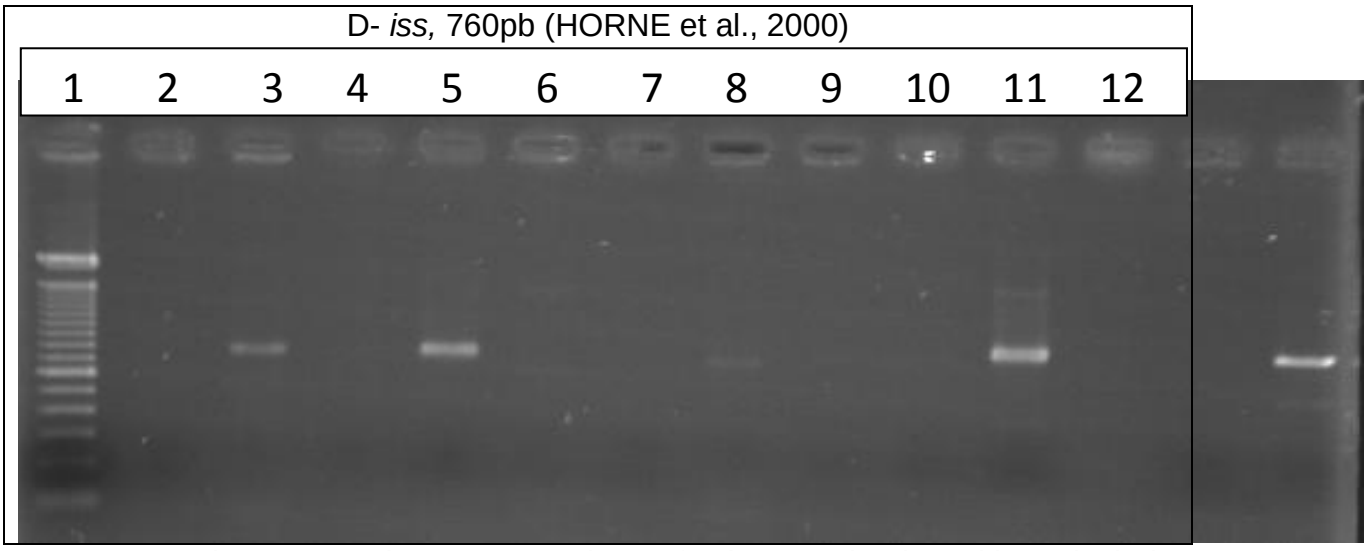


FIGURA 1- Eletroforese do PCR para detecção do gene *iss* (760pb) em isolados de *E. coli* obtidos de órgãos com alteração macroscópica oriundos de frangos de corte localizados em diferentes regiões do Estado de Goiás. 1: marcador de peso molecular, 3, 5 e 8- amostras positivas, 2, 4, 6, 7, 9 e 10 - amostras negativas, 11 e 12 controle positivo e negativo, respectivamente.

A Tabela 2 mostra os dados referentes à resistência de antimicrobianos em isolados de *E. coli* de frangos de corte de criações industriais e alternativas. Observam-se diferenças (p<0,05) entre os tipos de criações para os antimicrobianos ampicilina, sulfametoxazol-trimetroprim e gentamicina.

TABELA 2 - Perfil de resistência a antimicrobianos de isolados de *E. coli* oriundos de amostras de frangos de corte de criações industriais e alternativas de diferentes regiões do Estado de Goiás

	Industriais (n=84)		Alternativas (n=52)		
	n(+)	%	n(+)	%	p
AMC**	70	83,3	52	100,0	NS
SAM	36	42,8	37	71,2	<0,01
EFT	38	45,2	32	61,5	NS
CIP	37	44,1	29	55,8	NS
ENR	52	61,9	30	57,7	NS
DO	63	75,0	38	73,1	NS
OT	61	72,6	36	69,3	NS
TE	69	82,1	42	80,8	NS
CN	52	61,9	9	17,3	<0,01
RL	79	94,0	50	96,1	NS
SXT	32	38,1	37	71,2	<0,01
S	63	75,0	40	76,9	NS

*n(+): n(positivo);**AMC-amoxicilina/ácido clavulânico; SAM- ampicilina/subactam; EFT-ceftiofur; CIP- ciprofloxacina; DO-doxiciclina; CN-gentamicina; OT -oxitetraciclina; RL- sulfametoxazol; ENR-enrofloxacina; TE-tetraciclina; SXT-Sulfametoxazol-Trimetroprim; S- sulfonamida. NS-Diferença estatística não significativa

Para os antimicrobianos ampicilina e sulfametoxazol-trimetroprim as maiores frequências foram verificadas para as criações alternativas de frangos de corte. Sugere-se que estes resultados se devem a circunstância de que os frangos de corte de criações alternativas provinham de lotes com quadro respiratório ou alguma enfermidade. Este fato encontra respaldo no fato que os próprios proprietários relatavam no momento da coleta de dados que haviam utilizado tratamento prévio com antimicrobianos adquiridos no comércio agropecuário, muitas vezes até em lotes anteriores, sem obter o efeito esperado, pressupondo-se assim, o uso constante destes compostos nos lotes, com consequente conferência de resistência aos mesmos.

Por sua vez, as frequências obtidas para gentamicina em frangos de corte de criações alternativas foram bem menores que as encontrados para frangos de corte industriais (Tabela 2). Este dado pode ser justificado pela possível utilização deste antibiótico em pintos de um dia em criações industriais de frangos de corte, fato que normalmente não ocorre em criações alternativas pelo elevado custo deste medicamento.

Avaliando-se os dados referentes à relação entre gene *iss* e suscetibilidade aos antimicrobianos para amostras de frangos de corte industrial (Tabela 3 e Figura 2) e de criações alternativas (Tabela 4 e Figura 3), nota-se que para os dois tipos de criação, quando o gene *iss* foi detectado, alguns antimicrobianos obtiveram maiores frequências de resistência.

As maiores frequências ($p<0,05$) de resistência aos antimicrobianos (Figura 2) foram observadas para enrofloxacina, doxiciclina e oxitetraciclina quando o gene *iss* esteve presente em frangos de corte industrial.

TABELA 3-Relação entre presença do gene *iss* e perfil de suscetibilidade a antimicrobianos em 84 isolados de *E. coli* oriundos de amostras de frangos de corte industrial de diferentes regiões do Estado de Goiás

	Sem gene *iss* (N=42)			Com gene *iss* (N=42)			
	S**	I	R	S**	I	R	
	%	%	%	%	%	%	p
AMC*	11,9	4,8	83,3	4,7	11,9	83,3	ns
SAM	47,6	14,3	38,1	3,8	14,3	47,6	ns
EFT	14,3	42,9	42,9	23,8	28,6	47,6	ns
CIP	28,6	33,3	38,1	16,7	33,3	50,0	ns
ENR	9,5	42,9	47,6	7,1	16,7	76,2	0,04
DO	26,2	14,3	59,5	4,8	4,8	90,5	0,01
OT	21,4	26,2	52,4	7,1	0,0	92,9	0,01
TE	14,3	9,5	76,2	7,1	4,8	88,1	ns
CN	33,3	7,1	59,5	14,3	21,4	64,3	ns
RL	7,1	4,8	92,9	4,8	0,0	95,2	ns
SXT	47,6	19,0	33,3	35,7	21,4	42,9	ns
S	19,0	7,1	73,8	4,8	9,5	76,2	ns

*AMC-amoxicilina/ ácido clavulânico; SAM- ampicilina/subactam; EFT-ceftiofur; CIP-ciprofloxacina; DO-doxiciclina;CN-gentamicina;OT -oxitetraciclina;RL- sulfametoxazol;ENR- enrofloxacina; TE-tetraciclina; SXT-Sulfametoxazol-Trimetroprim; S- sulfonamida;.**S- sensibilidade, I- intermediária, R- resistência. As Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre mesmos antibióticos, utilizando teste de qui-quadrado a 5%.

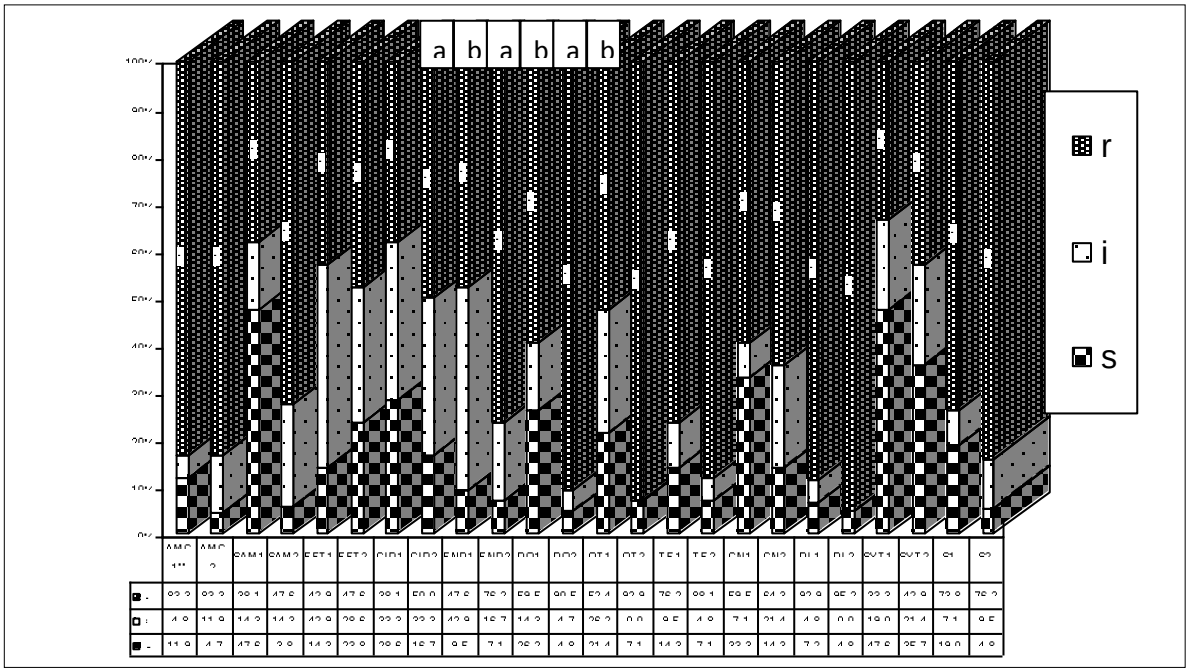


FIGURA 2- Relação entre presença do gene *iss* e perfil de suscetibilidade a antimicrobianos em 84 isolados de *E. coli* oriundos de amostras de frangos de corte industrial. AMC-amoxicilina/ ácido clavulânico; SAM-ampicilina/subactam; EFT-ceftiofur;CIP-ciprofloxacina;DO-doxiciclina;CN-gentamicina;OT-oxitetraciclina; RL- sulfametoxazol;ENR- enrofloxacina;TE-tetraciclina;SXT-Sulfametoxazol-Trimetroprim;S-sulfonamida;S-sensibilidade,I- intermediária, R- resistência,**Os números 1 e 2 junto as siglas dos antibióticos refere-se a ausência (1) ou presença (2) do gene *iss*. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre mesmos antibióticos, utilizando teste de qui-quadrado a 5%.

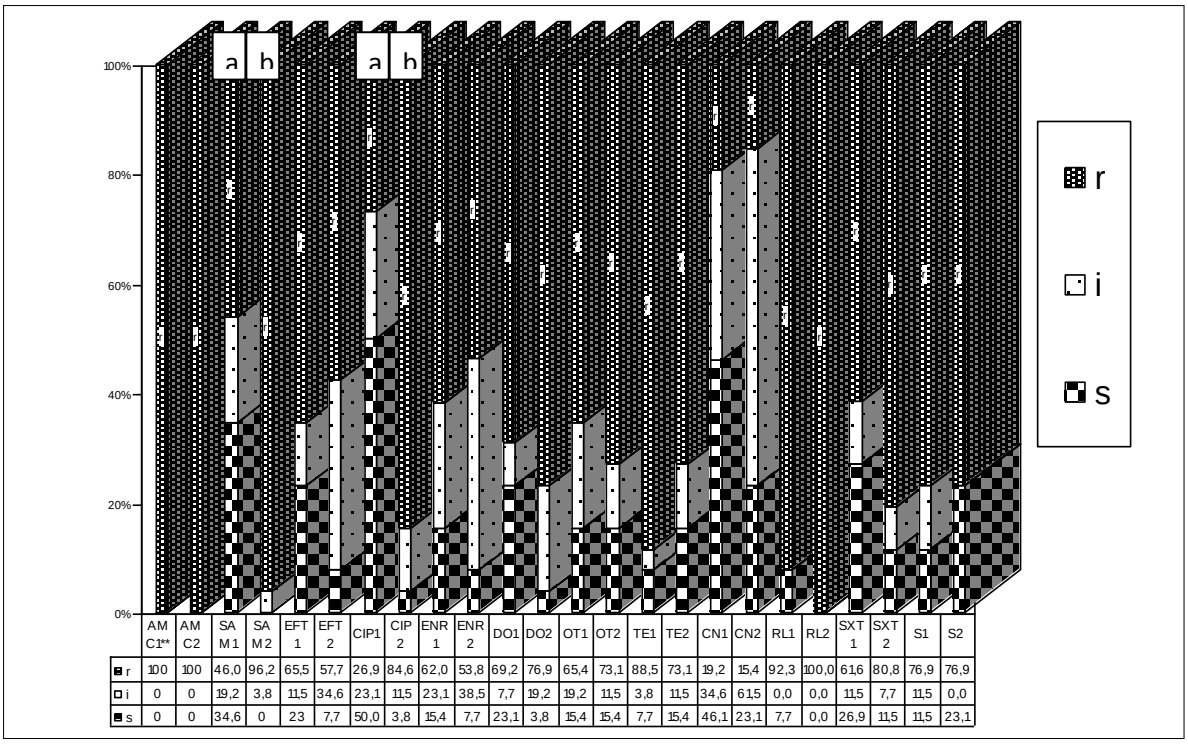
Para os dados de criações alternativas (Figura 3), as maiores frequências de resistência a antimicrobianos foram observadas para ampicilina e ciprofloxacina, quando o gene *iss* esteve presente.

TABELA 4- Relação entre presença do gene *iss* e resistência aos antimicrobianos em 52 isolados de *E. coli* de criações alternativas de frangos de corte

	Sem gene iss (N=42)			Com gene iss (N=42)			
	S**	I	R	S**	I	R	
	%	%	%	%	%	%	p
AMC*	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	100,0	ns
SAM	34,6	19,2	46,1	0,0	3,8	96,2	0,01
EFT	23,1	11,5	65,4	7,7	34,6	57,7	ns
CIP	50,0	23,1	26,9	3,8	11,5	84,6	0,01
ENR	15,4	23,1	61,5	7,7	38,5	53,8	ns
DO	23,1	7,7	69,2	3,8	19,2	76,9	ns
OT	15,4	19,2	65,4	15,4	11,5	73,1	ns
TE	7,7	3,8	88,5	15,4	11,5	73,1	ns
CN	46,1	34,6	19,2	23,1	61,5	15,4	ns
RL	7,7	0,0	92,3	0,0	0,0	100,0	ns
SXT	26,9	11,5	61,6	11,5	7,7	80,8	ns
S	11,5	11,5	76,9	23,1	0,0	76,9	ns

*AMC-amoxicilina/ ácido clavulânico; SAM- ampicilina/subactam; EFT-ceftiofur; CIP-ciprofloxacina; DO-doxiciclina;CN-gentamicina;OT -oxitetraciclina;RL- sulfametoxazol;ENR- enrofloxacina; TE-tetraciclina; SXT-Sulfametoxazol-Trimetroprim; S- sulfonamida;.**S- sensibilidade, I- intermediária, R- resistência. As Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre mesmos antibióticos, utilizando teste de qui-quadrado a 5%.

A resistência a vários antimicrobianos associados à genes de virulência tem sido relatada (WANG et al., 2010). JOHNSON et al. (2002) localizaram em isolados de *E. coli,* um plasmídio relacionado ao gene *iss* e a resistência de oito grupos de antimicrobianos (tetraciclinas, sulfonamidas, aminoglicosídeos e trimetoprim).



	AMC1**	AMC2	SAM1	SAM2	EFT1	EFT2	CIP1	CIP2	ENR1	ENR2	DO1	DO2	OT1	OT2	TE1	TE2	CN1	CN2	RL1	RL2	SXT1	SXT2	S1	S2
r	100	100	46,0	96,2	65,5	57,7	26,9	84,6	62,0	53,8	69,2	76,9	65,4	73,1	88,5	73,1	19,2	15,4	92,3	100,0	61,6	80,8	76,9	76,9
i	0	0	19,2	3,8	11,5	34,6	23,1	11,5	23,1	38,5	7,7	19,2	19,2	11,5	3,8	11,5	34,6	61,5	0,0	0,0	11,5	7,7	11,5	0,0
s	0	0	34,6	0	23	7,7	50,0	3,8	15,4	7,7	23,1	3,8	15,4	15,4	7,7	15,4	46,1	23,1	7,7	0,0	26,9	11,5	11,5	23,1

FIGURA 3- Relação entre presença do gene *iss* e perfil de suscetibilidade a antimicrobianos em 84 isolados de *E. coli* oriundos de amostras de frangos de corte de criações alternativas de diferentes regiões do Estado de Goiás. AMC-amoxicilina/ ácido clavulânico; SAM- ampicilina/subactam; EFT-ceftiofur; CIP-ciprofloxacina; DO-doxiciclina;CN-gentamicina;OT -oxitetraciclina;RL- sulfametoxazol;ENR- enrofloxacina; TE-tetraciclina; SXT-Sulfametoxazol-Trimetroprim; S- sulfonamida;.S- sensibilidade, I- intermediária, R- resistência **Os números 1 e 2 junto as siglas dos antibióticos refere-se a ausência (1) ou presença (2) do gene *iss*. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre mesmos antibióticos, utilizando teste de qui-quadrado a 5%.

Como neste trabalho, a resistência a antimicrobianos associada ao gene iss foi constatada anteriormente por YANG et al. (2004) ao verificar que isolados de aves com gene *iss* apresentaram resistência à vários antimicrobianos. Também BLANCO et al., (1997), CARDOSO et al. (2002), GONÇALVES et al. (2012) e LIMA-FILHO et al. (2013) associaram a detecção do gene *iss* à resistência a vários antimicrobianos, inclusive aos de uso proibido em frangos de corte como promotores de crescimento. Os dados obtidos por estes autores

aliados aos deste trabalho estão em consonância com a função atribuída ao gene *iss* como promotor no aumento de resistência a diversos antimicrobianos em isolados bacterianos (EWERS et al. 2007; ABREU et al., 2010). Destaca-se que a resistência a antimicrobianos atribuída aos genes de virulência, predispõe a saúde pública a riscos, pela possibilidade de transferência destes genes por conjugação, para microrganismos da microbiota intestinal humana e inviabilização destas drogas (SANTOS, 2012).

Apesar da elevada frequência de resistência aos antimicrobianos estar atribuída à presença do gene *iss*, é possível verificar também neste trabalho, que isolados de *E. coli* apresentaram elevada frequência de resistência aos antimicrobianos beta-lactâmicos, as tetraciclinas e as sulfonamidas, não associados a detecção do gene *iss.* Sugere-se que estes resultados estão relacionados a outros genes de virulência não pesquisados neste trabalho. Outros mecanismos de virulência atribuídos à resistência aos antimicrobianos foram abordados por outros autores como SANTOS (2012), que relacionaram a resistência a grupos de antimicrobianos a ação de genes específicos, como por exemplo, ao gene *tet* e suas variantes, no caso das tetraciclinas e ao gene *sul,* no caso das sulfonamidas.

Tem-se ainda (Figura 2 e 3) que os antimicrobianos que apresentaram maior nível de resistência não associada ao gene *iss*, foram a amoxicilina/ácido clavulânico, tetraciclina, e sulfametoxazol, tanto em amostras de frangos de corte quanto em criações alternativas.

Estes resultados mostram que um grande número de isolados provavelmente sejam produtoras de β-lactamase, uma vez que a resistência a amoxicilina/ácido clavulânico foi de 83,3% e 100% nos isolados de frangos de corte e criações alternativas, respectivamente. OTEO et al. (2008) relataram que a resistência à amoxicilina/ácido clavulânico tem aumentado entre *E. coli* de origem humana em hospitais. A elevada frequência de *Enterobacteriaceae* multiresistente em hospitais se deve principalmente à pressão seletiva exercida pelos antibióticos utilizados (CANTON et al., 2008). Os β- lactâmicos são um dos grupos de antibióticos mais utilizados e consequentemente mais associados à resistência (VAN DE SANDE-BRUINSMA et al. (2008).

LAMBIE et al. (2000), verificaram uma forte tendência de resistência a amoxicilina em cepas isoladas de frangos de corte. Em estudo conduzido por SAHOO et al. (2012), observaram-se que isolados de *E. coli* foram altamente resistentes a drogas clássicas como amoxicilina (71,43%) e nenhum antibiótico foi 100% eficaz contra isolados de *E. coli*.

Neste estudo, também elevadas frequências para resistência à tetraciclina foram identificadas, com 82,1% (69/84) e 80,8% (42/52) em frangos de corte e criações alternativas, respectivamente. Tetraciclinas são utilizadas extensivamente na medicina humana e animal. O mecanismo de ação típico das tetraciclinas é bem estabelecido e há um consenso de que tetraciclinas se ligam a um sítio do ribossomo bacteriano impedindo a adição de aminoácidos e, consequentemente, síntese proteica (ZAKERI & WRIGHT, 2008).

Este grupo de antibióticos possui diversas propriedades favoráveis, tais como baixo custo, amplo espectro de ação e baixa toxicidade. Devido a essas propriedades, as tetraciclinas em geral têm sido utilizadas indiscriminadamente, com aparecimento de resistência, principalmente às tetraciclinas de primeira geração e provocado restrições na utilidade clínica destes compostos (CHOPRA & ROBERTS, 2001).

Resultados semelhantes ao deste estudo foram obtidos em experimento desenvolvido por ZANATTA et al., (2004), com objetivo de verificar a suscetibilidade de cepas de *E. coli* de 120 amostras de aves com quadro clínico suspeito de colibacilose. A tetraciclina apresentou resistência de 76%. Também em estudo desenvolvido por ABREU (2010), confirmou-se a situação da crescente resistência de cepas de *E. coli* a antimicrobianos. Foram coletadas 180 amostras de aves para detecção de *E. coli* e 80% (16/20) dos isolados foram resistentes à tetraciclina. Em estudo conduzido por SAHOO et al. (2012), observaram-se que isolados de *E. coli* foram altamente resistentes a importantes antimicrobianos como tetraciclina (74,29%).

Frequências mais elevadas foram obtidas por GONÇALVES (2005) que com objetivo de relacionar problemas respiratórios com a presença de *E. coli* coletou amostras de suabes e fragmentos de sacos aéreos, sendo todos resistentes à tetraciclina. E WANG et al. (2010) utilizaram de 148 amostras de *E.*

coli recuperados de casos diagnosticados de colibacilose aviária, com a maioria dos isolados exibindo resistência à tetraciclina (97%).

Além da alta resistência encontrada neste trabalho para os antimicrobianos amoxicilina e tetraciclina, também foram identificadas elevadas frequências para resistência à sulfametoxazol, com 94% (79/84) e 96,1% (50/52) em frangos de corte e criações alternativas, respectivamente. As sulfonamidas são um dos grupos de antimicrobianos mais utilizados no tratamento de colibacilose. Este grupo possui como mecanismo de ação o fato de serem análogos estruturais do ácido p-amino benzoico (PABA), uma substância essencial para a produção de ácido fólico, e esta última, fundamental para a síntese de DNA e RNA bacteriano (SPINOSA et al., 2006).

Acredita-se que devido à utilização das sulfonamidas para tratamento de infecções por *E. coli*, pode ter ocorrido uma pressão seletiva na indústria avícola e consequentemente altos níveis de resistência, em isolados clínicos de APEC (SINGER & HOFRACRE, 2006). O fato da resistência foi constatado por WANG et al. (2010) quando utilizaram de amostras de *E. coli* recuperados de colibacilose aviária para caracterizar suscetibilidade a antimicrobianos, e obtiveram resistência de 93% a sulfametoxazol.

Supõe-se que a resistência adquirida por *E. coli* neste trabalho seja justificada pela utilização inadequada de antimicrobianos e administração em doses sub-terapêuticas, pois selecionam os agentes bacterianos mais resistentes, propiciam a transferência de genes de virulência e não debelam a infecção (FERREIRA & KNÖBL, 2009), por isso, recomenda-se o uso controlado de antimicrobianos, precedido de teste de suscetibilidade, uma vez que podem comprometer o uso desses antimicrobianos em humanos (YANG et al., 2004).

CONCLUSÕES

Sugere-se que o gene *iss* presente em isolados de *E. coli* tem contribuído com a alta resistência a alguns antimicrobianos em criações avícolas industriais e alternativas.

REFERÊNCIAS

1. ABREU, D. L. DA C.; FRANCO, R. M.; NASCIMENTO, E. R.; PEREIRA, V. LÉO DE 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.

2. ANTÃO, E. M.; GLODDE, S.; LI, G.; SHARIFI, R.; HOMEIER, T.; LATURNUS A, C.; DIEHL , I.; BETHE, A.; PHILIPP, H.; PREISINGER, C. R.; WIELER, L. H.; EWERS, C. The chicken as a natural model for extraintestinal infections caused by avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). **Microbial Pathogenesis**. V. 45, p. 361–369, 2008.

3. ARABI, SHIFTEH; JAFARPOUR, M.; MIRINARGESI, M.; ASL, 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.

4. BLANCO, J. E.; BLANCO, M.; MORA, A.; BLANCO, J. Prevalence of bacterial resistance to quinolones and other antimicrobials among avian *Escherichia coli* strains isolated from septicemic and healthy chickens in Spain. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 8, p. 2184-2185, 1997.

5. CARDOSO, A. L. S. P.; TESSARI, E. N. C.; CASTRO, A. G. M.; ZANATTA, G. F. Avaliação da suscetibilidade a antimicrobianos de cepas de *Escherichia coli* de origem aviária. **Arquivo Instituto Biológico.** São Paulo, v.69, n.2, p.1-5, 2002.

6. CHOPRA, I.; ROBERTS, M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology and epidemiology of bacterial resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews,** v.65, p. 260, 2001.

7. EWERS, C.; LI, G.; WILKING, H.; KIESSLING, S.; ANTAO, E. M. Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: how closely related are they? **International Journal of Medical Microbiology.** v. 297, p.163–76, 2007.

8. FERREIRA, A. J. P.; KNOBL, T. Colibacilose. IN: JUNIOR, A. B.; SILVA, E. N.;FÁBIO, J. D.; SESTI, L. ZUANAZE, M. A. **Doença das aves.** 2 ed. Campinas: Fundação APINCO. p.457-471, 2009.

9. GONÇALVES, P. M. R. *Escherichia coli* com detecção do gene *iss* por PCR, micoplasmas e salmonelas na qualidade sanitária de frangos de corte ao abate. **Tese de Doutorado**. Universidade Federal Fluminense. 84p. 2005.

10. GONÇALVES, P. M. R.; PEREIRA, V. L. DE A.; SILVA, R. DE C. FIGUEIRA ; OLIVEIRA, L. A. T. DE; NASCIMENTO, E. R. Perfil de resistência antimicrobiana de isolados de E*scherichia coli* positiva para gene *iss* em frangos de corte na idade de abate. **Enciclopédia Biosfera**, v.8, n.15; p. 2012.

11. HORNE, S.M.; PFAFF-MACDONOUGH, S.J.; GIDDINGS, C.W.; NOLAN, L.K. Cloning and sequencing of the *iss* gene from a virulent *Avian Escherichia coli.* **Avian Diseases**, v.44, p.179-184, 2000.

12. JOHNSON, T.J.; GIDDINGS, C. W.; HORNE, S.M. Location of increased serum survival gene and selected virulence traits on a conjugative R plasmid in an avian *Escherichia coli* isolate. **Avian Diseases.** v.46, p.342–352, 2002.

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

14. KNÖBL, T.; GODOY, S. N.; MATUSHIMA, E. R.; GUIMARÃES, M. B.; FERREIRA, A. J. P. Caracterização molecular dos fatores de virulência de estirpes de *Escherichia coli* isoladas de papagaios com colibacilose aviária. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science.** v. 45, suplemento, p. 54-60, 2008.

15. LAMBIE, N.; NGELEKA, M.; BROWN, G.; RYAN, J. Retrospective study on *Escherichia coli* infection in broilers sul postmortem examination and antibiotic resistance of isolates in Trinidad. **Avian Diseases**. v.44, n.1, p.155-160, 2000.

16. LIMA-FILHO, J. V.; MARTINS, L, V.; NASCIMENTO, D. C. DE O.; VENTURA, R. F.; BATISTA, J. E. C.; SILVA, A. F. B.; RALPH, M. T.; NETO, R. V. V. Zoonotic potential of multidrug-resistant extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* obtained from healthy poultry carcasses in Salvador, Brazil. **Brazilian Journal of Infection Diseases**, v.17, n.1, p. 54-61, 2013.

17. MOREIRA, H. O. M. Isolamento de *E. coli* ácido-resistentes em fezes de bovines submetidos à dieta de volumoso e concentrado. **Dissertação.** Universidade de Brasília. 60p., 2007.

18. NCCLS. **National Committee for Clinical Laboratory Standards.** Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, 2011.

19. OH, J. Y.; KANG, M. S.; YOON, H.; CHO, H. W.; AN, B. K.; SHIN, E. G.; KIM, Y. J.; KIM, M. J.; KWON, J. H.; KWON, Y. K. The embryo lethality of *Escherichia coli* isolates and its relationship to the presence of virulence-associated genes**. Poultry Science**, v.91, p.370–375, 2012.

20. OLIVEIRA, S.J.; **Guia bacteriológico prático.** Ulbra: Canoas 260p., 2012.

21. OTEO J.; CAMPOS J.; LÁZARO E.; CUEVAS, O; GARCIA-COBOS, S.; ABAJO, F. J. Increased amoxicillin–clavulanic acid resistance in *Escherichia coli* blood. isolates. **Spain Emerging Infectious Diseases,** v.14, p.1259–1262, 2008.

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

23. 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 case of poultry. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, p.183-186, 2008.

24. SAHOO,T. K.; SAHOO, L.; SARANGI, L. N.; PANDA, S. K.; PANDA, H. K. Prevalence, Isolation, Characterisation and Antibiogram Study of Pathogenic *Escherichia coli* from Different Poultry Farms of Odisha. **Journal of Advanced Veterinary Research,** v. 2, p. 169-172, 2012.

25. SANTOS, M. M. dos. Resistência antimicrobiana em cepas bacterianas isoladas de celulite aviária. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária. **Dissertação.** Universidade de Brasília, 2012, 66p.

26. SHERLEY, M.; GORDON, D. M.; COLLIGNON, P.J. Evolution of multi-resistance plasmids in Australian clinical isolates of *Escherichia coli*. **Microbiology.** v. 150, n. 5, p.1539-1546, 2004.

27. SILVA, I. M. M.; EVÊNCIO-NETO, J.; SILVA, R .M.; LUCENA-SILVA, N.; MAGALHÃES, J.; BALIZA M. Caracterização genotípica dos isolados de *Escherichia coli* provenientes de frangos de corte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.63, n.2, p.333-339, 2011.

28. SINGER, R. S; HOFRACRE, C. L. Potencial impacts of antibiotic use in poultry prodution. **Avian Diseases.** 50:161-172, 2006.

29. SPINOSA, H.; GÓNIAK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia Aplicada a Medicina Veterinária.** 4ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2006.

30. TEJKOWSKI, T. M. Prevalência de fatores associados a virulência em amostras de *Escherichia coli* patogênica aviária (APEC) isoladas de lesões de celulite aviária.**Monografia**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária. 35p.2012.

31. 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, n. 11, p. 6554-6560, 2004.

32. WANG, X.M.; LIAO, X.P.; ZHANG, W. J.; JIANG, H. X.; SUN, J.; ZHANG, M. J.; HE, X. F.; LAO, D. X.; AND LIU, Y. H. Prevalence of Serogroups, Virulence Genotypes, Antimicrobial Resistance, and Phylogenetic Background of Avian Pathogenic *Escherichia coli* in South of China. **Foodborne Pathogens and Disease,** v. 7, n. 9, p. 1099-1106, 2010.

33. YANG, H.; CHEN, S.; WHITE, D.G.; ZHAO, S.; MCDERMOTT, P.; WALKER, R.; MENG, J. Characterization of multiple-antimicrobial-resistant *Escherichia coli* isolates from diseased chickens and swine in China. **Journal of Clinical Microbiology,** v. 42, n. 8, p. 3483-3489, 2004.

34. ZAKERI, B.; WRIGHT, G. D. Chemical biology of tetracycline antibiotics. **Biochemistry and cell biology**. v. 86, n.2, p.124-136, 2008.

35. ZANATTA, G. F; KANASHIRO, A. M. I.; CASTRO, A. G. M.; CARDOSO, A. L .S. P.; TESSARI, E. N. C. Suscetibilidade de amostras de E*scherichia coli* de origem aviária a antimicrobianos. **Arquivo Instituto Biológico.** v.71, n.3, p.283-286, 2004.

CAPÍTULO 5- CONSIDERAÇÕES FINAIS

Uma crescente preocupação dos consumidores tem sido a busca por consumo de carne de frango de qualidade. A aquisição destes produtos só é possível através da adoção de procedimentos que visam controle de bactérias patogênicas para as aves e para o homem como *E. coli*.

Esta bactéria normalmente compõe a microbiota normal do intestino de aves e mamíferos. No entanto, existem cepas patogênicas para aves (APEC) que determinam processos patológicos extra-intestinais em aves. Isolados de *E. coli* atuaram em casos de aerossaculite, traqueíte, pericardite e enterite em frangos de corte. O diferencial destas cepas patogênicas das não reside na presença de fatores de virulência, conferida principalmente por genes de virulência adquiridos com consequente resistência a antimicrobianos, por exemplo.

A pesquisa de genes de virulência é de fundamental importância, e pode minimizar as perdas econômicas geradas nas infecções por esta bactéria. O presente trabalho e consequente detecção de genes de virulência, bem como o perfil de resistência a antimicrobianos de isolados de *E. coli* foi de grande importância, uma vez que demonstrou o padrão de cepas de *E. coli* presentes em frangos de corte. Porém, estudos posteriores abordando os efeitos da presença de genes de virulência em isolados de *E. coli* deverão ser realizados uma vez que os genes pesquisados estiveram presentes nas análises, porém são necessárias associações entre os mesmos para determinar lesões, com isso pesquisas subsequentes abordando também outros genes em conjunto com os deste estudo poderão elucidar a ação dos mesmos na patogenicidade de APEC, bem como testes *in vivo*.

Com relação ao perfil de resistência a antimicrobianos, o uso de antimicrobianos como promotores de crescimento tem demonstrado ser útil em estabilizar a microbiota intestinal e melhorar o desempenho de aves, além de prevenir processos patológicos intestinais específicos. No entanto, há um questionamento em relação a essa prática. O tratamento com antimicrobianos é uma das formas de diminuir o impacto da colibacilose, mas a emergência e a disseminação de resistência antimicrobiana em amostras de *E. coli* pode complicar o tratamento de infecções causados por esta bactéria. Neste trabalho

foram observados altos níves de resistência a vários antimicrobianos nos dois sistemas de criação pesquisados, além disso, obtiveram-se dados sobre a situação de resistência entre APEC e essas análises podem servir para monitorar e prevenir a disseminação de APEC.

Ainda relacionado aos antimicrobianos, neste trabalho sugere-se que o gene *iss* promoveu resistência a alguns antimicrobianos em isolados de APEC obtidos de frangos de corte e de criações alternativas, demonstrando a necessidade de conhecimento a acerca da virulência de APEC para seu efetivo controle. Com isso, dados a respeito deste patógeno e a determinação da expressão de genes de virulência de APEC durante a infecção são necessários, dado a estreita relação entre as amostras de origem humana e avícola.

Desta maneira, entende-se que estudos epidemiológicos sobre a resistência a antimicrobianos e sorogrupos envolvidos nos casos de colibacilose em aves, bem como conhecimento dos genes de virulência de isolados são essenciais. Com isso, medidas como maiores cuidados no ambiente de criação das aves e correto manejo e desinfecção dos galpões de criação devem ser adotadas para controle deste patógeno na avicultura visando o fornecimento de alimentos seguros ao homem e também menores perdas geradas por lesões de colibacilose nas aves.