

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

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE GENES ISOLADOS DE
Escherichia coli DE SALPINGITES E DERMATOSES EM AVES AO
ABATE**

Jayane Ricardo Monteiro da Silva

Orientadora: Profa. Dra. Maria Auxiliadora Andrade

**GOIÂNIA
2016**



TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, 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 **1. Identificação do material bibliográfico:** **Dissertação** **Tese**

1 **2. Identificação da Tese ou Dissertação**

2

Nome completo do autor: Jayane Ricardo Monteiro da Silva

Título do trabalho: Caracterização molecular de genes isolados de *Escherichia coli* de salpingites e dermatoses em aves ao abate.

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

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

Jayne Ricardo Monteiro da Silva
Assinatura do (a) autor (a) ²

Data: 25 / 08 / 2016

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

²A assinatura deve ser escaneada.

JAYANE RICARDO MONTEIRO DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE GENES ISOLADOS DE
Escherichia coli DE SALPINGITES E DERMATOSES EM AVES AO
ABATE**

Dissertação apresentada para a obtenção do título de Mestre 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.

Orientador (a):

Profa. Dra. Maria Auxiliadora Andrade - UFG

Comitê de Orientação:

Dra. Sabrina Castilho Duarte - EMBRAPA-SC

Profa. Dra. Cíntia Silva Minafra e Rezende
EVZ/UFG

**GOIÂNIA
2016**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Silva, Jayane Ricardo Monteiro da
Caracterização molecular de genes isolados de *Escherichia coli* de salpingites e dermatoses em aves ao abate [manuscrito] / Jayane Ricardo Monteiro da Silva. - 2016.
viii, 52 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Maria Auxiliadora Andrade; co-orientadora Dra. Sabrina Castilho Duarte; co-orientador Dr. Cintia Silva Minafra e Rezende.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia (EVZ), Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Goiânia, 2016.

Bibliografia.

Inclui siglas, fotografias, abreviaturas, símbolos, gráfico, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Colibacilose. 2. Fatores de virulência. 3. Frangos de Cortes. 4. Poedeiras. 5. Sorogrupos. I. Andrade, Maria Auxiliadora, orient. II. Título.

CDU 639.09



1 ATA NÚMERO 446 DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DO PROGRAMA DE
 2 PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL DA ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
 3 DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS. Às 08h00min do dia 17/06/2016, reuniu-se na sala
 4 de defesas do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, a Comissão Julgadora infra
 5 nomeada para proceder ao julgamento da Defesa de Dissertação de Mestrado apresentado (a) pelo
 6 (a) Pós-Graduando (a) **Jayane Ricardo Monteiro da Silva**, intitulada: "*Caracterização molecular*
 7 *de genes isolados de Escherichia coli de salpingites e dermatoses em aves ao abate*", apresentado
 8 para obtenção do Título de Mestre em Ciência Animal, junto à Área de Concentração: **Sanidade**
 9 **Animal, Higiene e Tecnologia de Alimentos**, desta Universidade. O Presidente da Comissão
 10 Julgadora, **Profa. Dra. Maria Auxiliadora Andrade**, iniciando os trabalhos, concedeu a palavra ao
 11 (a) candidato (a) **Jayane Ricardo Monteiro da Silva** para exposição em **quarenta** minutos do seu
 12 trabalho. A seguir, o senhor Presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos
 13 Examinadores, os quais passaram a arguir o (a) candidato (a), durante o prazo máximo de **vinte**
 14 minutos, assegurando-se ao mesmo igual prazo para responder aos Senhores Examinadores.
 15 Ultimada a arguição, que se desenvolveu nos termos regimentais, a Comissão, em sessão secreta,
 16 expressou seu Julgamento, considerando o (a) candidato (a) **Aprovado (a) ou Reprovado (a):**

17 Profa. Dra. Maria Auxiliadora Andrade (Orientador (a)) Aprovada
 18 Profa. Dra. Sílvia Minharro Barbosa Aprovada
 19 Prof. Dr. Cairo Henrique de Sousa Oliveira Aprovado

20 Em face do resultado obtido, a Comissão Julgadora considerou o(a) candidato(a) **Jayane Ricardo**
 21 **Monteiro da Silva**, habilitada [(Habilitado(a) ou não Habilitado(a))
 22 pelo(s) motivo(s) abaixo exposto(s):

23 _____
 24 _____
 25 _____
 26 _____
 27 _____
 28 _____
 29 _____
 30 _____
 31 _____
 32 _____
 33 _____

34 A Banca Examinadora aprovou a seguinte alteração no título da dissertação:

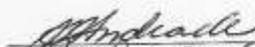
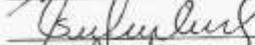
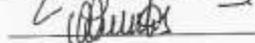
35 _____
36 _____
37 _____
38 _____
39 _____
40 _____

41 Nada mais havendo a tratar, eu **Profa. Dra. Maria Auxiliadora Andrade** lavrei a presente ata que,
42 após lida e achada conforme foi por todos assinada.

43 Profa. Dra. Maria Auxiliadora Andrade

44 Profa. Dra. Sílvia Minharro Barbosa

45 Prof. Dr. Cairo Henrique de Sousa Oliveira

Tem calma contigo mesmo e olha aonde vais
Espera um minuto, pensa no que farás, no meio da
tormenta é duro navegar, e uma escolha incerta
pode caro custar. Nem todo mau momento te faz
fracassar, e em caminhos de pedras haverás de
passar, pois nem tudo na vida é como a gente quer,
mesmo em sombras na terra o sol brilha no céu.
Segue adiante, sem olhar atrás. Vive cada dia e
nada mais. E o que vier tu vencerás. Só tu tens a
chave: abres ou fecharás. Tem calma na vida o
jogo é de verdade, pra ganhar a partida vai com
força e coragem, são as regras do jogo é bom
sempre lembrar diante dos desafios é preciso tentar
... E assim como o ouro pelo fogo vais passar e o
que tens de melhor o fogo vai revelar. Ainda que
chores, tu vencerás, só aquele que perde sabe
também ganhar. Segue adiante, sem olhar atrás.
Vive cada dia e nada mais. E o que vier tu
vencerás. Só tu tens a chave: abres ou fecharás
Tem calma... tem calma... tem calma...

(Pe Fábio de Melo - Tem Calma)

Dedico este trabalho principalmente à minha família, minha mãe, irmão, avó, bisavô e padrinho; ao meu esposo João Victor e minha filha Louyse, as melhores companhias que uma mulher pode ter para quem eu sempre recorro quando minhas forças começam a se esvaír, pois o amor e a paixão são inesgotáveis fontes de energia, estes que sempre me apoiaram principalmente quando mais me vi sozinha na estrada. Dedico ainda a todos que me apoiaram nesta longa caminhada, pois muitas foram as noites sem dormir e enorme foram as dores sentidas, mais doce está sendo a vitória e a Deus toda honra e Glória...

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me dado toda a força necessária, por me iluminar nos momentos difíceis, por não me deixar desistir. Entrego a minha gratidão a ele, pela verdade que me molda todos os dias e me leva para prosseguir em prol dos meus objetivos, sempre firme e confiante.

Agradeço a UFG pela porta aberta para realizar este grande sonho, ao programa de pós graduação da UFG, sempre pela competência e pelo excelente trabalho realizado. Agradeço imensamente ao CNPq, pela oportunidade concedida!

Ao meu esposo, Joao Victor, que caminha comigo e percorre esta longa estrada, agradeço por todo amor e por cada abraço, cada beijo nos momentos de grandes dificuldades da vida, de desânimo e angústia, meu maior laboratorialista. Agradeço ainda a minha pequena filha Louyse, pois a cada sorriso e olhar dela eu sinto que estou no caminho certo e que tenho forças suficientes para continuar seguindo em frente e lutando por um futuro melhor a cada dia para nós, meu maior presente na vida. Amo muito vocês!

Agradeço especialmente, a pessoa que tornou todo este sonho possível, meu padrinho e pai William Ricardo, valente e guerreiro, pois para mim o maior exemplo está nele. Agradeço aos meus pais, Ilma e Joscelito, a minha super avó Maria, bizavô Jacy, irmão Ricardo Gabriel e a eterna fiel e companheira cadelinha Megan, sempre pelo apoio e confiança, e que nunca mediram esforços para verem minha vitória e felicidade e quando em momentos complicados souberam me aconselhar. Vocês são minhas riquezas!

Agradeço infinitamente a minha orientadora Maria Auxiliadora Andrade pela paciência, carinho, cuidados, serenidade e paz de espírito, por estar sempre disposta a ajudar e abrir as portas diante das oportunidades, pessoa que me norteou nesta caminhada, com grande sabedoria, carinho e apoio e me guiou nesta longa estrada e ainda me guia e sempre será meu exemplo a ser seguido de profissional e mulher.

Agradeço ainda quem me ensinou a caminhar e a trilhar este caminho, quem me ensinou a amar o que faço com sua fascinante maneira de educar e transmitir seus ensinamentos, a querida professora Sílvia Minharro Barbosa.

E por fim, a todos os familiares, professores, amigos, colegas, profissionais do Laboratório de bacteriologia e dos frigoríficos que mesmo sem constar o nome nesta humilde lista, participaram direta ou indiretamente da minha vida, estando presentes nesta longa jornada. Obrigada a todos vocês, pois esta não é uma vitória minha, mas uma vitória de todos vocês, uma vitória somente nossa.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES INICIAIS	1
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1. Salpingites.....	2
2.2. Dermatoses.....	3
2.3. Classificação de <i>Escherichia coli</i>	4
2.4. Estruturas antigênicas.....	6
2.5. Genes de <i>Escherichia coli</i>	6
REFERÊNCIAS.....	9
CAPÍTULO 2 – GENES DE VIRULÊNCIA EM ISOLADOS DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> DE SALPINGITE EM POEDEIRAS AO ABATE	14
1. INTRODUÇÃO	15
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
2.1. Local.....	17
2.2. Amostragem.....	17
2.3. Análise bacteriológica	17
2.4. Extração de DNA dos isolados de <i>E. coli</i>	18
2.5. Técnica de PCR para detecção dos genes de virulência	18
2.6. Testes sorológicos	19
2.7. Análise estatística	20
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
4. CONCLUSÃO	25
REFERÊNCIAS.....	26
CAPÍTULO 3 – GENES DE VIRULÊNCIA EM ISOLADOS DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> DE DERMATOSSES EM FRANGOS DE CORTE AO ABATE	32
1. INTRODUÇÃO	33
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	34
2.1. Local.....	34
2.2. Amostragem.....	34
2.3. Análise bacteriológica	35
2.4. Extração de DNA isolados de <i>E. coli</i>	35
2.5. Técnica de PCR para detecção dos genes de virulência	35
2.6. Testes sorológicos	37
2.7. Análise estatística	37
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37

4. CONCLUSÃO	44
REFERÊNCIAS.....	45
CAPÍTULO 4- CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	51

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2

FIGURA 1. Eletroforese da PCR para detecção de genes de virulência de isolados de *E. coli* obtidos de poedeiras localizados de diferentes municípios do Estado de Goiás. A- 1: marcador de peso molecular, 2 e 15 controle positivo e negativo, respectivamente, a amostra 6 é negativa para salpingite, as demais amostras são positivas para salpingite com e sem lesão, gel de agarose a 2%; B-1: marcador de peso molecular, 2 e 15 controle positivo e negativo, respectivamente, as amostras 8 e 10 são negativas, as amostras 3,5,7,9,11 a 14 são positivas para salpingite, gel de agarose a 1,2%.....22

CAPÍTULO 3

FIGURA 1. Eletroforese da PCR para detecção de genes de virulência de isolados de *E. coli* obtidos de frangos de corte localizados de diferentes municípios do estado de Goiás. A- 1: marcador de peso molecular, 2 e 13 controle positivo e negativo, respectivamente, as amostras 3 a 12 são positivas para dermatose com e sem lesão, gel de agarose a 2%; B-1: marcador de peso molecular, 2 e 13 controle positivo e negativo, respectivamente, a amostra 8 é negativa, as amostras 3 a 7 e 9 a 12 são positivas para dermatose, gel de agarose a 1,2%.....40

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

- TABELA 1. Frequência de *E. coli* isoladas de ovidutos de poedeiras comerciais abatidas sob SIE, em 2015.....20
- TABELA 2. Frequência dos genes *sfa*, *hly*, *traT* e *iss* em isolados de *E. coli* obtidos de ovidutos com e sem alterações macroscópicas oriundas de poedeiras comerciais.....21
- TABELA 3. Frequência dos sorogrupos e sorotipos de isolados de *E. coli* de ovidutos com e sem alterações macroscópicas de poedeiras comerciais ao abate, sob SIE no estado de Goiás, em 2015..... 24

CAPÍTULO 3

- TABELA 1. Frequência de *E. coli* isoladas de pele de frangos de corte com e sem alterações macroscópicas oriundas de abatedouros com SIF localizados no estado de Goiás, abatidos no período de dezembro de 2014 a março de 2015.....38
- TABELA 2. Frequência dos genes *sfa*, *hly*, *traT* e *iss* em isolados de *E. coli* obtidos de pele com e sem alterações macroscópicas oriundas de frangos de corte.38
- TABELA 3. Frequência dos sorogrupos identificados de *E. coli* de pele com e sem alterações macroscópicas oriundas de abatedouros de frangos de corte.....43

LISTA DE QUADROS**CAPÍTULO 2**

QUADRO 1. Sequência de <i>primers</i> avaliados pela técnica de PCR, para amplificação de genes de Virulência de <i>E. coli</i>	19
---	----

CAPÍTULO 3

QUADRO 1. Sequência de <i>primers</i> avaliados pela técnica de PCR, para amplificação de genes de Virulência de <i>E. coli</i>	36
---	----

LISTA DE GRÁFICO

CAPÍTULO 3

- GRÁFICO 1. Frequência da associação dos genes *traT* e *iss* em isolados de *E. coli* de pele com e sem lesões de matadouros de frangos de corte, abatidos sob SIF no estado de Goiás em dezembro de 2014 a março de 2015.....42

LISTA DE ABREVIATURAS

APEC	<i>Escherichia coli</i> patogênica aviária
AVG- H₂S+	Amarelo/vermelho gás negativo, sulfeto de hidrogênio positivo
BHI	<i>Brain Heart infusion</i>
EAGGEC	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativos
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
EIEC	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasivos
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênicos
G	Gramas
Hz	Hertz
IP	Ilhas de patogenicidade
LC(+)	Lactose positiva
LC(-)	Lactose negativa
LPS	Lipopolissacarídeo
MNEC	<i>Escherichia coli</i> meningite neonatal
NG	Nanogramas
OIE	Organização Mundial de Saúde Animal
PCR	Reação de cadeia em polimerase
REDEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênicos de coelhos
Ta	Temperatura de anelamento
TBE	Tampão tris-borato-EDTA
TSI	<i>Triple Sugar Iron</i>
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UV	Eletronic UV transiluminador, Ultra-Lum
UPEC	<i>Escherichia coli</i> uropatogênicos
VM	Vermelho- Metila
VT-I e VT-II	Verotoxina
W	Watts

LISTA DE SÍMBOLOS

G	Força G
H₂S	Sulfeto de Hidrogênio
mL	Mililitro
min	Minutos
µL	Microlitro
+	Positivo
-	Negativo
%	Porcentagem
<	Menor
>	Maior

RESUMO

As infecções causadas por *Escherichia coli* patogênicas para aves são apontadas como uma das principais causas de impactos econômicos para a indústria avícola pelo retardo de crescimento e condenação de carcaças de aves nos matadouros. O presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de identificar *Escherichia coli* de amostras de salpingite e dermatose de poedeiras e frangos de corte, respectivamente, bem como detectar os genes de virulência de estirpes de APEC e identificar sorogrupos. Para tanto, 620 amostras de frangos de corte e poedeiras, com e sem lesões, condenadas parcial ou totalmente ao abate foram coletados em dois matadouros. As amostras coletadas foram submetidas inicialmente a bacteriologia e isolados de *E. coli* foram processados por PCR para detectar a presença de genes de virulência e resistência, e posteriormente submetidas a análise sorológica para cinco sorogrupos. Os resultados mostraram um total de 18,06% (112/620) isolados de APEC, sendo 61,60%(69) para salpingite e 38,40%(43) para dermatose. Na pesquisa dos genes, não foram encontradas presença do gene *sfa* e *hly* em nenhuma das amostras (0/112), enquanto que o gene *traT* foi identificado em 80,36% (90/112) e o *iss* em 55,36% (62/112). Detectou-se a presença simultânea dos genes *iss* e *traT* nos isolados. Para a sorotipagem, observou-se uma frequência baixa para *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* O128 e *E. coli* O167, e um número considerável de *E. coli* enterohemorrágica O157:H7, 3% para salpingite e 5,9% para dermatoses. Conclui-se que houve um índice relevante de isolados de *E. coli* das amostras estudadas bem como a presença dos genes *iss* e *traT*.

Palavras-chave: colibacilose, frangos de corte, lesões, poedeiras, sorogrupos.

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1. INTRODUÇÃO

A contínua intensificação da produção no setor avícola propicia determinadas condições que favorecem a ocorrência e a disseminação de algumas doenças infecciosas¹, que podem culminar em condenação parcial ou total de carcaças de órgãos nos matadouros com destaque para colibacilose, síndrome ascítica e hepatite. Dessas perdas, aproximadamente 19% são atribuídas à colibacilose².

A colibacilose, doença causada pela *Escherichia coli* geralmente é sistêmica, secundária a outros agentes, com manifestações extra intestinais. É considerada uma das principais doenças da avicultura industrial moderna em todos os países do mundo, em razão das perdas econômicas nas diversas etapas da cadeia de produção de aves: incubatórios, plantéis de reprodução, postura comercial, na produção de frangos de corte e matadouros^{3, 4}.

Embora a colibacilose não figure na lista de doenças de notificação compulsória da Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), o papel da *E. coli* como agente causador de agravos à saúde humana e animal é inquestionável nos dias atuais⁵.

Escherichia coli é um patógeno entérico, considerada um microrganismo comensal da microbiota normal do trato intestinal de humanos e animais, com cepas que podem causar morbidade e mortalidade grave^{6, 7} e são consideradas uma ameaça a produção de aves⁸.

Este microrganismo pode ser agrupado de acordo com seus mecanismos de patogenicidade, em patótipos que estão frequentemente associados à doença e lesões em animais⁹⁻¹¹.

Para aves, *E. coli* patogênica (APEC) são responsáveis por doença sistêmica que evolui para um quadro septicêmico¹², além disso, a severidade da infecção é, em parte, dependente da patogenicidade da cepa e varia na presença de genes de virulência¹³⁻¹⁵.

Adicionalmente *E. coli* pode ser classificada de acordo com sua estrutura antigênica em sorogrupos os quais podem expressar vários fatores de virulência e resultar em quadros clínico/anatomopatológicos incluindo infecções sistêmicas e localizadas, tais como: aerossaculites, colisepticemia aguda, salpingites, infecção saco vitelino, síndrome da cabeça inchada, onfalites, peritonites, sinovites, dermatoses, incluindo as celulites¹⁵⁻¹⁷.

O uso mais recente de abordagens genéticas para a identificação de novos fatores de virulência tem aumentado consideravelmente o conhecimento de mecanismos patogênicos

da APEC. A estreita relação entre as semelhanças genéticas de alguns isolados de lesões de aves com aqueles que causam enfermidades em humanos é motivo de investigação sobre a doença, pois pode constituir risco a saúde do consumidor¹⁸.

O fato é que a segurança alimentar se associa às questões do risco imputado aos alimentos que podem veicular agentes biológicos, químicos ou físicos oferecendo risco à saúde do consumidor, além de englobar a manutenção e a disponibilidade de alimentos à população mundial, assim como o uso indevido de medicações que podem prejudicar a saúde pública e animal.

Diante do exposto, o surgimento de hipóteses de que aves pudessem atuar como reservatórios de estirpes potencialmente patogênicas para humanos, este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de detectar genes de virulência de *E. coli* isoladas de amostras de abatedouros de frangos de corte e poedeiras comerciais, correlacionando com alguns fatores durante o processo de criação e abate, bem como identificar sorotipos de importância em medicina veterinária.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Salpingites

A salpingite, é um processo inflamatório supurativo agudo do oviduto, geralmente crônico e pode ser causado pela bactéria *Escherichia coli*. Caracteriza-se macroscopicamente, pela formação de massa caseosa composta por heterófilos e bactérias com aspecto desidratado no interior do órgão, notando-se que as paredes ficam intensamente delgadas. A bactéria pode atingir o oviduto de duas formas: pela proximidade do órgão com as membranas do saco aéreo abdominal esquerdo^{19, 20}, devido as aves só desenvolverem os órgãos genitais esquerdos, sofrendo o ovário e o oviduto direito uma involução ou por infecções ascendentes a partir da cloaca^{19,21}.

É visto em aves quando acometidas, que podem apresentar perda de peso e, mais freqüentemente, morte, sem nenhum sinal clínico, ocasionalmente também pode ser responsável por consequente aumento da mortalidade embrionária no incubatório, além de transmitir cepas de *E. coli* para a progênie^{19, 22}.

A contínua intensificação da produção no setor avícola propicia determinadas condições que favorecem a ocorrência e a disseminação de algumas doenças infecciosas, como a colibacilose. Nos abatedouros o processo que mais causa condenações é a salpingite¹.

Segundo Fossum et al.²³, em pesquisas com poedeiras utilizando de sistemas habitacionais alternativos e concluíram que as doenças bacterianas são as causas mais comuns de mortalidade. A doença predominante foi de infecções causadas por *Escherichia coli*, ou seja, colibacilose, encontrado em 85 lotes dos 312 analisados. Os achados patológicos foram geralmente salpingite aguda ou subaguda fibrinosa, ooforite e peritonite, ou mais raramente pericardite, perihepatite, pneumonia e aerossaculite. Observaram que a proporção relativamente elevada (52%) dos casos de colibacilose ocorreram entre o início da postura, e 30 semanas de idade. Em 50% dos lotes infectados observaram nas aves submetidas a necropsias lesões relacionadas ao “stress” como por exemplo canibalismo cloacal, sendo que destas, 19% (85/312) foram diagnosticadas com colibacilose.

Santos et al.¹⁹ analisaram 10 carcaças de frangos de corte, fêmeas, com 45 dias de idade que tiveram condenação total por salpingite, e durante a necropsia observou-se que o oviduto apresentava paredes distendidas e delgadas, com massa de material amarelado e de aspecto caseoso na luz do órgão e na análise bacteriológica dos suabes do fígado e do oviduto foi isolada a bactéria *Escherichia coli* somente do oviduto.

Outro trabalho que mostra a importância da salpingite foi realizado por Eveline et al.²⁴, em abatedouros avícolas, no qual mostram que um dos principais motivos de condenação de carcaças foi a salpingite e podem ser resultantes de uma contaminação por APEC.

2.2. Dermatoses

A doença causada pela APEC está em sua maior parte associada com fatores predisponentes secundários como ambientais e de acolhimento das aves. A dermatose está ligada diretamente ao aumento da densidade populacional e ao manejo das aves, como cama excessivamente úmida e adensamento excessivo, também está associado com aumento na incidência de dermatite de contato^{25, 26}, e conseqüentemente, de condenação de carcaça.

Dermatose também está relacionada com a genética, refere-se ao sexo, pois estudos revelam que os machos têm velocidade de empenamento mais lenta, são mais agressivos e por isso mais afetados por doenças cutâneas associadas a traumatismos²⁵. Essas aves, em geral, movimentam-se menos, tendendo a permanecer mais tempo em contato com a cama e sofrendo arranhões provocados pelas unhas das outras (devido densidade do aviário, temperatura ambiente, qualidade da cama, peso e idade das aves), e conforme a intensidade dos arranhões pode ocorrer ruptura da pele evoluindo para um processo inflamatório,

caracterizando um abscesso. A deterioração da cama favorece a multiplicação de agentes patogênicos como a *E. coli* que poderão invadir a pele lesada e multiplicar-se, surgindo então, doenças como as dermatoses que são causas de condenação das aves^{25, 27, 28}.

Com o crescimento expressivo da avicultura industrial, as perdas causadas por condenações têm ganhado importância. Dentro deste contexto encontra-se 20,3% das condenações por dermatose²⁸, resultados semelhantes ao de Oliveira et al.²⁹, que encontraram 12,7% de dermatoses de frangos de corte em amostras de matadouro.

De acordo com Sesterhem et al.³⁰ as lesões ulcerativas na pele de frangos de corte são causas comuns de condenação total ou parcial de carcaças em frigoríficos, estes, em seus estudos, diagnosticaram 102 (72,32%) casos de dermatoses e dermatite granulomatosa por corpo estranho.

Pianho et al.³¹ em um levantamento realizado em matadouro da região noroeste do estado do Paraná constataram que 1,53% das condenações eram de dermatose e 1,19% para celulite, que podem estar relacionadas com o clima e manejo, que favorecem o desenvolvimento do seu agente etiológico, além de causarem perdas significativas para a indústria.

2.3. Classificação de *Escherichia coli*

Escherichia coli pertence à família *Enterobacteriaceae*, provavelmente, um dos microrganismos mais ubíquos na terra, encontrada no solo, água, plantas e existente como parte da microbiota intestinal comensais do ser humano e outros animais e, é responsável pela produção de diversos produtos metabólicos benéficos. Poucos microrganismos são tão versáteis como *E. coli*, pois causam infecções oportunistas e podem ser um patógeno letal³²⁻³⁵.

O gênero *Escherichia* contém várias espécies, com alta variabilidade antigênica, e a espécie *E. coli* comumente é isolada nos laboratórios clínicos; além de ser um dos microrganismos comumente envolvidos em septicemias por Gram-negativos e em choque induzido por endotoxinas^{36,37}. Alguns estudos descrevem que mesmo cepas de *E. coli* comensais podem conter um ou mais genes de virulência com potencial de causar doenças em animais imunossuprimidos³⁸.

A compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na patogenia desta infecção auxilia na diferenciação, sob o ponto de vista genético, das amostras associadas a quadros intestinais e extra intestinais, permitindo a classificação em patotipos distintos de

acordo com a presença ou ausência de fatores de virulência específicos³⁹. Os mecanismos de virulência têm sido continuamente estudados e considerados multifatoriais, assim sendo, o conhecimento da genética bacteriana gera mecanismos que podem auxiliar na identificação de cepas patogênicas isoladas de aves⁴⁰.

Estudos relacionados a patogenicidade de *E. coli* mostraram, que amostras patogênicas possuem mecanismos de virulência específicos. Com base nas características de patogenicidade, no efeito em certas culturas de células e nos grupos sorológicos, Kaper⁴¹ citou nove grupos de *E. coli* (patotipos): enteropatogênicos (EPEC), enterotoxigênicos (ETEC), enteroinvasivos (EIEC), enterohemorrágicos (EHEC), enteroagregativos (EAGGEC), uropatogênicos (UPEC), meningite neonatal (MNEC), enteropatogênicos de coelhos (REDEC) e patogênicos para aves (APEC)^{37, 42, 43}.

Os patótipos mais importantes em sanidade avícola são a *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) e a *E. coli* patogênica aviária (APEC), apesar de EPEC, EIEC e ETEC também serem encontradas⁴³.

O patotipo EHEC tem a capacidade de destruir as células epiteliais, produzir uma citotoxina potente, a toxina Shiga (Stx), que provoca diarreia com ou sem a presença de sangue, síndrome urêmica-hemolítica, é fatal para crianças⁴¹ e pode se originar das aves que são potenciais reservatórios deste patógeno⁴³. Possui como característica de virulência a produção de enterohemolisina Plasmídeo de virulência (60 MDa), produzem citotoxinas SLT-I ou VT-I ou STxI (Verotoxina) e SLT-II ou VT-II ou STxII e sorotipos específicos: O157:H7; O111; O5; O26; O55; O26:H11 e outros^{39, 44, 45}.

O patotipo APEC é considerado um dos principais causadores de morbidade e mortalidade de frangos⁴⁶. Pode atuar como agente primário ou secundário, é incriminada por uma variedade de doenças extra-intestinais, que podem ser infecções localizadas ou generalizadas^{9, 40}. Com as pesquisas a respeito dos inúmeros genes de virulência presentes na APEC, não se pode mais considerá-lo como um patógeno simplesmente oportunista, pois algumas cepas podem causar a doença em animais saudáveis, como é o caso dos isolados relacionadas a síndrome da cabeça inchada que são mais patogênicas e possuem características mais agressivas, incluindo capacidade de se aderir aos diferentes tipos celulares, presença de ampla combinação de genes de virulência e elevada letalidade³².

2.4. Estruturas antigênicas

Escherichia coli é composto de estruturas antigênicas que contribuem para a classificação em vários sorogrupos e sorotipos³⁶. Uma das principais contribuições para a caracterização da *E. coli* foi a sorotipagem, proposto por Kauffman et al.⁴⁷. Esses autores, classificaram os sorotipos de *E. coli* e propuseram que fossem identificadas, tendo-se como base seus principais antígenos de superfície: os antígenos O (somáticos), antígenos K(capsulares), antígenos H (flagelares) e antígenos F (fimbriais).

Os estudos que envolvem as características antigênicas são ferramentas utilizadas na epidemiologia e patogênese da enfermidade. Na literatura são encontrados diferentes números de antígenos conhecidos. De acordo com Yerushalmi et al.⁴⁸ são 177 antígenos O, 100 antígenos K e 56 antígenos flagelares H.

O antígeno somático “O” é um polissacarídeo termoestável (121°C por 2 h) e compõe a membrana externa das bactérias Gram-negativas. Este é constituído por três frações, uma delas é a cadeia de polissacarídeo que se projeta para o espaço extracelular, cuja composição é extremamente variável entre as bactérias da mesma espécie, conhecido como antígeno somático, e determina a existência de vários sorogrupos. A segunda fração é o lipídeo A (endotoxina), componente do LPS, é altamente conservado entre os membros da família *Enterobacteriaceae* e pode ser liberado durante a fase de multiplicação ou após a morte bacteriana e atua na ativação de macrófagos e são mediadores de inflamação. A terceira fração é intermediária e liga covalentemente o lipídeo A ao antígeno somático^{3, 47}.

O antígeno flagelar “H” possui estrutura de natureza protéica e são termolábeis (100°C por 30 min) conhecida como flagelina⁴⁷. Aos antígenos O e H se somam os antígenos capsulares “K” constituído de um ácido polimérico contendo 2% de açúcares reduzidos e o antígeno fimbrial “F”, constituídos de moléculas de natureza protéica³⁶.

E. coli possui vários sorogrupos associados a sua patogenia, os mais prevalentes para aves são O1:K1, O2:K1 e O78:K80^{13, 49}.

2.5. Genes de *Escherichia coli*

Há uma variedade de genes de virulência que estão sendo estudados e foi comprovado que algumas cepas podem causar doença e apresentar virulência padrão⁵⁰. Dentre os principais fatores de virulência associados à APEC destacam-se a expressão de adesinas, a produção de sideróforos e a capacidade de resistir à ação microbicida do soro. Os fatores que

apresentam maior correlação com a virulência são a capacidade de sequestrar o íon ferro na corrente sanguínea e nos tecidos das aves e a resistência dos componentes do sistema complemento. Estes dois fatores contribuem para a sobrevivência e a evolução da doença após a invasão da bactéria^{3, 20, 51, 52}. Amostras de *E. coli* de origem aviária usualmente sequestram o ferro através da produção de aerobactina⁵³.

Acredita-se que algumas cepas da maior parte dos sorogrupos de *E. coli*, durante o processo evolutivo, adquiram diferentes combinações de genes que lhes atribuem capacidade de promover enfermidade³⁵. Embora a virulência bacteriana seja um fenômeno multifatorial, o emprego de *E. coli* comensal como um indicador bacteriano é importante e pode servir como um “sistema de alerta” para o aparecimento de resistência e virulência em bactérias potencialmente patogênicas, devido mudanças na resistência ou a aquisição de fatores de virulência associada nesse patógeno⁹.

Além disso, a identificação de genes de virulência associados em *E. coli* comensal e do ambiente pode ser usada como indicador do risco potencial que tais novos reservatórios de linhagens patogênicas representam para humanos e animais e para identificar surtos de *E. coli* patogênicas em aves (APEC) de interesses comerciais⁵⁴⁻⁵⁶. As manifestações de doenças por *E. coli*, são associadas a diversos fatores, no qual destaca-se os genes de virulência codificados por plasmídeos, bacteriófagos ou ilhas de patogenicidade (IP)⁵⁷, mas nenhum gene de virulência específico tem sido identificado como sendo inteiramente responsável pela patogenicidade de APEC⁸.

O gene de virulência *sfa* codifica fímbrias D+ manose resistentes na mediação de adesão da *E. coli* para diferentes tecidos do hospedeiro. A presença dos genes de *sfa* varia entre estirpes associadas a diferentes doenças, sendo comumente isolados de onfalites, sugerindo assim, que esses genes possibilitam infecções extra-intestinais em diferentes locais⁴⁶.

O gene *hly* (alfa hemolisina), além de lesionar as células hospedeiras, suprime a produção de citocinas e interleucinas pela célula eucariótica, permitindo que a bactéria se estabeleça no organismo hospedeiro. Cepas que não possuem genes que promovem hemólise consequentemente não apresentam citotoxicidade elevada e não são capazes de suprimir citocinas, dificultando assim sua colonização no hospedeiro⁵⁸.

Trat é uma proteína de superfície, codificadas pelos plasmídeos conjugativos, que possui o gene *traT*³⁸, desempenha um papel de resistência sérica, efeitos bactericidas do sistema complemento e à fagocitose, comumente relacionados a cepas septicêmicas e seus

produtos podem bloquear o funcionamento do complexo de ataque terminal ao invés de sua formação^{57, 59}.

Dentre os mecanismos de virulência encontrados em APEC, a resistência aos efeitos bactericidas do soro, mediada pelo gene *iss*, apresenta-se como um relevante mecanismo, apesar de não ser o único mecanismo utilizado por essas bactérias para alcançar os órgãos internos das aves e causar uma infecção⁶⁰, este gene está localizado no plasmídeo CoIV (aproximadamente 100 kilobases), juntamente com outros genes de virulência e resistência a antimicrobianos e pode ser transferido, por conjugação, para outras bactérias avirulentas, inclusive *E. coli*, assim bactérias comensais podem se tornar mais resistentes e patogênicas⁶¹.

A capacidade de *E. coli* em resistir aos efeitos bactericidas do sistema complemento no soro do hospedeiro, é mediada por estruturas da superfície bacteriana como cápsula, lipopolissacarídeos, produção de colicina V (CoIV) e proteínas da membrana externa que são associados à patogenicidade de APEC²².

Além disso, a ação dos genes que promovem a resistência sérica está diretamente relacionada a mecanismos de resistência aos antimicrobianos utilizados na terapêutica de doenças. Aliado a isso, a preocupação atual se deve ao crescente aparecimento de cepas resistentes a estes medicamentos⁶².

São poucos os trabalhos realizados no Brasil sobre a epidemiologia, distribuição de genes de virulência entre os isolados de *E. coli*, o que restringe o emprego do controle epidemiológico e medidas de prevenção, ao contrário de alguns outros países, principalmente os considerados de primeiro mundo, que as informações epidemiológicas de APEC e possibilidade de transmissão de isolados clínicos de *E. coli* são bem documentadas⁶³.

As informações sobre a epidemiologia das APECs e a possibilidade de transmissão dos isolados clínicos de *E. coli* assim como a distribuição dos genes de virulência entre as amostras se constituem importantes ferramentas epidemiológicas⁵⁴, assim como uma grande diversidade de patotipos de *E. coli* com genes comuns é encontrada em humanos e outros mamíferos sendo possível constantemente novas combinações emergentes, representando um risco zoonótico^{54, 64}.

REFERÊNCIAS

1. Minharro S, Linhares GFC, Andrade MA, Rocha PT, Santana ÂP. Envolvimento de *Escherichia coli*, de *Mycoplasma gallisepticum* e de *Mycoplasma synoviae* em lesões de sacos aéreos em frangos abatidos no Estado de Goiás. *Ciência Animal Brasileira*. 2006;2(2):111-7.
2. Sesterhenn R, Ferreira, TZ, Kindlein L. "Perdas econômicas das principais causas de condenações de carcaças de frangos de corte em Matadouros-Frigoríficos sob Inspeção Federal no Rio Grande do Sul, Brasil." *Acta Scientiae Veterinariae*. 2012; 40(1): 1021.
3. Ferreira AJP, Knöbl T. Colibacilose. IN: Junior AB, Silva EM, Fábio JD, Sesti L, Zuanaze M A. Doença das aves. 2a ed. Campinas: Fundação Apinco, 2009. p.457-471. [acesso 12 mar 2016].
4. Revolledo LIR. Colibacilose. In: Revolledo L, Ferreira AJP. *Patologia Aviária*. Barueri-SP: Manoele, 2009. p. 67-74.
5. Kahn RE, Morozov I, Feldmann H, Richt JA. 6th International Conference on Emerging Zoonoses. *Zoonoses and public health*. 2012;59(s2):2-31.
6. Johnson TJ, Wannemuehler Y, Doetkott C, Johnson SJ, Rosenberger SC, Nolan LK. Identification of minimal predictors of avian pathogenic *Escherichia coli* virulence for use as a rapid diagnostic tool. *Journal Clinical Microbiology*. 2008;46(12):3987-96.
7. Saviolli JY. Pesquisa e caracterização de *Escherichia coli* patogênica (*E. coli* produtora de toxina Shiga – STEC; *E. coli* aviária patogênica - APEC) de fragatas (*Fregata magnificens*) da Costa do Estado de São Paulo. [Dissertação]. Universidade de São Paulo; 2010. [acesso 15 abr 2016].
8. Antao EM, Glodde S, Li G, Sharifi R, Homeier T, Laturus C, et al. The chicken as a natural model for extraintestinal infections caused by avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Microbiology Pathology*. 2008;45(5-6):361-9.
9. Barnes HJ, Vaillancourt J, Gross WB. Colibacillosis. IN: Saif YM. *Diseases of poultry*. 11a ed. Ames, Iowa: Iowa State Press, 2003; p. 631-656.
10. Knöbl T, Gomes TAT, Vieira MAA, Bottino JA, Ferreira AJP. Occurrence of adhesin-encoding operons in *Escherichia coli* isolated from breeders with salpingitis and chicks with omphalitis. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2006; p. 140-3.
11. Ferreira AJP, Knöbl T. Colibacilose Aviária. In: Berchieri Júnior A, Macari M. *Doenças das Aves*. Campinas: Facta. 2000; p.197-205.
12. Moulin-Schouleur M, Répérant M, Laurent S, Brée A, Mignon-Grasteau S, Germon P, et al. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains of avian and human origin: link between phylogenetic relationships and common virulence patterns. *Journal Clinical Microbiology*. 2007;45(10):3366-76.

13. Dziva F, Stevens MP. Colibacillosis in poultry: unravelling the molecular basis of virulence of avian pathogenic *Escherichia coli* in their natural hosts. *Avian Pathology*. 2008;37(4):355-66.
14. 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 Bacteriology Virology*. 2008;38(4):179-88.
15. Schouler C, Schaeffer B, Bree A, Mora A, Dahbi G, Biet F, et al. Diagnostic strategy for identifying avian pathogenic *Escherichia coli* based on four patterns of virulence genes. *Journal Clinical Microbiology*. 2012;50(5):1673-8.
16. Gross WB. *Escherichia coli* in domestic animals and man. IN: Gyles CL. Diseases due to *Escherichia coli* in poultry. 1994; p. 237-9.
17. Claudie Bonnet, Fatoumata Diarrassouba, Roland Brousseau, Luke Masson, Edward Topp, Diarra MS. Pathotype and Antibiotic Resistance Gene Distributions of *Escherichia coli* isolated from Broiler Chickens Raised on Antimicrobial-Supplemented diets. 2009; p. 6955-62.
18. Andrade CL. Histopatologia e Identificação de *E. Coli* como agente causal da celulite aviária em frangos de corte. Niterói. [Dissertação] Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal Fluminense, 2005. [acesso 14 abr 2016].
19. Santos BM, Abreu TGM, Lima AS, Souza SH, Pinto PSA. Ocorrência de Surto de Salpingite em Fêmeas de Frango de Corte com Imunodepressão. In *Anais... Congresso Brasileiro de Veterinária*; 2008; Gramado RS; Brasil. [acesso 22 jan 2016].
20. Ferreira AJP, Knöbl T. Colibacilose. IN: Junior AB, Silva EM, Fábio JD, Sesti L. Doença das aves. 2ª ed. Campinas: Fundação Apinco. 2009; p. 457-471.
21. Bordin EL. Diagnostico post-mortem em avicultura coleta de material e tratamento. Sao Paulo: Nobel; 1981.
22. Dho-Moulin M, Fairbrother JM. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Brazilian Journal of Veterinary Research*. 1999;30(2-3):299-316.
23. Fossum O, Jansson DS, Etterlin PE, Vagsholm I. Causes of mortality in laying hens in different housing systems in 2001 to 2004. *Acta Vet Scand*. 2009;51:3.
24. De Sales S, Pinheiro REE, Rodrigues AMD, Júnior MHK, Gomes, IJ. "Condenações não patológicas de carcaças de frangos em um matadouro-frigorífico sob inspeção federal no estado do Piauí." *Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal* 10.1. 2016; p. 68-77.
25. Cravener TL, Roush WB, Mashaly MM. Broiler production under varying population densities. *Poultry of Science*. 1992;71(3):427-33.
26. Martrenchar A, Morisse JP, Huonnic D, Cotte JP. Influence of stocking density on some behavioural, physiological and productivity traits of broilers. *Brazilian Journal of Veterinary Research*. 1997;28(5):473-80.

27. Fallavena LCB. Lesões cutâneas em frangos de corte: Causas, Diagnóstico e controle. In: Conferência Apinco 2001 de Ciência e Tecnologia. Anais... Apinco. 2001; p. 205-16.
28. Aristides et al. LGA, Dognani R, Lopes CF, L.G.S. S, Shimokomaki M. Diagnósticos de condenações que afetam a produtividade da carne de frangos brasileira. Revista nacional da carne. 2007; p. 22-8.
29. Oliveira AA, Andrade MA, Armendaris PM, Bueno PHS. Principais causas de condenação ao abate de aves em matadouros frigoríficos registrados no serviço brasileiro de inspeção federal entre 2006 e 2011. 2016. [acesso 24 fev 2016].
30. Sesterhenn R, Tramontini D, Argenta F, Pianta C, Esmeraldino A, Fallavena L. Lesões ulcerativas cutâneas em frangos de corte—diagnóstico histopatológico. Revista de iniciação científica da ULBRA. 2013;1(9).
31. Pianho CR, Bassani CA, De JML, Leonardo O, Marin DF, Bassani PG. Principais causas de condenação de origem patológica em abatedouro de aves na região Noroeste do Paraná. 42º Congresso Bras. de Medicina Veterinária e 1º Congresso Sul-Brasileiro da ANCLIVEPA; 2015; Curitiba; Brasil. Disponível em: http://www.infoteca.inf.br/conbravet/smarty/templates/arquivos_template/upload_arquivos/acervo/124.pdf; 2015. [acesso 24 mar 2016].
32. Maturana VG, de Pace F, Carlos C, Mistretta Pires M, Amabile de Campos T, Nakazato G, et al. Subpathotypes of Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC) Exist as Defined by their Syndromes and Virulence Traits. Open Microbiology Journal. 2011;5(Suppl 1):55-64.
33. Koneman, E. W., Allen, S. D., Janda, W. M., Schreckenberger, P. C., & Winn Jr, W. C. (2001). Diagnóstico Microbiológico—Texto e Atlas Colorido,. 5ª MEDSI. Rio de Janeiro, RJ, 141-147. 1760 p.
34. Ron EZ. Host specificity of septicemic *Escherichia coli*: human and avian pathogens. Curr Opin Microbiology Journal. 2006;9(1):28-32.
35. Chernaki-Leffer AM, Biesdorf SM, Almeida LM, Leffer EVB, Vigne F. Isolamento de enterobactérias em *Alphitobius diaperinus* e na cama de aviários no oeste do estado do Paraná, Brasil. Revista Brasileira de Ciência Avícola. 2002;4:243-7.
36. Trabulsi, L. R., J. G. Ordoñez, and M. B. Martinez. "Enterobacteriaceae". Microbiologia. Atheneu. 2005; p. 269-276.
37. Silva IMM, Evêncio-Neto J, Silva RM, Lucena-Silva N, Magalhães J, M. B. Genotypically characterization of *Escherichia coli* isolates from poultry. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (online). 2011;63(2).
38. Kariyawasam S, Johnson TJ, Nolan LK. Unique DNA sequences of avian pathogenic *Escherichia coli* isolates as determined by genomic suppression subtractive hybridization. FEMS Microbiology Letter Journal. 2006;262(2):193-200.
39. Croxen MA, Finlay BB. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. Nature Reviews Microbiology. 2010;8(1):26-38.

40. Oliveira ES. Classificação filogenética e caracterização genotípica dos isolados de *Escherichia coli* patogênica aviária (APEC) provenientes de galinhas caipiras In: Cardoso MV, Montassier MFS., Borzi MM, Avila FA. *Ars Veterinária*. 2015; 31(2). Disponível em: <http://arsveterinaria.org.br/index.php/ars/article/view/876>. [acesso 27 abr 2016].
41. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*. 2004;2(2):123-40.
42. Rodriguez-Siek KE, Giddings CW, Doetkott C, Johnson TJ, Fakhr MK, Nolan LK. Comparison of *Escherichia coli* isolates implicated in human urinary tract infection and avian colibacillosis. *Microbiology*. 2005;151(Pt 6):2097-110.
43. Lee GY, Jang HI, Hwang IG, Rhee MS. Prevalence and classification of pathogenic *Escherichia coli* isolated from fresh beef, poultry, and pork in Korea. *Int J Food Microbiology*. 2009;134(3):196-200.
44. Rocha ACGP, Rocha SLS, Lima-Rosa CAV, Souza GF, Moraes HLS, Salle FO, et al. Genes associated with pathogenicity of avian *Escherichia coli* (APEC) isolated from respiratory cases of poultry. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 2008;28:183-6.
45. Silva IMM, Evêncio-Neto J, Silva RM, 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*. 2011;63:333-9.
46. Knöbl T, Gomes TAT, Vieira MAM, Bottino AJA, Ferreira AJPF. Detection of pap, sfa, afa and fim adhesin-encoding operons in avian pathogenic *Escherichia coli*. *International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine*. 2004; p. 135-41.
47. Kauffmann F. The serology of the *E. coli* group. *Journal Immunology*. 1947;57(1):71-100.
48. Yerushalmi Z, Smorodinsky NI, Naveh MW, Ron EZ. Adherence pili of avian strains of *Escherichia coli* O78. *Infect Immunology*. 1990;58(4):1129-31.
49. Dias da Silveira W, Ferreira A, Brocchi M, Maria de Hollanda L, Pestana de Castro AF, Tatsumi Yamada A, et al. Biological characteristics and pathogenicity of avian *Escherichia coli* strains. *Veterinary Microbiology*. 2002;85(1):47-53.
50. André AB, Saidenberg LA, Claudete CS, Antônio JP Ferreira MAA. Some virulence genes of *Escherichia coli* isolated from cloacal swabs of healthy Alagoas Curassows (*Pauxi mitu*) in Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 2013; p. 523-7.
51. Berchieri Junior A, Macari M. Doenças das aves. In: Ferreira AJP, Knöbl T. *Colibacilose*. 2ª ed. Campinas: Fundação Apinco. 2009.
52. Reis RS. Abordagem proteômica da interação bactéria-hospedeiro na colibacilose aviária. [Dissertação]. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2011. [acesso 4 jun 2016].
53. Monroy MA, Knobl T, Bottino JA, Ferreira CS, Ferreira AJ. Virulence characteristics of *Escherichia coli* isolates obtained from broiler breeders with salpingitis. *Comp Immunology Microbiology Infect Dis*. 2005;28(1):1-15.

54. Ikuno AA, Guastalli EAL, Buim MR, Gama NMAQ, França SB, Alonso AC et al. 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. ed. *Biológico*, São Paulo. 2006;(68):68-72.
55. Adiri RS, Gophna U, Ron EZ. Multilocus sequence typing (MLST) of *Escherichia coli* O78 strains. *FEMS Microbiology Letters*. 2003;222(2):199-203.
56. Yang H, Chen S, White DG, Zhao S, McDermott P, Walker R, et al. Characterization of multiple-antimicrobial-resistant *Escherichia coli* isolates from diseased chickens and swine in China. *Journal of clinical microbiology*. 2004;42(8):3483-9.
57. Gyles CL, Fairbrother JM. *Escherichia coli*. 4 th ed. Gyles GL, Prescott JF, Songer G, Thoen CO. 2010.
58. Hilbert DW, Paulish-Miller TE, Tan CK, Carey AJ, Ulett GC, Mordechai E, et al. Clinical *Escherichia coli* isolates utilize alpha-hemolysin to inhibit in vitro epithelial cytokine production. *Microbes Infection*. 2012;14(7-8):628-38.
59. Binns MM, Mayden J, Levine RP. Further characterization of complement resistance conferred on *Escherichia coli* by the plasmid genes *traT* of R100 and *iss* of CoIV,I-K94. *Infection and Immunity*. 1982;35(2):654-9.
60. Mellata M, Dho-Moulin M, Dozois CM, Curtiss Iii R, Brown PK, Arné P, et al. Role of virulence factors in resistance of avian pathogenic *Escherichia coli* to serum and in pathogenicity. *Infection and immunity*. 2003;71(1):536-40.
61. Johnson TJ, Siek KE, Johnson SJ, Nolan LK. DNA sequence of a CoIV plasmid and prevalence of selected plasmid-encoded virulence genes among avian *Escherichia coli* strains. *Journal of bacteriology*. 2006;188(2):745-58.
62. Cardoso A, Tessari ENC, Castro AGM, Zanatta GF. Avaliação da susceptibilidade a antimicrobianos de cepas de *Escherichia coli* de origem aviária. *Arquivos do Instituto Biológico (Sao Paulo)*. 2002;69:1-5.
63. Ikuno A. A. GEAL, Buim M.R., Gama N.M.S.Q., França S.B., AAC, 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. São Paulo: *Biológico*; 2006. p. 68-72.
64. Russo TA, Johnson JR. Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: focus on an increasingly important endemic problem. *Microbes Infect*. 2003;5(5):449-56.

CAPÍTULO 2 – GENES DE VIRULÊNCIA EM ISOLADOS DE *ESCHERICHIA COLI* DE SALPINGITE EM POEDEIRAS AO ABATE

RESUMO: *Escherichia coli*, patógeno de importância para a avicultura, seja como agente primário ou secundário possui fatores de virulência que estão associados à infecções extra intestinais. O presente estudo foi proposto com os objetivos de investigar a presença dos genes *sfa*, *hly*, *traT* e *iss* e a determinar os sorogrupos *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), e sorotipos *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) O157:H7, *E. coli* O167 e O128 em amostras de ovidutos com e sem lesões em poedeiras de descarte ao abate. Para tanto, foram coletadas 240 amostras de oviduto de 15 lotes, sendo 120 de lesões e 120 sem lesões indicativas de salpingite. *E. coli* foi identificada por bacteriologia em 28,7% (69/240), 32,5% (39/120) em salpingite e 25% (30/120) em oviduto aparentemente sem lesões. Os genes foram investigados por reação de cadeia em polimerase (PCR), *sfa* e *hly* estiveram ausentes nas amostras analisadas e os genes *traT* e *iss* foram detectados em 59,4% (41/69) e 84% (58/69) respectivamente, porém o gene *iss* foi capaz de influenciar no aparecimento de salpingite. Diante a análise sorológica para os patótipos, as amostras obtiveram tanto para isolado com quanto sem lesões 21,7% para EPEC e 3% para EHEC O157:H7, enquanto que para EIEC, *E. coli* O168 e *E. coli* O167 não obtiveram frequência considerável diante a amostra apresentada. Conclui-se que *E. coli* está presente em oviduto de poedeiras comerciais e que isolados que contêm os genes *iss* e *traT* associados determinam o aparecimento de salpingite e está associado em maior frequência a presença do sorogrupo EPEC. O sorotipo O157:H7 foi identificado, assim como O167 os quais representam potencial risco à saúde pública.

Palavras-chave: colibacilose, lesões, patótipos, reação de cadeia em polimerase.

CHAPTER 2 - *ESCHERICHIA COLI* VIRULENCE GENE ISOLATED FROM LAYING SAPIINGITIS OF SLAUGHTER

ABSTRACT: *Escherichia coli*, important pathogen for poultry production either as a primary or a secondary agent, has virulence factors that are associated with extra intestinal infections. The purpose of this study were to investigate the presence of the *E. coli* genes *sfa*, *hly*, *traT*, and *iss* and determine the serogroups enteropathogenic *E. coli* (EPEC), enteroinvasive *E. coli* (EIEC), and the serotypes *E. coli* O157:H7, *E. coli* O128, and *E. coli* O167 O128 in samples of oviducts with and without injuries from cull laying hens at slaughter. Therefore, we collected 240 oviduct samples from 15 lots, 120 with injuries and 120 without injuries indicative of salpingitis. *E. coli* was identified by bacteriology in 28.7% (69/240), 32.5% (39/120) in salpingitis, and 25% (30/120) in apparently unharmed oviducts. The genes were investigated by polymerase chain reaction (PCR); *sfa* and *hly* were absent from the analyzed samples and *traT* genes and *iss* were detected in 59.4% (41/69) and 84% (58/69) of the samples, respectively; however, *iss* gene was able to influence the appearance of salpingitis. Regarding the serological analysis for the pathotype, the samples revealed, for either with and without lesions, 21.7% EPEC, 3% EHEC O157:H7, while EIEC, *E. coli* O168, and *E. coli* O167 did not present relevant frequency. We conclude that *E. coli* is present in the oviduct of laying hens, and the isolates that contain *iss* and *traT* genes associated determine the appearance of salpingitis and are associated most often to the presence of EPEC

serogroup. The serotypes O157:H7 O167 were identified, which represent potential risk to public health.

Keywords: colibacillosis, lesions, pathotypes, polymerase chain reaction.

1. INTRODUÇÃO

A salpingite se caracteriza por um processo inflamatório subagudo supurativo no oviduto que pode resultar na formação de massa caseosa. A ave acometida pode vir a óbito ou sobreviver e a lesão ser identificada pela inspeção ao abate¹. De acordo com a Instrução Normativa (IN) nº 210 de 10/11/1998 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento², aves com salpingite podem ter condenação parcial ou total se houver evidência de caráter sistêmico da infecção.

A salpingite raramente ocorre em aves antes da maturidade sexual, pois parece estar associada aos níveis hormonais que aumentam nas galinhas em produção³. O estrógeno promove hipertrofia do tecido uterino, com aumento da secreção glandular, favorecendo a ocorrência de infecções por *E. coli* principalmente via ascendente, ou ainda pela proximidade do oviduto com as membranas dos sacos aéreos abdominal esquerdo infectados por *E. coli*^{1,4}.

A severidade da infecção é dependente de diversos fatores, e em parte, dependem da patogenicidade da cepa de *E. coli* que contenha genes de virulência⁵, os quais são fundamentais para o desenvolvimento do quadro de salpingite como a expressão de adesinas, a produção de sideróforos e a capacidade de resistir a ação microbicida do soro⁶.

A adesão da bactéria à superfície celular é a primeira etapa para a instalação de um processo infeccioso. As bactérias patogênicas são capazes de aderir às células quando possuem uma estrutura de superfície específica, denominada “pili” ou “fimbria”^{7, 8}.

Amostras de *E. coli* portadoras de pili tipo 1, por exemplo o gene *sfa*, podem favorecer o aparecimento de infecções por via ascendente, através da influência na colonização do epitélio cloacal e do trato urinário em mamíferos⁴.

Em isolados de *E. coli* podem existir duas formas de sideróforos: a enterobactina, que possibilita o desenvolvimento de *E. coli* em baixas concentrações de ferro⁹ e a aerobactina que na forma hidroxamato é o mais eficiente sistema de transporte

de ferro, usado pela enterobactéria para se suprir desse elemento¹⁰, os quais foram detectados em 63% dos quadros de salpingite¹¹.

A resistência das bactérias aos efeitos bactericidas do sistema complemento do soro do hospedeiro tem sido associada com a capacidade da *E. coli* resistir ao sistema imune do hospedeiro, produzindo infecções generalizadas em frangos e infecções extra-intestinais em outras espécies^{12, 13}.

Nestas funções de aderência e invasão, produção de sideróforos e resistência sérica, foram pesquisados o gene *traT* relacionado a uma proteína de superfície de exclusão, codificada via plasmídeos conjugativos¹⁴; ao gene *hly* que codifica alfa hemolisina que além de lesionar as células hospedeiras, suprime a produção de citocinas e interleucinas pela célula eucariótica, permitindo que a bactéria se estabeleça no organismo hospedeiro¹⁵; o gene *sfa* relacionado à fímbria D+ manose resistentes na mediação de adesão da *E. coli* para diferentes tecidos do hospedeiro¹⁶ e o gene *iss* codificado por um plasmídeo que apresenta a resistência aos efeitos bactericidas do soro¹⁷, além disso, a ação desse gene está diretamente relacionados ao mecanismo de resistência aos antimicrobianos utilizados na terapêutica de doenças, o que torna-se um fator muito importante¹⁸.

Adicionalmente estudou-se outros patótipos, além de APEC, como *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) e *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) que são responsáveis por processos importantes, provocando distúrbios no organismo tanto de animais quanto de humanos^{4, 19} e pode se originar das aves que são potenciais reservatórios deste patógeno²⁰. As informações obtidas na avaliação destes sorogrupos constituem importantes ferramentas epidemiológicas e vêm resultando no maior entendimento dos mecanismos de patogenicidade da bactéria, podem proporcionar um conhecimento mais completo das propriedades biológicas dessa bactéria, assim como sua capacidade de invadir, colonizar e se replicar em seu hospedeiro natural²¹.

Por estas razões, o presente estudo foi desenvolvido com os objetivos de isolar e identificar *E. coli*, detectar os genes *sfa*, *hly*, *traT* e *iss* dos isolados de *E. coli* pela PCR de estirpes isoladas de oviduto de poederias comerciais, além de pesquisar os sorogrupos EPEC, EIEC, EHEC O157:H7, *E. coli* O167 e *E. coli* O128.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Local

O experimento foi conduzido no Laboratório de Bacteriologia e Biologia Molecular do Departamento de Medicina Veterinária da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás.

2.2. Amostragem

Foram coletadas em um matadouro frigorífico com serviço de inspeção Estadual, 240 amostras provenientes de 15 lotes de poedeiras comerciais, provenientes de cinco granjas, de quatro municípios do Estado de Goiás, no período de janeiro a novembro de 2015. Foram coletados cerca de 2 g de fragmentos do oviduto, sendo oito amostras de oviduto com lesões e oito sem lesões macroscópicas, num total de 16 amostras de cada lote.

2.3. Análise bacteriológica

Imediatamente após a coleta cada amostra foi identificada e colocada em bolsa coletora com 18 mL de água peptonada a 1%, acondicionadas em caixa térmica com gelo e transportadas ao laboratório. No laboratório as amostras foram processadas com modificações de acordo com Oliveira et al. ²². As bolsas coletoras contendo as amostras foram incubadas a 37°C por 24h. E 1 mL desta solução para 9 mL de caldo Brain Heart Infusion Broth (BHI), e então novamente incubados a 37°C/24h. Após este período com o auxílio de uma alça de níquel cromo, alíquotas foram plaqueadas por esgotamento para o ágar MacConkey e imediatamente incubados a 37°C/24h. Passado este período observou-se o aspecto macroscópico das colônias com atenção as lactoses positivas (Lc+) e negativas (Lc-). Três unidades formadoras de colônias (UFC), com características morfológicas descritiva acima foram repicadas em ágar triplice ferro (TSI). Os tubos de TSI com crescimento característico de *E. coli*, foram submetidos a provas bioquímicas: uréia, indol, vermelho de metila, citrato, malonato, glicose, lactose para confirmação da bactéria. Os isolados de *E. coli* foram estocados em ágar nutriente e mantidos a temperatura ambiente para posterior extração de DNA, realização da pesquisa dos genes de virulência e sorologia.

2.4. Extração de DNA dos isolados de *E. coli*

Para detecção dos genes (*sfa*, *hly*, *traT* e *iss*) foi utilizado a técnica de extração térmica, assim 1,0 mL da suspensão da cultura bacteriana em caldo BHI por 24h a 37°C foi coletado e centrifugado por 5 min a 29220 G (13.200 rpm) em centrífuga eppendorf centrifuge 5810. O sobrenadante foi descartado, e 800 µL de água miliQ adicionados. Após homogeneização, as amostras foram submetidas a uma nova centrifugação nas mesmas condições mencionadas anteriormente. O sobrenadante descartado, e 80 µL de água miliQ adicionada. Após essa etapa, as amostras foram submetidas a temperatura de 96°C por 10 minutos. O sobrenadante foi removido e mantido congelado em tubos de polipropileno a -20°C até o momento da análise²³.

2.5. Técnica de PCR para detecção dos genes de virulência

Para a realização da PCR foi estabelecido o volume de 50 µL para o mix de reação, composto por 34,75 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); 1 µL de dNTP [dCTP, dATP, dGTP, dTTP] a 10 mM (Amersham Biosciences, concentração final de 0,2 mM); 1 µl a 10 µM (concentração final de 0,1 µM) do iniciador sense, 1 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 (50 a 200 ng).

Para as reações dos diferentes genes de virulência foram empregados pares de oligonucleotídeos para *sfa*²⁴, *hly*²⁵, *traT*²⁵ e *iss*²⁶. As quais as sequências dos iniciadores estão descritas no Quadro 1. Os controles positivos usados neste trabalho foram doados da coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia da UNESP-Jaboticabal e do Laboratório de Microbiologia da UFG e foram gentilmente cedidos pela Doutora Marita Vedovelli e Doutora Tereza Knobl da Escola de Veterinária da Universidade de São Paulo (USP). Para o controle negativo o volume referente à amostra foi substituído por água ultrapura (Dnase/Rnase- Free Distilled Water-Invitrogen).

QUADRO 1. Sequência de *primers* avaliados pela técnica de PCR, para amplificação de genes de Virulência de *E. coli*.

Alvo	Sequência de Oligonucleotídeos (5'3')	Tamanho de fragmento amplificado	Ta
<i>sfa</i>	CTCCGGAGAACTGGGTGCATCTTAC CGGAGGAGTAATTACAAACCTGGCA	410 pb	65°C
<i>hlyA</i>	AACAAGGATAAGCACTGTTCTGGCT ACCATATAAGCGGTCATTCCCGTCA	1.177 pb	63°C
<i>traT</i>	GGTGTGGTGCATGAGCACAG CACGGTTCAGCCATCCCTGAG	290 pb	63°C
<i>iss</i>	GTGGCGAAAAGTAGTAAACAGC CGCCTCGGGGTGGATAA	760 pb	49°C

Ta: temperatura de anelamento do par de iniciadores

A amplificação foi realizada em termociclador (*Mastercycler Personal, Eppendorf*) programado de acordo com as referências citadas para cada gene. Para o gene *sfa* o ciclo inicial de 94°C/2 min, seguido de 25 ciclos repetidos de 94°C/2 min, temperatura de anelamento (Ta) por 1 min e 72°C/2 min. Já para os genes *traT* e *hly* o ciclo inicial foi de 95°C/12 min, seguido de 25 ciclos repetidos de 94°C/30s, temperatura de anelamento (Ta) por 30 s, seguido por extensão inicial de 68°C/ 3 min e extensão final a 72°C/ 10 min. Para o gene *iss* utilizou-se uma adaptação da técnica, segundo Rocha²⁷, no qual o ciclo inicial foi de 94°C/2 min, seguido de 35 ciclos repetidos de 94°C/30s, 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.

Em seguida a amplificação, as amostras (10 µL) foram submetidos à eletroforese a 90 volts, durante 60 min, em gel de agarose 1,5 % para o gene *sfa*; 0,8% para o gene *hlyA*, 2% para o gene *traT* e 1,2% para o gene *iss* em tampão tris-borato-EDTA (TBE) 1x (TRIS 1M, Ácido bórico 0,83M; EDTA 20 Mm). Como marcador de massa molecular foi utilizados o DNA Ladder 100 pb (*Invitrogen*) diluído. Em seguida, os géis foram corados por imersão em solução de brometo de etídio (0,6 µg/mL) por 10 min. A visualização foi realizada em aparelho transiluminador de UV (*Electronic UV Transiluminador, Ultra-Lum*), em ambiente escuro onde se fez a documentação fotográfica.

2.6. Testes sorológicos

Para o teste de aglutinação em lâminas fez-se uma suspensão bacteriana na escala 10⁸ de MacFarland sendo 10 µL da suspensão e 10 µL do anti-soro seguindo as

recomendações do fabricante, sendo que as amostras eram testadas primeiramente em 10 µL de solução salina.

Foram utilizados os seguintes soros dos sorogrupos anti *E. coli* O157:H7 (EHEC); anti O26, O55, O111, O119 (EPEC); anti- O28ac, O 29, O136, O144 e O152 (EIEC); para o soro anti *E. coli* O128 do sorogrupo Enteropatogênica e O167 pertencente ao sorogrupo Enterotoxigênico, provenientes da PROBAC® (Brasil).

2.7. Análise estatística

Os resultados foram analisados através da frequência e do teste qui-quadrado por independência e aderência (χ^2) a 5%, empregando-se o software GraphPad Instat 3.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A frequência de *E. coli* isoladas de ovidutos de poedeiras comerciais abatidas seguem na tabela 1.

TABELA 1. Frequência de *E. coli* isoladas de ovidutos de poedeiras comerciais abatidas sob SIE, em 2015.

Oviduto	Amostras (n)	Positivas	Frequência dos positivos (%)
Com Lesão	120	39	32,5 a
Sem Lesão	120	30	25 b
TOTAL	240	69	28,7

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística pelo teste de qui quadrado ($p < 0,05$).

Verifica-se na tabela 1 que a frequência de *E. coli* encontrada no oviduto das poedeiras de descarte foi de 28,7% (69/240). Esta frequência pode ser considerada alta se for relacionada ao sistema de produção. As aves são criadas em gaiolas, onde ocorre acúmulo de excretas ou edificações que provavelmente não se enquadram nas boas práticas de produção no que se referem principalmente aos padrões higiênicos. O acúmulo de excreta propicia a multiplicação de bactérias indesejáveis, como *E. coli* que pela via cloacal ou respiratória podem atingir o oviduto¹, embora o contato entre elas fossem limitado.

Há poucos estudos de salpingite em poedeiras comerciais. Porém, já foi mencionado por pesquisadores a presença de *E. coli* em ovidutos de 10 carcaças de frangos de corte com 45 e 47 dias de idade²⁸.

Verifica-se ainda na tabela 1, que houve diferença ($p < 0,05$) entre a presença de *E. coli* em amostras de oviduto com lesões e em amostras de oviduto sem lesões, 32,5% (39/120) e 25% (30/120), respectivamente. Trabalhos desenvolvidos por Bock et al.²⁹ também encontraram uma elevada frequência de salpingite, provenientes de um alta mortalidade de um plantel de 24.000 matrizes, durante 40 semanas do período de postura, o qual otiveram a produção de ovos severamente afetados.

Verifica-se na Tabela 2 que os genes *sfa* e *hly* não foram detectados nos isolados de *E. coli* em amostras de ovidutos com e sem lesões de poedeiras (0/69), indicando que as lesões observadas estiveram relacionadas a outros fatores ou a outros genes de virulência que não *sfa* e *hly*.

TABELA 2. Frequência dos genes *sfa*, *hly*, *traT* e *iss* em isolados de *E. coli* obtidos de ovidutos com e sem alterações macroscópicas oriundas de poedeiras comerciais.

	<i>sfa</i>	<i>hly</i>	<i>traT</i>		<i>iss</i>		<i>traT</i> + <i>iss</i>	
	n/ N	n/ N	n+*/ N	%	n+*/ N	%	n+*/ N	%
Com Lesão	0/39	0/39	31/39	79,5	32/39	82	29/39	74,3 a
Sem Lesão	0/30	0/30	10/30	33,3	26/30	86,6	11/30	36,6 b
P	0	0		0,0003		0,45		
Total	0/69	0/69	41/69	59,4	58/69	84	40/69	57,9

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

Assim como neste trabalho, outros pesquisadores^{1, 30} não obtiveram positividade para o gene *sfa*, que é relacionado à adesão da *E. coli* para diferentes tecidos do hospedeiro. A presença dos genes de *sfa* varia entre estirpes e estão associadas a diferentes doenças, sendo comumente isolados de onfalites, sugerindo assim, que esses genes possibilitam infecções extra intestinais em diferentes órgãos como o trato urinário¹⁶. Ao contrário dos resultados deste estudo, Mainil et al.³¹ observaram a presença deste gene em isolados a partir do intestino ou locais extra intestinais de bezerras com sinais e/ou lesões clínicas típicas de septicemia ou enterite.

A presença desse gene parece ser mais comum em isolados de ExPEC humana do que de APEC^{32, 33}. Porém em amostras encontradas em aves a presença do pili tipo 1, gene *sfa*, não apresentou capacidade de aderência ao muco e nem possibilitou a colonização do trato reprodutivo de galinhas pela via ascendente⁴.

Verifica-se também na tabela 2 que o gene *hly* (alfa hemolisina) não foi detectado nos isolados de *E. coli* (0/69).

Os resultados deste estudo foram semelhantes aos encontrados por Knobl et al.³⁴, os quais mostraram que os genes de virulência *sfa* e *hly* não foram detectados em amostras de órgãos de aves. Assim como neste estudo, os resultados sugerem que os genes *sfa* e *hly* em isolados de *E. coli* das galinhas não são encontradas com frequência e não foram relacionados aos quadros de salpingites.

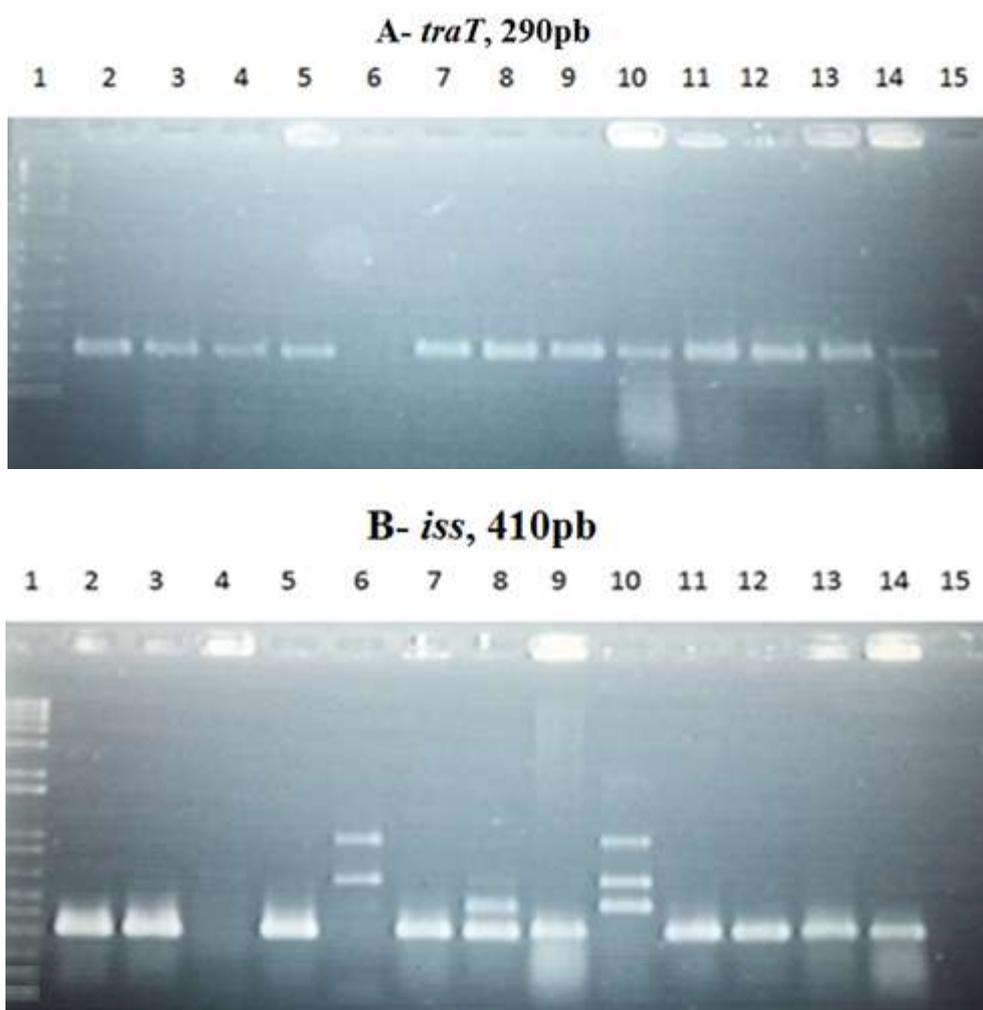


FIGURA 1. Eletroforese da PCR para detecção de genes de virulência de isolados de *E. coli* obtidos de poedeiras localizados de diferentes municípios do estado de Goiás. A- 1: marcador de peso molecular, 2 e 15 controle positivo e negativo, respectivamente, a amostra 6 é negativa para salpingite, as demais amostras são positivas para salpingite com e sem lesão, gel de agarose a 2%; B-1: marcador de peso molecular, 2 e 15 controle positivo e negativo, respectivamente, as amostras 8 e 10 são negativas, as amostras 3,5,7,9,11 a 14 são positivas para salpingite, gel de agarose a 1,2%.

Por outro lado como pode ser observado na tabela 2 os genes *traT* (Figura 1A) e *iss* (Figura 1B) estiveram presentes em 59,4% (41/69) e 84% (58/69), respectivamente, nos isolados de *E. coli* no oviduto com e sem lesões, sem diferença ($p>0,05$) quando se analisa a influência deste gene no aparecimento de salpingite.

A frequência de 59,4% (41/69) são concordantes com os resultados de Ewers et al.³⁵, os quais obtiveram o gene *traT* em 63,1% dos isolados das aves selvagens e em 53,3% dos isolados dos pombos-domésticos, e também com Rodriguez-Siek et al.⁸ que encontraram uma elevada porcentagem (78%) desse gene em isolados de APEC.

O gene *traT*, tem se mostrado de grande importância na patogênese da *E. coli* uma vez que aumenta a resistência bacteriana à ação lítica do complemento, conferindo resistência frente ao soro.

Os dados obtidos neste trabalho para o gene *iss* (tabela 3) 84% (58/69), estão comumente de acordo com os observados na literatura, como para Ikuno et al.³⁶ o qual, o gene *iss* foi detectado em 50% de amostras em isolados de *E. coli* de aves de postura com sintomas clínicos de colibacilose e sem sintomas, amostras de água colhidas de galpões, amostras de casca de ovos e do meio ambiente, e esteve presente em todos isolados independente da origem. Foi encontrada ainda por Kwon et al.⁵ em 100% das amostras de galinhas de incubadoras, superfície de fígados de frangos debilitados e ambiente da incubadora. Abreu³⁷ encontrou 55% deste gene em traquéias de codornas destinadas ao abate e Barros et al.³⁸ encontraram 87,9% do gene *iss* em amostras de lesões de celulite das estirpes APEC. A frequência de isolados positivos para o gene *iss* nos isolados das aves foram semelhantes aos obtidos neste estudos^{8, 30, 36}.

No entanto quando se analisa a relação da presença do gene *traT* e *iss* juntos verifica-se diferença ($p<0,05$) entre os isolados oriundos de amostras com lesões 74,3% (29/39) e 36,6% (11/30) de ovidutos sem lesão, o que permite inferir que a associação do gene *traT* e *iss* (tabela 2) contribuiu para ocorrência das lesões neste órgão. Considerando que estes genes estão presentes em plasmídeos associados com cepas APEC e autores postularam que eles exerçam importante papel na patogenia da colibacilose aviária³⁹, as quais possibilitam *E. coli* invadir os tecidos, acessar à corrente sanguínea e desenvolver em órgãos sistêmicos⁴⁰. O gene *iss* foi citado como o mais prevalente em cepas patogênicas isoladas de aves por Ozawa et al.⁴¹.

Verifica-se na tabela 3 que os resultados dos testes sorológicos frente aos sorogrupos EPEC, EIEC e sorotipos *E.coli* O128, *E.coli* O157:H7 e O167 não se pode observar elevada frequência encontrada nas amostras de salpingite.

TABELA 3. Frequência dos sorogrupos e sorotipos de isolados de *E. coli* de ovidutos com e sem alterações macroscópicas de poedeiras comerciais ao abate, sob SIE no estado de Goiás, em 2015.

Amostras	EPEC (%)	EIEC (%)	O128 (%)	O157:H7 (%)	O167 (%)
Com Lesão	(7/69) 10,1 a	(2/69) 2,9 b	(1/69) 1,5 b	(1/69) 1,5 b	(1/69) 1,5 b
Sem Lesão	(8/69) 11,6	(3/69) 4,3	(1/69) 1,5	(1/69) 1,5	(2/69) 2,9
Total	(15/69) 21,7	(5/69) 7,2	(2/69) 3	(2/69) 3	(3/69) 4,4

Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas utilizando o teste de qui quadrado a 5%.

Verifica-se na tabela 3, que a maior frequência foi para EPEC que contém os sorogrupos anti O26, O55, O111, O119, tanto para amostras com lesão, 10,1% (7/69) quanto para amostras sem lesão, 11,6% (8/69). Este resultado indica que este sorogrupo não é frequentemente encontrado em isolados de *E. coli* de ovidutos de aves e não estão envolvidos em quadros de salpingite.

Observa-se, ainda na tabela 3 que para os sorotipos *E. coli* O128, *E. coli* O167 e o sorogrupo EIEC (anti- O28ac, O29, O136, O144 e O152), não ocorreu diferença ($p > 0,05$) entre as frequências obtidas o que permite sugerir que não estão envolvidos no quadro de salpingites e que estão presentes em baixa frequência em amostras com e sem lesões.

O sorotipo O167 foi identificado em baixa frequência nas amostras com e sem lesões, porém é um sorotipo importante, pois pode contaminar alimentos, os quais podem ser veiculados a cadeia alimentar do homem. De acordo com Souza et al.⁴² *E. coli* O167 é um dos principais sorotipos encontrados em quadros diarreinogênicos em crianças e sugere a importante relação deste sorotipo em produtos obtidos de aves ao abate, ocasionado danos a saúde pública.

Nota-se ainda, na tabela 3 a detecção do sorotipo O157:H7, com uma frequência de 3% (2/69). Este sorotipo pertence ao patotipo *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) que tem a capacidade de destruir células epiteliais e produz uma citotoxina potente, a toxina Shiga (*Stx*). Existem dois grupos de *Stx*, denominados *Stx1* e *Stx2*, pode ser fatal para crianças⁴³. Estes resultados são

semelhantes aos resultados observados por Silva et al.⁴⁴ e Doyle et al.⁴⁵ os quais reportaram 4,6% (8/173) e 1,5% (4/263), respectivamente em amostras provenientes das carcaças de aves abatidas em frigoríficos.

Estes estudos indicam que o patógeno é encontrado em baixa frequência como contaminante de carnes de aves, no entanto produtos oriundos destas aves podem ser uma importante fonte de infecção de *E. coli* O157: H7 e representa potencial risco para a saúde pública.

Em acordo com a estatística, relacionando a associação da presença dos genes *traT* e *iss* nas amostras determinou-se que em salpingite a interação entre *iss+traT* está associado em maior frequência ao sorogrupo EPEC ($p=0,04$), não havendo relação considerável aos demais sorogrupos estudados.

4. CONCLUSÃO

Conclui-se que *E. coli* está presente em amostras de oviduto de poedeiras comerciais com e sem lesões e que isolados que contêm os genes *iss* e *traT* associados determinam o aparecimento de salpingite. Esta associação dos genes nas amostras determinaram maior frequência quando na presença do sorogrupo EPEC. O sorotipo O157:H7 foi identificado, assim como O167 os quais representam potencial risco à saúde pública.

REFERÊNCIAS

1. Knöbl T, Gomes TAT, Vieira MAA, Bottino JA, Ferreira AJP. Occurrence of adhesin-encoding operons in *Escherichia coli* isolated from breeders with salpingitis and chicks with omphalitis. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2006; 37(2):140-3.
2. Brasil. Normativa no 210, de 10 de novembro de 1998. Regulamento Técnico da Inspeção Tecnológica e Higienização Sanitária da Carne de Aves: Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF; 1998.
3. Barnes HJ, Vaillancourt J, Gross WB. Colibacillosis. IN: Saif YM. Diseases of poultry. 11a ed. Ames, Iowa State Press, 2003: 631-656.
4. Berchieri Junior A, Macari M. Doenças das aves. In: Ferreira AJP, Knöbl T. Colibacilose. 2ª ed. Campinas: Fundação Apinco. 2009.
5. Kwon SG, Cha SY, Choi EJ, Kim B, Song HJ, Jang HK. Epidemiological Prevalence of Avian Pathogenic *Escherichia coli* Differentiated by Multiplex PCR from Commercial Chickens and Hatchery in Korea. *Journal Bacteriology Virology*. 2008;38(4):179-88.
6. Barcelos AS. Avaliação macroscópica, histopatológica e bacteriológica de fígados de frangos (*Gallus gallus*) condenados no abate pela inspeção sanitária. [Dissertação]. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria. 2005. [acesso 26 jun 2016].
7. Barnes, HJ, Vaillancourt JP and Gross WB. Colibacillosis. *Diseases of poultry*. 2003; 12: 691-732.
8. Rodriguez-Siek KE, Giddings CW, Doetkott C, Johnson TJ, Nolan LK. Characterizing the APEC pathotype. *Brazilian Journal of Veterinary Research*. 2005;36(2):241-56.
9. Monroy MA, Knobl T, Bottino JA, Ferreira CS, Ferreira AJ. Virulence characteristics of *Escherichia coli* isolates obtained from broiler breeders with salpingitis. *Comp Immunology Microbiology Infection Dis*. 2005;28(1):1-15.
10. Montgomery RD, Boyle CR, Lenarduzzi TA, Jones LS. Consequences to chicks hatched from *Escherichia coli*-inoculated embryos. *Avian Disease*. 1999;43(3):553-63.
11. Johnson JR. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Clinical Microbiology Reviews*. 1991;4(1):80-128.
12. Allan B. Cellulitis: Its Microbiology. In: Proc. 22nd Annual Poultry Service Industry Workshop, Alberta, Canada. 1997. p. 1-5. [acesso 26 abr 2016].

13. Ngeleka M, Kwaga JK, White DG, Whittam TS, Riddell C, Goodhope R, et al. *Escherichia coli* cellulitis in broiler chickens: clonal relationships among strains and analysis of virulence-associated factors of isolates from diseased birds. *Infection Immunology*. 1996;64(8):3118-26.
14. Kariyawasam S, Johnson TJ, Nolan LK. Unique DNA sequences of avian pathogenic *Escherichia coli* isolates as determined by genomic suppression subtractive hybridization. *FEMS Microbiology Letters*. 2006;262(2):193-200.
15. Hilbert DW, Paulish-Miller TE, Tan CK, Carey AJ, Ulett GC, Mordechai E, et al. Clinical *Escherichia coli* isolates utilize alpha-hemolysin to inhibit in vitro epithelial cytokine production. *Microbes and Infection*. 2012;14(7):628-38.
16. Knöbl T, Gomes TAT, Vieira MAM, Bottino AJA, Ferreira AJPF. Detection of pap, sfa, afa and fim adhesin-encoding operons in avian pathogenic *Escherichia coli*. *International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine*. 2004;2: 135-41.
17. Dho-Moulin M, Fairbrother JM. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Brazilian Journal of Veterinary Research*. 1999;30(2-3):299-316.
18. Cardoso A, Tessari ENC, Castro AGM, Zanatta GF. Avaliação da susceptibilidade a antimicrobianos de cepas de *Escherichia coli* de origem aviária. *Arquivo do Instituto Biológico (Sao Paulo)*. 2002;69:1-5.
19. Minagawa CY. Estudo microbiológico fecal de linhagens de camundongos, de estirpes de *E. coli* e do meio ambiente em biotérios. 2007. [Tese]. Universidade de São Paulo. [acesso 4 maio 2016].
20. Lee GY, Jang HI, Hwang IG, Rhee MS. Prevalence and classification of pathogenic *Escherichia coli* isolated from fresh beef, poultry, and pork in Korea. *Internacional Journal Food Microbiology*. 2009;134(3):196-200.
21. Guastalli EAL. Estudo dos fatores de virulência, sorogrupos, patogenicidade e susceptibilidade antimicrobiana das cepas de *Escherichia coli* isoladas de pintainhas de reposição de postura. 2010. [Dissertação]. Universidade Estadual de São Paulo. [acesso 27 maio 2016].
22. Oliveira SJ. Guia bacteriológico prático. Ulbra-Canoas; 2012. 260 p.
23. Silva IMM, Evêncio-Neto J, Silva RM, Lucena-Silva N, Magalhães J, M. B. Genotypically characterization of *Escherichia coli* isolates from poultry. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (online)*. 2011;63(2).
24. Le Bouguenec C, Archambaud M, Labigne A. Rapid and specific detection of the pap, afa, and sfa adhesin-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains by polymerase chain reaction. *Journal Clinical Microbiology*. 1992;30(5):1189-93.
25. Johnson JR, Stell AL. Extended Virulence Genotypes of *Escherichia coli* Strains from Patients with Urosepsis in Relation to Phylogeny and Host Compromise. *Journal of Infectious Diseases*. 2000;181(1):261-72.

26. Horne SM, Pfaff-McDonough SJ, Giddings CW, Nolan LK. Cloning and sequencing of the *iss* gene from a virulent avian *Escherichia coli*. Avian Disease. 2000;44(1):179-84.
27. Rocha TM. Genes de Virulência em *Escherichia coli* isolada de frangos de corte de criações industriais e alternativas. [Tese].Universidade Federal de Goiás; 2013. [acesso 2 nov 2015].
28. Santos BM, Abreu TGM, Lima AS, Souza SH, Pinto PSA. Ocorrência de surto de salpingite em fêmeas de frango de corte com imunodepressão. In: Anais... Congresso Brasileiro de Veterinária, Gramado- RS. 2008.
29. Bock RR, Shore LS, Samberg Y, Perl S. Death in broiler breeders due to salpingitis: Possible role of zearalenone. Avian Pathology. 1986;15(3):495-502.
30. Knöbl T, Saidenberg A, Moreno AM, Gomes TAT, Vieira MAM, Leite DS, et al. Serogroups and virulence genes of *Escherichia coli* isolated from psittacine birds. Pesquisa Veterinária Brasileira. 2011;31(10):916-21.
31. Mainil JG, Jacquemin E, Héroult F, Oswald E. Presence of pap-, sfa-, and afa-related sequences in necrotogenic *Escherichia coli* isolates from cattle: evidence for new variants of the AFA family. Canadian Journal of Veterinary Research. 1997;61(3):193-9.
32. Rodriguez-Siek KE, Giddings CW, Doetkott C, Johnson TJ, Fakhr MK, Nolan LK. Comparison of *Escherichia coli* isolates implicated in human urinary tract infection and avian colibacillosis. Microbiology. 2005;151(Pt 6):2097-110.
33. Knöbl T, Moreno AM, Paixao R, Gomes TA, Vieira MA, da Silva Leite D, et al. Prevalence of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) clone harboring sfa gene in Brazil. Scientific World Journal. 2012:342-437.
34. Knöbl T, Godoy SN, Matushima ER, Guimarães MB, Ferreira AJP. 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. 2008;45:54-60.
35. Ewers C, Guenther S, Wieler LH, Schierack P. Mallard ducks—a waterfowl species with high risk of distributing *Escherichia coli* pathogenic for humans. Environmental microbiology reports. 2009;1(6):510-7.
36. Ikuno AA, Buim MR, Gama NMSQ, França SB, Fujikura LM, Ferreira VCA. 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. São Paulo: Biológico; 2006:68-72.
37. Abreu DLC, Franco RM, Nascimento ERD, Pereira VLDA, Alves FMX, Almeida JFD. 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. 2010;30:406-10.

38. Barros LSSS, Baliza MD, Virgílio FF. *Escherichia coli* from cellulitis lesions in broilers. *Journal of Food Measurement and Characterization*. 2013;7(1):40-5.
39. Johnson TJ, Siek KE, Johnson SJ, Nolan LK. DNA sequence of a ColV plasmid and prevalence of selected plasmid-encoded virulence genes among avian *Escherichia coli* strains. *Journal of bacteriology*. 2006;188(2):745-58.
40. Szemplako K, Krawczyk B, Samet A, Sledzińska A, Nowicki B, et al. A subset of two adherence systems, acute proinflammatory pap genes and invasion coding dra, fim, or sfa, increases the risk of *Escherichia coli* translocation to the bloodstream. *European journal of clinical microbiology & infection diseases* [on line]. 2013. p. 1-4. [acesso 5 out 2015].
41. 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*. 2008;52(3):392-7.
42. Souza EC, Martinez MB, Taddei CR, Mukai L, Gilio AE, Racz ML, et al. Perfil etiológico das diarreias agudas de crianças atendidas em São Paulo. *Journal of Pediatrics (Rio J)*. 2002;78(1):31-8.
43. Kaper JB. Pathogenic *Escherichia coli*. *International Journal of Medical Microbiology*. 2005. [acesso 10 out 2015].
44. Silva J, Minharro S. Identification of *Escherichia coli* o157: H7 In broilers isolated in stat of the Tocantins, Brazil. In: *Simpósio Internacional de Microbiologia*. Universidade Federal de Viçosa. Minas Gerais, Brasil. 2012 [acesso 20 abr 2016].
45. Doyle MP, Schoeni JL. Isolation of *Escherichia coli* O157: H7 from retail fresh meats and poultry. *Applied and Environmental Microbiology*. 1987;53(10):2394-6.

CAPÍTULO 3 – GENES DE VIRULÊNCIA EM ISOLADOS DE *ESCHERICHIA COLI* DE DERMATOSES EM FRANGOS DE CORTE AO ABATE

RESUMO: *Escherichia coli* é habitante comensal da microbiota intestinal de aves, entretanto sorotipos patogênicos têm sido associados a processos patológicos extra intestinais. O presente estudo foi proposto com os objetivos de investigar a presença dos genes *sfa*, *hly*, *traT* e *iss* de *E. coli* em amostras de pele com e sem lesões em frangos de corte ao abate e a determinar os sorogrupos *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC) e os sorotipos *E. coli* O157:H7, *E. coli* O128 e *E. coli* O167. Para tanto, foram coletadas 380 amostras de pele de 19 lotes, sendo 190 de lesões e 190 sem lesões indicativas em matadouro. *E. coli* foi identificada em 11,3% (43/380) do total das amostras analisados, sendo 10,5% (20/190) em amostras com lesão e 12,1% (23/190) sem lesão. Os genes *sfa* e *hly* estiveram ausentes nas amostras analisadas e os genes *traT* e *iss* foram detectados em 74,4% (32/43) e 48,8% (21/43), respectivamente. E 37,2% em amostras com e sem lesões da associação dos genes *traT* e *iss*. Foi por detecção simultânea desses genes que se observou o aparecimento de lesões. Diante o resultado da análise sorológica as amostras tiveram um resultado de relevância para EHEC O157:H7 6,9% (3/43). Conclui-se que *E. coli* está presente em amostras de pele, os genes *iss* e *traT* estiveram presentes nos isolados e quando associados estão envolvidos no aparecimento de lesão. Observou-se também maior frequência da associação destes genes ao sorogrupo O128. Constata-se a presença do sorotipo O157:H7 que representa um risco potencial a saúde pública.

Palavras-chave: fatores de virulência, lesões, sorogrupos, sorotipo.

CHAPTER 3 – *ESCHERICHIA COLI* VIRULENCE GENE ISOLATED FROM BROILERS DERMATOSIS OF SLAUGHTER

ABSTRACT: *Escherichia coli* is a commensal inhabitant of the intestinal tract of poultry; however, pathogenic serotypes have been associated with extra intestinal pathological processes. The purpose of this study were to investigate the presence of the *E. coli* genes *sfa*, *hly*, *traT*, and *iss* in skin samples with and without lesions from broilers at slaughter and determine the serogroups enteropathogenic *E. coli* (EPEC), enteroinvasive *E. coli* (EIEC), and the serotypes *E. coli* O157:H7, *E. coli* O128, and *E. coli* O167. Therefore, we collected 380 skin samples from 19 lots, of which 190 had injuries and 190 did not have indicating lesions in slaughterhouse. *E. coli* was identified in 11.3% (43/380) of all analyzed samples, 10.5% (20/190) from samples with lesions and 12.1% (23/190) from samples without lesions. The *sfa* and *hly* genes were absent from the samples and *traT* and *iss* genes were detected in 74.4% (32/43) and 48.8% (21/43) of the samples, respectively. And 37.2% were detected in samples with and without associated lesions of *traT* and *iss* genes. By simultaneous detection of these genes we observed the appearance of lesions. Due to the result of the serological test, samples had a score of relevance for EHEC O157:H7 of 6.9% (3/43). We conclude that *E. coli* is present in skin samples, *iss* and *traT* genes were present in the isolates, and when combined they are involved in the onset of injury. Also noted it is more often the association of these genes to serogroup O128. We observed the presence of serotype O157:H7, which is a potential risk to public health.

Keywords: injuries, virulence factors, serogroups, serotype.

1. INTRODUÇÃO

A dermatose se caracteriza por afecções da pele provocada por agentes infecciosos, físicos ou químicos associada a diferentes fatores como a densidade da população alojada e ao manejo sanitário aplicado ao ambiente criatório. Sua ocorrência, em torno de 20,3%, tem sido atribuída principalmente a tecnificação nos sistemas de criação avícola^{1, 2}.

A gravidade das lesões, que podem ser causadas por diferentes agentes, caracterizam por aumento na espessura, alteração na coloração e superfície da pele^{3, 4} e de acordo com MAPA, as lesões cutâneas nas carcaças de frangos de corte podem ser categorizadas em “dermatose”⁵, sendo que a celulite é classificada em uma só categoria pois, grande porcentagem das lesões são associadas com esta doença⁶.

A inflamação supurativa da pele pode ser causada por cepas de *Escherichia coli* patogênica para aves (APEC) e comensais, as quais podem ser responsáveis por diversos processos patológicos extra intestinais seja como agente primário ou secundário⁷ e a virulência está associadas a genes que expressam sua patogenicidade⁸.

Esta afecção pode causar depreciação de carcaças, repugnância e determinar condenações ao abate e conseqüentemente perdas econômicas⁹.

A severidade da infecção é dependente de diversos fatores, e em parte, dependem que a patogenicidade da cepa de *E. coli* que contenha genes de virulência¹⁰, os quais são fundamentais para o desenvolvimento do quadro de dermatose. O gene *sfa* relacionado à fímbria D+ manose resistentes na mediação de adesão da *E. coli* para diferentes tecidos do hospedeiro¹¹; *hly* que codificam alfa-hemolisina, além de lesionar as células hospedeiras, suprime a produção de citocinas e interleucinas pela célula eucariótica, permitindo que a bactéria se estabeleça no organismo hospedeiro¹². O gene *traT* que está relacionado a uma proteína de superfície de exclusão, codificada pelos plasmídeos conjugativos que confere resistência ao soro⁴ e o gene *iss* codificado por um plasmídeo, comumente encontrado em amostras de aves que causa a resistência lítica¹³.

Além disso *E. coli* é classificada em diferentes sorogrupos e sorotipos¹⁴, que permitiram ser classificados em patotipos além de APEC, a *E. coli* (EPEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC,) *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) e *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) têm sido apontados por distúrbios no organismo tanto de animais quanto de humanos^{15, 16}, e pode se originar das aves que são potenciais reservatórios deste patógeno¹⁷.

As informações sobre a epidemiologia das APECs e a possibilidade de transmissão dos isolados clínicos de *E. coli* assim como a distribuição dos genes de virulência entre as amostras se constituem importantes ferramentas epidemiológicas¹⁸, assim como uma grande diversidade de patótipos de *E. coli* com genes comuns é encontrada em humanos e outros mamíferos sendo possível ocorrer constantes novas combinações denominadas emergentes, representando um risco zoonótico^{18, 19}.

São poucos os trabalhos realizado no Brasil sobre a epidemiologia, distribuição de genes de virulência entre os isolados de *E.coli*, o que restringe o emprego do controle epidemiológico e medidas de prevenção, ao contrário de alguns outros países, principalmente os considerados de primeiro mundo, que as informações epidemiológicas de APEC e possibilidade de transmissão de isolados clínicos de *E. coli* são bem documentadas²⁰.

Diante do exposto o presente trabalho foi desenvolvido com os objetivos de isolar e identificar *E. coli* utilizando o método bacteriológico convencional, detectar os genes *sfa*, *hly*, *traT* e *iss* dos isolados de *E. coli* pela PCR convencional de amostras de pele de frangos de corte ao abate, além de pesquisar os sorogrupos EPEC, EIEC, EHEC O157:H7, *E. coli* O167 e *E. coli* O128.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Local

O experimento foi desenvolvido nos Laboratórios de Bacteriologia e Biologia molecular do Departamento de Medicina Veterinária da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás (UFG).

2.2. Amostragem

As amostras foram coletadas em matadouros, com inspeção estadual, provenientes de granjas de seis municípios em um total de 19 lotes, de acordo com o cronograma de abate, no período de dezembro de 2014 a março de 2015. Foram coletados cerca de 2 g de fragmentos de pele, sendo 10 amostras de pele com lesões (presença de exsudato caseificado, espessamento de pele, crostas e alterações de cor) e 10 sem lesões, num total de 20 amostras de cada lote, totalizando 380 amostras.

2.3. Análise bacteriológica

Imediatamente após a coleta cada amostra foi identificada e colocada em bolsa coletora com 18 mL de água peptonada a 1%, acondicionadas em caixa térmica com gelo e transportadas ao Laboratório. No laboratório as amostras foram processadas com modificações de acordo com Oliveira et al.²¹. As bolsas coletoras contendo as amostras foram incubadas a 37°C por 24h. E 1 mL desta solução para 9 mL de caldo Brain Heart Infusion Broth (BHI), e então novamente incubados a 37°C/24h. Após este período com o auxílio de uma alça de níquel cromo, alíquotas foram plaqueadas por esgotamento para o ágar MacConkey e imediatamente incubados a 37°C/24h. Passado este período observava-se o aspecto macroscópico das colônias com atenção as lactoses positivas (Lc+) e negativas (Lc-). Três unidades formadoras de colônias (UFC), com características morfológicas descritiva acima foram repicadas em ágar triplice ferro (TSI). Os tubos de TSI com crescimento característico de *E. coli*, foram submetidos a provas bioquímicas: uréia, indol, vermelho de metila, citrato, malonato, glicose, lactose para confirmação da bactéria. Os isolados de *E. coli* foram estocados em ágar nutriente e mantidos a temperatura ambiente para posterior extração de DNA, realização da pesquisa dos genes de virulência e sorologia.

2.4. Extração de DNA isolados de *E. coli*

Para detecção dos genes (*sfa*, *hly*, *traT* e *iss*) foi utilizada a técnica de extração térmica, assim 1,0 mL da suspensão da cultura bacteriana em caldo BHI por 24h a 37°C coletado e centrifugado por 5 min a 29220 G (13.200 rpm) em centrífuga eppendorf centrifuge 5810. O sobrenadante foi descartado, e 800 µL de água miliQ adicionados. Após homogeneização, as amostras foram submetidas a uma nova centrifugação nas mesmas condições mencionadas anteriormente. O sobrenadante descartado, e 80 µL de água miliQ adicionada. Após essa etapa, as amostras foram submetidas a temperatura de 96°C por 10 minutos. O sobrenadante foi removido e mantido congelado em tubos de polipropileno a -20°C até o momento da análise²².

2.5. Técnica de PCR para detecção dos genes de virulência

Para a realização da PCR foi estabelecido o volume de 50 µL para o mix de reação, composto por 34,75 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); 1 µL de dNTP [dCTP, dATP, dGTP, dTTP] a 10 mM (*Amersham Biosciences*, concentração final de 0,2 mM); 1 µl a 10 µM (concentração final de 0,1 µM) do iniciador sense, 1 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 (50 a 200 ng).

Para as reações dos diferentes genes de virulência foram empregados pares de oligonucleotídeos para *sfa*²³, *hly*²⁴, *traT*²⁴ e *iss*²⁵. As quais as sequências dos iniciadores estão descritas no Quadro 1. Os controles positivos usados neste trabalho foram doados da coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia da UNESP-Jaboticabal e do Laboratório de Microbiologia da UFG e foram gentilmente cedidos pela Doutora Marita Vedovelli e Doutora Tereza Knobl da Escola de Veterinária da Universidade de São Paulo (USP). Para o controle negativo o volume referente à amostra foi substituído por água ultrapura (Dnase/Rnase- Free Distilled Water-*Invitrogen*).

QUADRO 1. Sequência de *primers* avaliados pela técnica de PCR, para amplificação de genes de Virulência de *E. coli*.

Alvo	Sequência de Oligonucleotídeos (5'3')	Tamanho de fragmento amplificado	Ta
<i>Sfa</i>	CTCCGGAGAACTGGGTGCATCTTAC CGGAGGAGTAATTACAAACCTGGCA	410 pb	65°C
<i>hlyA</i>	AACAAGGATAAGCACTGTTCTGGCT ACCATATAAGCGGTCATTCCCCTGCA	1.177 pb	63°C
<i>traT</i>	GGTGTGGTGCGATGAGCACAG CACGGTTCAGCCATCCCTGAG	290 pb	63°C
<i>Iss</i>	GTGGCGAAAAGTAGTAAACAGC CGCCTCGGGGTGGATAA	760 pb	49°C

Ta: temperatura de anelamento do par de iniciadores

A amplificação foi realizada em termociclador (*Mastercycler Personal, Eppendorf*) programada de acordo com as referências citadas para cada *gen*. Para o gene *sfa* o ciclo inicial de 94°C/2 min, seguido de 25 ciclos repetidos de 94°C/2 min, temperatura de anelamento (Ta) por 1 min e 72°C/2 min. Já para os genes *traT* e *hly* o ciclo inicial foi de 95° C/12 min, seguido de 25 ciclos repetidos de 94°C/30s, temperatura de anelamento (Ta) por 30 s, seguido por extensão inicial de 68°C/ 3 min e extensão final a 72°C/ 10 min. Para o gene *iss* utilizou-se uma adaptação da técnica,

segundo Rocha²⁶, no qual o ciclo inicial foi de 94°C/2 min, seguido de 35 ciclos repetidos de 94°C/30s, 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.

Em seguida a amplificação, as amostras (10 µL) foram submetidas à eletroforese a 90 volts, durante 60 min, em gel de agarose 1,5 % para o gene *sfa*; 0,8% para o gene *hlyA*, 2% para o gene *traT* e 1,2% para o gene *iss* em tampão tris-borato-EDTA (TBE) 1x (TRIS 1M, Ácido bórico 0,83M; EDTA 20 Mm). Como marcador de massa molecular foi utilizados o DNA Ladder 100 pb (*Invitrogen*) diluído. Em seguida, os géis foram corados por imersão em solução de brometo de etídio (0,6 µg/mL) por 10 min. A visualização foi realizada em aparelho transiluminador de UV (Electronic UV Transiluminador, Ultra-Lum), em ambiente escuro onde se fez a documentação fotográfica.

2.6. Testes sorológicos

Para o teste de aglutinação em lâminas fez-se uma suspensão bacteriana na escala 10⁸ de MacFarland sendo 10 µL da suspensão e 10 µL do anti-soro seguindo as recomendações do fabricante.

Foram utilizados os seguintes soros dos sorogrupos anti *E. coli* O157:H7 (EHEC); anti O26, O55, O111, O119 (EPEC); anti- O28ac, O29, O136, O144 e O152 (EIEC); para o soro anti *E. coli* O128 do sorogrupo Enteropatogênica e O167 pertencente ao sorogrupo Enterotoxigênico, provenientes da PROBAC[®] (Brasil).

2.7. Análise estatística

Os dados foram analisados através da frequência e do teste qui-quadrado por independência e aderência (χ^2) a 5%, empregando-se o software GraphPad Instat 3.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A frequência de *E. coli* isoladas de pele de frangos de corte abatidas seguem na tabela 1.

TABELA 1. Frequência de *E. coli* isoladas de pele de frangos de corte com e sem alterações macroscópicas oriundas de abatedouros com SIF localizados no estado de Goiás, abatidos no período de dezembro de 2014 a março de 2015.

Pele	N	n(positivo)	%
Com Lesão	190	20	10,5
Sem Lesão	190	23	12,1
TOTAL	380	43	11,3

Observa-se na tabela 1, que das 380 amostras de fragmentos de pele analisadas 43 foram positivas para *E. coli*, ou seja, 11,3%; 10,5% (20/190) foram de dermatoses e 12,1 % (23/190) de pele aparentemente íntegra. Esses resultados podem ser confirmados com os resultados obtidos por Oliveira et al.²⁷, que encontraram 12,7% de dermatoses de frangos de corte em amostras de matadouro.

Por outro lado, os resultados obtidos neste trabalho são diferentes dos encontrados por outros autores, os quais obtiveram alta frequência de *E. coli*. Viera et al.²⁸ obtiveram 100% de frequência de *E. coli*, no entanto deve ser assinalado que ele processou amostras com características de celulite. Um aspecto em relação as dermatoses, especialmente se considera a celulite refere-se a possibilidade das lesões aparecerem em horas ou dias e poder permanecer por semanas e serem totalmente reabsorvidas²⁹.

Tabela 2. Frequência dos genes *sfa*, *hly*, *traT* e *iss* em isolados de *E. coli* obtidos de pele com e sem alterações macroscópicas oriundas de frangos de corte.

	<i>sfa</i>	<i>hly</i>	<i>traT</i>		<i>iss</i>		<i>trat + iss</i>	
	n/N	n/N	n+*/N	%	n+*/N	%	n+*/N	%
Com Lesão	0/20	0/20	14/20	70	13/20	65	10/20	50 a
Sem Lesão	0/23	0/23	18/23	78,2	8/23	34,7	6/23	26 b
P	0	0		0,53		0,09		
Total	0/43	0/43	32/43	74,4	21/43	48,8	16/43	37,2

N: total de amostras avaliadas. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas utilizando o teste de qui quadrado a 5%.

Observa-se na tabela 2 que os genes *sfa* e *hly* não foram detectados em amostras de pele com e sem lesões de frangos de corte. Este resultado permite postular que as lesões não estão relacionadas com estes genes. Assim como neste trabalho, alguns autores³⁰ não obtiveram positividade para o gene *sfa*, que está relacionado à adesão de *E. coli* em isolados de psitacédeos com colibacilose. Por outro lado³¹⁻³³

detectaram este gene em isolados de APEC de frangos de corte em quadros de colisepticemia.

No presente estudo o gene *hly* (alfa hemolisina) também não foi encontrado (0/43). Este resultado é semelhante ao obtido de amostras de 50 cepas por Vidotto et al.³² e de 420 cepas por Emery et al.³⁴ em isolados de *E. coli* de colisepticemia em frangos de corte que também não obtiveram positividade em suas análises para o gene *hly*.

Por outro lado, um estudo relacionado com cepas de *E. coli*, isoladas de aves afetadas pela colibacilose, incluindo dermatose, onfalite, salpingite, doença respiratória crônica e síndrome da cabeça inchada, apartir de 12 granjas avícolas brasileiras, obtiveram 34% de presença do gene *hly* do quadro de colibacilose³⁵. A presença deste gene tem importância como potencial risco zoonótico.

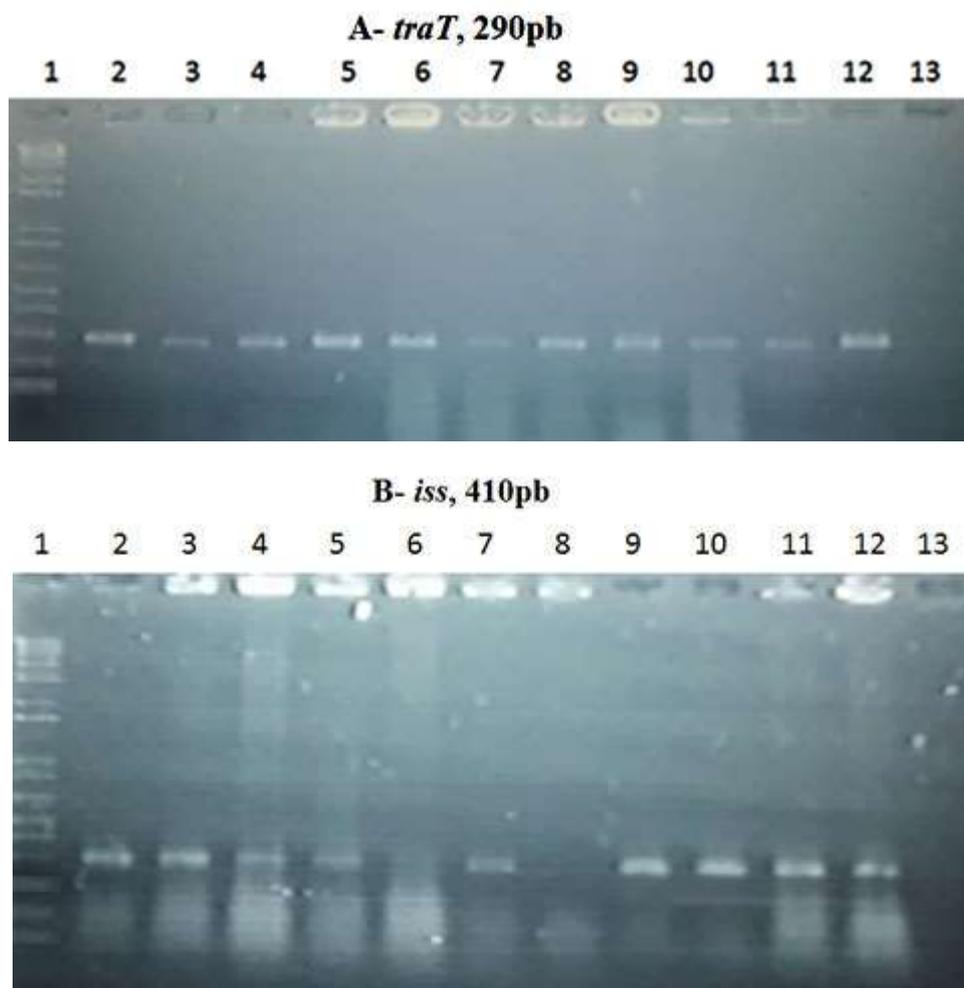


FIGURA 1. Eletroforese da PCR para detecção de genes de virulência de isolados de *E. coli* obtidos de frangos de corte localizados de diferentes municípios do estado de Goiás. A- 1: marcador de peso molecular, 2 e 13 controle positivo e negativo, respectivamente, as amostras 3 a 12 são positivas para dermatose com e sem lesão, gel de agarose a 2%; B-1: marcador de peso molecular, 2 e 13 controle positivo e negativo, respectivamente, a amostra 8 é negativa, as amostras 3 a 7 e 9 a 12 são positivas para dermatose, gel de agarose a 1,2%.

Verifica-se ainda na tabela 2, que o gene *traT* (Figura 1A) se manifestou em 32 dos 43 isolados de *E. coli* (74,4%) sem diferença significativa ($p>0,05$) entre as amostras de pele com e sem lesão, obteve-se 70% (14/20) e 78,2% (18/20) respectivamente.

Estes resultados se respaldam em Montenegro et al.³⁶, os quais afirmaram que o gene *traT* não é essencial para a patogênese de APEC, o que se sustenta nas colocações de que a proteína da membrana externa plasmídeo R6-5-especificado, a proteína *Trat*, foi previamente mostrada e medeia a resistência bactericida do soro. *Trat*

foi encontrado em isolados de vários microrganismos entéricos como a *E. coli*. Assim como Rodriguez-Siek et al.³⁷ também encontraram uma elevada porcentagem (78%) desse gene em isolados de APEC.

Verifica-se também na tabela 2 (Figura 1B) que o gene *iss*, relacionado ao plasmídeo ColV esteve presente em 48,8% (21/43). Esses plasmídeos são associados às APEC's e alguns autores sugerem que eles exercem importante papel na patogenia da colibacilose aviária³⁸. A frequência detectada neste estudo foi semelhante da obtida por Ozawa et al.³⁹ os quais citaram que 80,7% dos 83 isolados abrigava o gene *iss* como mais prevalente em cepas de colibacilose aviária.

Kawano et al.⁴⁰ encontraram dados similares e detectaram *iss* em 63,3% das amostras de *E. coli* originárias de aves aparentemente saudáveis no Japão. Um percentual menor foi observado por McPeake et al.⁴¹, 17,8%, apesar de terem identificado *iss* em 72,8% das amostras de *E. coli* isoladas de aves com septicemia. Rodriguez-Siek et al.³⁷ detectaram o gene *iss* em 18,3% nas aves aparentemente saudáveis e 82,7% nas aves com colibacilose. Nesse último estudo, os autores relataram que o gene *iss* esteve mais associado a infecções sistêmicas, incluindo o isolamento em amostras de fígado, coração, baço e sangue (86,5%).

Verifica-se na tabela 2 que os dados obtidos neste trabalho para o gene *iss*, 48,8% (21/43) é essencial e desempenha um papel significativo nos processos de infecção sistêmica e estão comumente de acordo com os observados na literatura. Arabi et al.⁴², obtiveram 96,4% para o gene *iss* em amostras de isoladas de frangos. Em estudo desenvolvido por OH et al.⁴³ pesquisaram a presença de nove genes associados à virulência de *E. coli* e obtiveram 58,62% para o gene *iss*.

Resultados variados foram obtidos por outros autores e alguns obtiveram frequências maiores as deste trabalho. Rocha et al.³ mostraram que de 61 isolados de APEC, 73% eram portadores do gene *iss*.

No gráfico 1 estão distribuídos os dados referentes à frequência de detecção para a associação dos genes *traT* e *iss* em isolados de *E. coli* com e sem lesões de matadouros de frangos de corte, abatidos sob SIF.

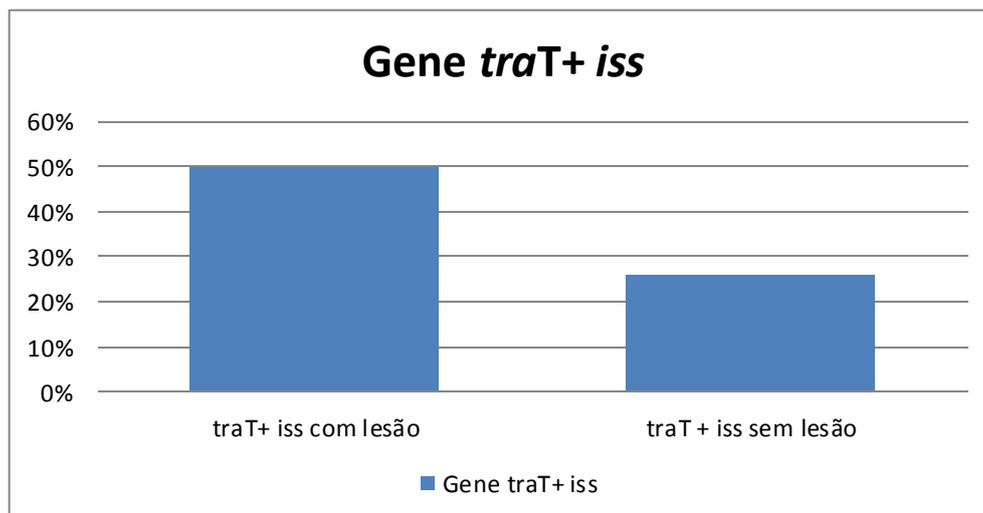


GRÁFICO 1. Frequência da associação dos genes *traT* e *iss* em isolados de *E. coli* de pele com e sem lesões de matadouros de frangos de corte, abatidos sob SIF no estado de Goiás em dezembro de 2014 a março de 2015.

No entanto quando se analisa na tabela 3 e no gráfico 1 a relação da presença do gene *traT* e *iss* juntos observa-se aparecimento de lesões.

A associação do gene *traT* e *iss* (tabela 3) 37,2% (16/43) contribuiu para a ocorrência das lesões na pele, os quais apresentaram 50% (10/20) para amostras com lesões e 26% (6/23) para amostras sem lesões ($p < 0,05$). APEC que expressam estes genes possuem importante papel na patogenia da colibacilose aviária, pois possibilitam que *E. coli* invada os tecidos, acessem à corrente sanguínea e desenvolvam em órgãos sistêmicos^{38, 44}.

São descritos muitos fatores associados à virulência e resistência de APEC, embora Tejkowski et al.⁴⁵ relatem que ainda não é possível estabelecer ou identificar todos os elementos causadores dos diferentes quadros anatomopatológico atribuídos por *E. coli*.

Verifica-se na tabela 3 os resultados dos testes sorológicos para EPEC, EIEC, *E. coli* O128, *E. coli* O157:H7 e O167.

TABELA 3. Frequência dos sorogrupos identificados de *E. coli* de pele com e sem alterações macroscópicas oriundas de abatedouros de frangos de corte.

Amostras	EPEC (%)	EIEC (%)	O128 (%)	O157:H7 (%)	O167 (%)
Com Lesão	(3/43) 7	(0/43) 0	(3/43) 7	(1/43) 2,3	(0/43) 0
Sem Lesão	(3/43) 7	(3/43) 7	(3/43) 7	(2/43) 4,6	(0/43) 0
Total	(6/43) 14	(3/43) 7	(6/43) 14	(3/43) 5,9	(0/43) 0

Verifica-se na tabela 3 que tanto para *E. coli* de pele com lesão como sem lesão, obteve-se 14% das amostras reagentes dos sorotipos anti O26, O55, O111, O119 do sorogrupo EPEC, 14% para *E. coli* O128 e 7% para sorotipos anti- O28ac, O29, O136, O144 e O152 do sorogrupo EIEC.

Nota-se ainda que obteve 5,9% de amostras reagentes ao antisoro *E. coli* O157:H7 (tabela 3). Os resultados sugerem que carcaças de aves podem ser fonte de infecção de *E. coli* O157:H7, e pode representar potencial de risco a saúde pública e estão em acordo com resultados observados por Silva et al.⁴⁶ 4,6% (8/173) de amostras provenientes das carcaças de aves abatidos em matadouro.

Doyle et al.⁴⁷, reportaram a primeira vez a presença de *E. coli* O157:H7 em carne de frango, em que de 263 amostras provenientes de aves, 4 (1,5%) foram positivas para este sorogrupo.

Os isolados de dermatoses pertencem a uma variedade de sorogrupos O, sendo os mais comuns segundo a literatura o O1, O2 e O78. Entretanto, muitos patotipos não são tipificáveis, dificultando sua classificação⁴⁸.

Gomis et al.⁴⁹ encontraram 100% de *E. coli* nas lesões de aves com celulite, destas o sorogrupo mais isolado foi O78, mesmo 68% não sendo sorotipadas.

Portanto, segundo alguns autores^{50, 51}, existem outros grupos comuns de *E. coli* incriminado como agentes causais de dermatites como O78, O115 e O161, nos quais não foram tipificados na maioria dos isolamentos e que há uma diversidade de sorotipos de *E. coli* envolvendo a dermatose, como também a presença de sorotipos não tipificáveis.

Em acordo com a estatística, relacionando a associação da presença dos genes *traT* e *iss* nas amostras determinou-se que em dermatose a interação entre *iss+traT* está associado em maior frequência ao sorogrupo O128 (p=0,03) não havendo relação considerável aos demais sorogrupos estudados.

4. CONCLUSÃO

Conclui-se que *E. coli* está presente nas lesões de pele em frangos de corte e os genes *iss* e *traT* associados estão envolvidos no aparecimento de lesão. Esta associação dos genes nas amostras determinaram maior frequência quando na presença do sorogrupo *E. coli* O128. Constata-se a presença do sorotipo O157:H7 que representa risco potencial à saúde pública.

REFERÊNCIAS

1. Cravener TL, Roush WB, Mashaly MM. Broiler production under varying population densities. *Poultry of Science*. 1992;71(3):427-33.
2. Martrenchar A, Morisse JP, Huonnic D, Cotte JP. Influence of stocking density on some behavioural, physiological and productivity traits of broilers. *Veterinary research*. 1997;28(5):473-80.
3. Rocha ACGP, Rocha SLS, Lima-Rosa CAV, Souza GF, Moraes HLS, Salle FO, et al. Genes associated with pathogenicity of avian *Escherichia coli* (APEC) isolated from respiratory cases of poultry. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 2008;28:183-6.
4. Kariyawasam S, Johnson TJ, Nolan LK. Unique DNA sequences of avian pathogenic *Escherichia coli* isolates as determined by genomic suppression subtractive hybridization. *FEMS Microbiology Letters*. 2006;262(2):193-200.
5. Brasil. Portaria N° 210 DE 10 DE Novembro DE 1998. In: Ministério da Agricultura PeA. Dispõe do Regulamento Técnico da Inspeção Tecnológica e Higiénico- sanitária de carne de Aves. Disponível em:
6. De Brito BG, Tagliari KC. Celulite aviária por *Escherichia coli*. *UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde*. 2014;2(1).
7. Piatti RM, Baldassi L. Prevalência de *Escherichia coli* O78: K80 na microbiota de aves da região oeste do Estado de São Paulo. *Arquivo Instituto Biológico*. 2007;74(4):357-9.
8. Knöbl T, Godoy SN, Matushima ER, Guimarães MB, Ferreira AJP. 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*. 2008;45:54-60.
9. Aristides LGA, Dognani R, Lopes CF, Shimokomaki M. Diagnósticos de condenações que afetam a produtividade da carne de frangos brasileira. *Revista nacional da carne*. 2007; p. 22-8.
10. 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 Bacteriology Virology*. 2008;38(4):179-88.
11. Knöbl T, Gomes TAT, Vieira MAM, Bottino AJA, Ferreira AJPF. Detection of pap, sfa, afa and fim adhesin-encoding operons in avian pathogenic *Escherichia coli*. *International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine*. 2004. p. 135-41.

12. Hilbert DW, Paulish-Miller TE, Tan CK, Carey AJ, Ulett GC, Mordechai E. Clinical *Escherichia coli* isolates utilize alpha-hemolysin to inhibit in vitro epithelial cytokine production. *Microbes and Infection*. 2012;14(7):628-38.
13. Dho-Moulin M, Fairbrother JM. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Veterinary Research*. 1999;30(2-3):299-316.
14. Kauffmann F. The serology of the coli group. *Journal Immunology*. 1947;57(1):71-100.
15. Minagawa CY. Estudo microbiológico fecal de linhagens de camundongos, de estirpes de *E. coli* e do meio ambiente em biotérios. 2007. [Tese]. Universidade de São Paulo. [acesso 4 maio 2016].
16. Berchieri Junior A, Macari M. Doenças das aves. In: Ferreira AJP, Knöbl T. *Colibacilose*. 2ª ed. Campinas: Fundação Apinco. 2009.
17. Lee GY, Jang HI, Hwang IG, Rhee MS. Prevalence and classification of pathogenic *Escherichia coli* isolated from fresh beef, poultry, and pork in Korea. *Internacional Journal Food Microbiology*. 2009;134(3):196-200.
18. Ikuno AA, Guastalli EAL, Buim MR, Gama NMAQ, França SB, Alonso AC et al. 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. ed. *Biológico*, São Paulo. 2006;(68):68-72.
19. Russo TA, Johnson JR. Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: focus on an increasingly important endemic problem. *Microbes Infection*. 2003;5(5):449-56.
20. Ikuno AA, Cortez ALL, Carvalho ACFB, Bürger KP, Vidal-Martins AMC. Identification of *Salmonella* spp. isolates from chicken abattoirs by multiplex-PCR. *Research in veterinary science*, 2006;81(3), 340-344.
21. Oliveira SJ. Guia bacteriológico prático. Ulbra-Canoas. 2012. 260 p.
22. Silva IMM, Evêncio-Neto J, Silva RM, Lucena-Silva N, Magalhães J, M. B. Genotypically characterization of *Escherichia coli* isolates from poultry. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* (online). 2011;63(2).
23. Le Bouguenec C, Archambaud M, Labigne A. Rapid and specific detection of the pap, afa, and sfa adhesin-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains by polymerase chain reaction. *Journal Clinical Microbiology*. 1992;30(5):1189-93.
24. Johnson JR, Stell AL. Extended Virulence Genotypes of *Escherichia coli* Strains from Patients with Urosepsis in Relation to Phylogeny and Host Compromise. *Journal of Infectious Diseases*. 2000;181(1):261-72.
25. Horne SM, Pfaff-McDonough SJ, Giddings CW, Nolan LK. Cloning and sequencing of the iss gene from a virulent avian *Escherichia coli*. *Avian Diseases*. 2000;44(1):179-84.

26. Rocha TM. Genes de Virulência em *Escherichia coli* isolada de frangos de corte de criações industriais e alternativas. [Tese]. Universidade Federal de Goiás; 2013. [acesso 4 maio 2016].
27. Oliveira AA, Andrade MA, Armendaris PM, Bueno PHS. Principais causas de condenação ao abate de aves em matadouros frigoríficos registrados no serviço brasileiro de inspeção federal entre 2006 e 2011. 2016. [acesso 24 fev 2016].
28. Vieira TB, Franco RM, Magalhães H, Praxedes CIS, Tortelly R. Celulite em frangos de corte abatidos sob inspeção sanitária: aspectos anatomopatológicos associados ao isolamento de *Escherichia coli*. Revista Brasileira de Ciência Veterinária. 2006;13(3).
29. Gomis S, Amoako K, Ngeleka M, Belanger L, Althouse B, Kumor L, et al. Histopathologic and bacteriologic evaluations of cellulitis detected in legs and caudal abdominal regions of turkeys. Avian diseases. 2002;46(1):192-7.
30. Knöbl T, Saidenberg A, Moreno AM, Gomes TAT, Vieira MAM, Leite DS, et al. Serogroups and virulence genes of *Escherichia coli* isolated from psittacine birds. Pesquisa Veterinária Brasileira. 2011;31(10):916-21.
31. Knöbl T, Gomes TAT, Vieira MAM, Ferreira F, Bottino JA, Ferreira AJP. Some adhesins of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from septicemic poultry in Brazil. Brazilian Journal of Microbiology. 2006;37:379-84.
32. Vidotto MC, Navarro HR, Gaziri LCJ. Adherence pili of pathogenic strains of avian *Escherichia coli*. Veterinary microbiology. 1997;59(1):79-87.
33. De Campos TA, Stehling EG, Ferreira A, de Castro AFP, Brocchi M, da Silveira WD. Adhesion properties, fimbrial expression and PCR detection of adhesin-related genes of avian *Escherichia coli* strains. Veterinary microbiology. 2005;106(3):275-85.
34. Emery DA, Nagaraja KV, Shaw DP, Newman JA, White DG. Virulence factors of *Escherichia coli* associated with colisepticemia in chickens and turkeys. Avian diseases. 1992;504-11.
35. Knobl T, Moreno AM, Paixao R, Gomes TA, Vieira MA, da Silva Leite D, et al. Prevalence of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) clone harboring sfa gene in Brazil. Scientific World Journal. 2012;2012:437342.
36. Montenegro MA, Bitter-Suermann D, Timmis JK, Agüero ME, Cabello FC, Sanyal SC, et al. traT gene sequences, serum resistance and pathogenicity-related factors in clinical isolates of *Escherichia coli* and other gram-negative bacteria. Microbiology. 1985;131(6):1511-21.
37. Rodriguez-Siek KE, Giddings CW, Doetkott C, Johnson TJ, Nolan LK. Characterizing the APEC pathotype. Veterinary Reserach. 2005;36(2):241-56.
38. Johnson TJ, Siek KE, Johnson SJ, Nolan LK. DNA sequence of a ColV plasmid and prevalence of selected plasmid-encoded virulence genes among avian *Escherichia coli* strains. Journal of bacteriology. 2006;188(2):745-58.

39. 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*. 2008;52(3):392-7.
40. 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*. 2006;50(12):961-6.
41. McPeake SJW, Smyth JA, Ball HJ. Characterisation of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) associated with colisepticaemia compared to faecal isolates from healthy birds. *Veterinary Microbiology*. 2005;110(3-4):245-53.
42. Arabi S, Jafarpour M, Mirinargesi M, Asl SB, Naghshbandi R, Shabanpour M. Molecular Characterization of Avian Pathogenic *Escherichia coli* in Broilers Bred in Northern Iran. *DNA*. 2013;2:2.
43. Oh JY, Kang MS, Yoon H, Choi HW, An BK, Shin EG, et al. The embryo lethality of *Escherichia coli* isolates and its relationship to the presence of virulence-associated genes. *Poultry of Science*. 2012;91(2):370-5.
44. Szemplako K, Krawczyk B, Samet A, Sledzińska A, Nowicki B, et al. A subset of two adherence systems, acute proinflammatory pap genes and invasion coding dra, fim, or sfa, increases the risk of *Escherichia coli* translocation to the bloodstream. *European journal of clinical microbiology & infection diseases* [on line]. 2013. p. 1-4. [acesso 5 out 2015].
45. Tejkowski TM. Prevalência de fatores associados a virulência em amostras de *Escherichia coli* patogênica aviária (APEC) isoladas de lesões de celulite aviária. <http://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/55463>; Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2012. [acesso 3 maio 2016].
46. Silva J, Minharro S. Identification of *Escherichia coli* o157: H7 In broilers isolated in stat of the Tocantins, Brazil. In: Simpósio Internacional de Microbiologia. Universidade Federal de Viçosa. Minas Gerais, Brasil. 2012 [acesso 20 abr 2016].
47. Doyle MP, Schoeni JL. Isolation of *Escherichia coli* O157: H7 from retail fresh meats and poultry. *Applied and Environmental Microbiology*. 1987;53(10):2394-6.
48. Allan B. Cellulitis: Its Microbiology. In: Proc. 22nd Annual Poultry Service Industry Workshop, Alberta, Canada. 1997. p. 1-5. [acesso 26 abr 2016].
49. Gomis SM, Gomis AI, Horadagoda NU, Wijewardene TG, Allan BJ, Potter AA. Studies on cellulitis and other disease syndromes caused by *Escherichia coli* in broilers in Sri Lanka. *Trop Anim Health Prod*. 2000;32(6):341-51.
50. Peighambari SM, Julian RJ, Vaillancourt JP, Gyles CL. *Escherichia coli* cellulitis: experimental infections in broiler chickens. *Avian Diseases*. 1995:125-34.
51. Ngeleka M, Kwaga JK, White DG, Whittam TS, Riddell C, Goodhope R, et al. *Escherichia coli* cellulitis in broiler chickens: clonal relationships among strains and analysis of virulence-associated factors of isolates from diseased birds. *Infection Immunology*. 1996;64(8):3118-26.

CAPÍTULO 4- CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar do avanço da indústria avícola, a eficiência na produção ainda precisa ser melhorada. Grande parte das perdas no processo produtivo ocorre durante a produção e refletem no matadouro, principalmente envolvendo condenações totais e parciais, causando prejuízos. Neste contexto há também uma crescente preocupação dos consumidores em busca de carne de frango de qualidade, visto a facilidade da aquisição e preparo destes produtos, principalmente após a inserção da mulher no mercado de trabalho. Sendo assim, torna-se de extrema importância procedimentos que visam o controle de microrganismos patogênicos para aves e conseqüentemente para o homem como *Escherichia coli*.

O conhecimento dos pontos relatados neste estudo é de fundamental importância para conhecer os melhores procedimentos para reduzir as perdas provocadas por *E. coli*, visto que é uma das principais bactérias comensais do intestino das aves e em condições favoráveis podem tornar-se patogênicas e alguns patótipos estão relacionados a zoonoses.

Isolados de *E. coli* atuaram em casos de dermatoses em frangos de corte e salpingites em poedeiras. O diferencial destas estirpes reside na presença de fatores de virulência, conferida principalmente pelos sorogrupos envolvidos e genes de virulência adquiridos.

Os inúmeros genes de virulência, que podem estar presentes em isolados de *E.coli*, desenvolvem mecanismos complexos para invasão e colonização da célula hospedeira. Portanto, a pesquisa de genes de virulência é de fundamental importância e pode minimizar os prejuízos econômicos e em saúde pública nas infecções causadas por esta bactéria.

Considerando que a virulência de isolados de *E. coli* de um maior número de genes, as chances de ser mais virulentos e causar infecções severas se tornam maiores, como foi observado quando comparado por exemplo o gene *iss* e *traT* em conjunto e separadamente, portanto o gene *iss* independente obteve maior frequência em amostras de salpingite. Os dados obtidos demonstram que é necessário outros testes com associações destes genes de virulência correlacionando com os demais patótipos referentes. Entendeu-se que a presença dos genes *iss* é fundamental para a patogenia do

quadro de colibacilose. Ressalta-se ainda a importância do gene *iss* no aparecimento de amostras com lesões.

Além disto, estudos realizados com outros patótipos como *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* O128, *E. coli* O167 e *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) O157:H7 demonstraram baixa presença e relação com amostras de salpingites e dermatoses, porém a importância considerável da presença de EHEC O157:H7 demonstra a importância destes estudos, uma vez que este sorogrupo causam enormes danos na saúde humana, causando síndrome urêmica hemolítica, podendo ser letal. Isto comprova que deve haver uma maior monitorização e melhorias no manejo dos animais, maiores cuidados no ambiente de criação de aves, desinfecção dos galpões de criação, para o melhor controle do patógeno, visando alimentos seguros ao homem e menores perdas geradas por colibacilose em aves.

Desta maneira, entende-se que estudos epidemiológicos sobre os genes envolvidos nos casos de colibacilose em aves, bem como conhecimento dos fatores de virulência de amostras, são essenciais para adoção de medidas de controle eficazes, evitando-se a exposição humana a cepas patogênicas

Mais pesquisas são necessárias para identificação e caracterização destes genes, para proporcionar maior clareza do desenvolvimento dos processos patogênicos utilizados por essas bactérias para infectar seus hospedeiro.

A redução das perdas quanto às condenações causadas por *E. coli* e diversos outros agentes se faz de extrema importância na avicultura comercial. Sendo assim, o Médico Veterinário tem um importante papel tanto na saúde pública, na segurança alimentar e no desenvolvimento de pesquisas para viabilizar a produção de forma econômica e mais sustentável.