

1. INTRODUÇÃO

No complexo brasileiro de produção de carnes, a produção avícola apresenta um dos maiores índices de industrialização. Esta ascensão na produção fez do Brasil o terceiro maior produtor de carne de frango, ficando atrás apenas dos Estados Unidos e China. Em 2012, segundo a União Brasileira de Avicultura (UBABEF), a produção da carne de frango atingiu a marca de 12,645 milhões de toneladas. Deste total, 69% foi destinado ao consumo interno e 31% para exportação. Com relação ao mercado externo, o Brasil mantém, desde 2004, a posição de maior exportador mundial, tendo terminado 2012 com a marca de 3,918 milhões de toneladas embarcadas para mais de 150 países.

Com esta crescente demanda quaisquer problemas relacionados à sanidade das aves acarretam grandes prejuízos econômicos aos produtores. Um dos principais problemas da avicultura industrial moderna, por exemplo, tem sido a disseminação da infecção causada pela bactéria *Escherichia coli* patogênica extraintestinal (ExPEC). Esta infecção, denominada colibacilose, é considerada uma doença multifatorial e possui caráter secundário (BARNES et al., 2003). Tal enfermidade se estabelece após a colonização pelas cepas de *E. coli* patogênica aviária (APEC) no trato respiratório das aves jovens, de 4 a 9 semanas, imunossuprimidas por infecção primária (DELICATO et al., 2003). Após a multiplicação da APEC, ocorre a migração destes micro-organismos para corrente sanguínea dos animais. Desta forma, após o estabelecimento da infecção, as aves apresentam o quadro de septicemia aguda, resultando, na maioria dos casos, na morte dos animais. Entretanto, as aves que conseguem sobreviver à septicemia apresentam quadros de infecções cutâneas (GROSS, 1991).

Os mecanismos de virulência da APEC reconhecidamente descritos como responsáveis pela colibacilose são: sistemas de aquisição de ferro, produção de toxinas, capacidade de adesão, produção de colicina, presença flagelos, antígenos capsular, hemaglutinina temperatura-sensível e resistência sérica ao soro (WATERS e CROSA, 1991; JOHNSON et al., 2001). Dentre estes mecanismos, a capacidade de resistência aos fatores séricos inibitórios do sistema complemento do hospedeiro, é um dos importantes fatores de virulência das cepas APEC. Este mecanismo é considerado fundamental na patogenia da colibacilose aviária, visto que bactérias sensíveis ao soro são incapazes de colonizar órgãos internos (DELICATO et al., 2003; VIDOTTO et al., 1990).

Dentre estes fatores, a resistência ao complemento sérico é conferida a APEC pelo gene *iss* (*increased serum survival*), localizado no plasmídeo ColV, e que foi identificado como um marcador de virulência para distinguir as cepas ExPEC aviárias das humanas. Este gene codifica uma proteína da membrana externa responsável pelo bloqueio do complexo terminal do sistema do complemento que atua na membrana celular causando a lise da célula (PFAFF-MCDONOUGH et al, 2000; NOLAN et al, 2003; McPEAKE et al., 2005). Desta forma, o gene *iss* confere ao micro-organismo a capacidade de sobreviver na presença do soro hospedeiro (CHUBA et al., 1989; HORNE et al., 2000; LYNNE et al., 2006).

De acordo com a normativa número 210 de 10/11/98 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), qualquer órgão ou parte da carcaça que estiverem afetados por um processo inflamatório, como a colibacilose, deverão ser descartados. Já no caso de ocorrer evidência de caráter sistêmico da patologia a carcaça e as vísceras deverão ser condenadas na sua totalidade. Portanto, a fim de reduzir as perdas econômicas significativas, os produtores de aves optam pelo uso de antibióticos como promotores de crescimento dos animais. Esta medida possui a finalidade de controlar a multiplicação indesejada de determinadas populações microbianas, melhorar a taxa de crescimento das aves e eficiência alimentar, proporcionar aumento do desempenho e reduzir a mortalidade das aves (MOORE et al., 1946; JUKES et al., 1950). Porém, a utilização inadequada dos antimicrobianos como promotores de crescimento permite a seleção natural de linhagens altamente resistentes aos antimicrobianos e que possuem genes relacionados à patogenicidade com alta capacidade de recombinação genética (JOHNSON et al., 2004).

Desta forma, o surgimento de cepas multirresistentes, além de causar prejuízos econômicos à indústria avícola, dificultando o controle da colibacilose, pode também representar risco à saúde do consumidor da carne de frangos. Isto porque, alguns estudos sugerem que este patótipo seria uma possível fonte de genes de virulência para cepas de *E.coli* do microbioma intestinal dos seres humanos. Embora ainda não esteja bem esclarecido o potencial zoonótico da APEC, acredita-se que, após a ingestão da carne de aves contaminadas, APEC coloniza o trato intestinal dos seres humanos e transfere os genes de virulência às cepas do microbioma humano. Neste processo, ocorre a transferência horizontal dos genes de virulência através da conjugação bacteriana, onde as cepas doadoras de plasmídeos convertem as cepas não patogênicas em patogênicas. Este fenômeno explicaria o fato das cepas de *E.coli* extraintestinal uropatogênica (UPEC)

humana apresentarem partes do genoma similares ao da APEC (EWERS et al., 2009; JOHNSON et al. 2008).

Assim, além dos problemas relativos ao uso indiscriminado de antimicrobianos na ração, com vistas a garantir o aumento da produção, aves portadoras de APEC podem, silenciosamente, ser inseridas na dieta humana, através da seleção de linhagens resistentes a várias classes de antimicrobianos. Com isto, o risco à saúde da população aumenta se consideramos os indícios de que APEC pode ser uma importante fonte de genes de virulência para cepas de *E.coli* que causam infecção extraintestinal em seres humanos.

Partindo desta premissa, foi pesquisada a presença de cepas APEC em fígados de aves aprovadas para o consumo humano. As coletas foram realizadas em um abatedouro localizado na região metropolitana do Recife.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Escherichia coli*

A bactéria Gram negativa *Escherichia coli*, por ser de fácil cultivo e rápida detecção, é bastante pesquisada em laboratório e grande parte das suas características fenotípicas e genotípicas foram elucidadas. Membro da ordem Enterobacteriales, *E. coli* foi descrita pela primeira vez por Theodor Von Escherich em 1885 e está inserida no grupo dos coliformes termotolerantes por possuir a capacidade de fermentar carboidratos e produzir gás quando incubadas a 44 - 44,5°C por 24h (KAPER et al. , 2004).

E. coli é uma das espécies bacterianas que integram o microbioma intestinal de animais monogástricos, incluindo o do homem. Porém, através das interações bióticas e abióticas, *E. coli* pode permanecer viável fora do intestino hospedeiro, sendo frequentemente isolada de amostras ambientais, principalmente nas regiões tropicais (HAZEN et al., 1988; BORDALO et al., 2002; POMMEPUY et al., 2006; CLAUDE et al., 2009). Isto faz com que esta espécie seja utilizada como indicador de contaminação recente de origem fecal em amostras de água e alimento.

As condições ideais para o crescimento desta espécie é de temperatura a 37°C e pH em torno de 4,5. Quando são isoladas de amostras de alimentos, frequentemente, são cultivadas em meio Agar Eosina Azul de Metileno (EMB), apresentando colônias verdes

com brilho metálico e centro preto-azulado. Já para isolados de amostras clínicas, o cultivo recomendado é em Agar MacConkey, onde apresentam colônias avermelhadas (MERCK, 1994).

Esta espécie é caracterizada bioquimicamente pela presença das enzimas β -galactosidase e β -glicuronidase, por ser aeróbio ou anaeróbio facultativo e não utilizar a enzima citocromo C oxidase para o transporte de elétrons no metabolismo de respiração (Koneman, 2001; Tortora, 2005). Ainda com relação à bioquímica, *E.coli* é negativa para as provas do citrato de simmons, da produção de sulfeto e Voges-Proskauer. Sendo positiva para o teste do vermelho de metila, motilidade e indol (BARNES et al., 2003; HOLT et al., 1994).

Com relação aos aspectos morfológicos deste micro-organismo, *E.coli* é um bacilo curto dividido em aproximadamente 160 grupos baseados em estruturas antigênicas. Tais estruturas auxiliam na caracterização dos sorogrupos através da identificação dos antígenos Somáticos (O), que correspondem a maior fração da parede celular, formada por lipopolissacarídeo (LPS); Capsular (K), pela presença do ácido polimérico N-acetil neuramínico; Flagelares (H), de natureza proteica; e Fimbriais (F), que possui natureza proteica e recobre a superfície bacteriana. (FERREIRA; KNOBL, 2009; FRANCO; LANDGRAF, 1996).

No que se refere ao potencial patogênico desta espécie, embora seus representantes sejam considerados micro-organismos comensais intestinais, o desequilíbrio entre o estado de saúde do hospedeiro e a posse de genes virulência pode tornar *E.coli* um patógeno oportunista.

A capacidade da *E.coli* em expressar fatores de virulência é geralmente derivada da transferência horizontal de genes por conjugação. Neste processo, micro-organismos portadores de ilhas de patogenicidade localizadas em elementos genéticos móveis, como os plasmídeos, podem eventualmente converter cepas comensais em patogênicas. Estudos realizados em uma coleção de referência de *E.coli* (ECOR), isoladas de uma variedade de hospedeiros de diferentes regiões geográficas, apontam a presença de ilhas de patogenicidade em cepas envolvidas em diferentes infecções intestinais e extraintestinais. Baseados nos tipos de genes de virulência presentes ou ausentes nas mesmas, as *E.coli* foram organizadas filogeneticamente nos grupos: A, B1, B2 e D (JOHNSON; RUSSO, 2002; HERZER, 1990; LA RAGIONE, 2002; HACKER, 1997).

O agrupamento filogenético pode ser definido por eletroforese de enzimas multilocos (MLEE) ou ribotipagem. Porém, como estas técnicas são complexas e laboriosas, Clermont (2000) desenvolveu uma técnica rápida baseada na identificação do gene *ChuA*, que codifica uma proteína de membrana responsável pelo transporte heme em *E.coli* O157:H7 (TORRES; PAYNE , 1997); do gene *YjaA*, inicialmente identificado na sequência do genoma de *E. coli* K12 (BLATTNER et al . , 1997), e do fragmento de DNA TSPE.4C, que está fortemente associada com *E. coli* meningite neonatal (BONACORSI et al., 2000). A análise filogenética desenvolvida por Clermont apresenta correlação com as características das cepas da coleção ECOR, composta por 230 cepas de *E. coli*. Assim, foi observado que os isolados agrupados em B2 e D possuem potencial de causar infecções. Já os isolados agrupados A e B1 frequentemente estão relacionados ao grupo comensal (Figura 1).

Figura 1. Agrupamento filogenético da bactéria *Echerichia coli*



Fonte: Adaptado de Clermont et al (2000).

Desta forma, com base no conhecimento sobre a bioquímica, sítio de isolamento, características de virulência e filogenia, as cepas de *E.coli* podem ser classificadas em comensais, diarreiogênica (DEC) e patogênicas extraintestinais (ExPEC) (Figura 2) (RUSSO; JOHNSON, 2000; KAPER et ai., 2004).

- ***E.coli* comensal**

Cepas deste grupo são tipicamente derivadas do grupo filogenético A ou B1, não apresentam a maioria dos fatores de virulência e possuem ciclo de vida constituído por

duas fases: no microbioma intestinal de animais monogástricos (habitat primário) e no meio ambiente (habitat secundário) (SMITH, 1965; SERVAGEU, 1983).

No habitat primário, *E.coli* é um simbiote e possui relação de mutualismo com o hospedeiro. Estas bactérias são responsáveis por sintetizar a vitamina K e algumas vitaminas B, que são absorvidas pela corrente sanguínea e distribuída para as demais células do hospedeiro. Em troca, *E.coli* encontra no intestino dos animais os nutrientes necessários para sua sobrevivência. Além disto, *E.coli* apresenta o importante papel do antagonismo microbiano produzindo bacteriocina, proteína que dificulta o crescimento de micro-organismos patogênicos no intestino do hospedeiro (TORTORA, 2005). No habitat secundário, porém, para que consiga sobreviver, *E.coli* necessita superar a baixa disponibilidade de nutrientes e suportar as variações na temperatura, luminosidade, baixa umidade no solo, variação de pH, entre outros fatores (SCHARDINGER, 1892; FAUST, 1975; GERBA, 1976).

Entretanto, no trato intestinal dos animais, onde a concentração de *E.coli* pode ser acima de 10^6 UFC/g do conteúdo intestinal, aproximadamente 20% destas cepas podem possuir fatores de virulência. Desta forma, algumas estirpes são consideradas patógenos oportunistas de interesse médico por serem agentes etiológicos responsáveis por infecções intestinais e extraintestinais em seres humanos e animais (VARNAN et al 1996; REVOLLEDO, 2009).

- ***E.coli* diarreiogênica (DEC)**

Cepas do grupo *E.coli* Diarreiogênica (DEC) raramente são encontradas no microbioma fecal de hospedeiros saudáveis por possuir o potencial de causar infecções intestinais em seres humanos e animais. Geralmente este grupo está relacionado a surtos gastrintestinais quando presentes em quantidades suficientes nos alimentos e na água (PELCZAR et al, 1997).

Os patótipos DEC, classificados nos grupos filogenéticos A, B1 ou D, são bem definidos pela posse de combinações distintas de fatores de virulência, presentes em ilhas de patogenicidade geralmente localizadas em regiões do cromossomo ou em plasmídeos (RUSSO; JOHNSON, 2000).

Devido ao agrupamento específico de fatores de virulência, os patótipos DEC são divididos em seis subgrupos capazes de causar diferentes manifestações clínicas: *E.coli* Enterohemorrágica (EHEC), *E.coli* Enterotoxigênica (ETEC), *E.coli* Enteropatogênica (EPEC), *E.coli* Enteroinvasiva (EIEC), *E.coli* Enteroagregativa (EaggEC) e *E.coli* Difusamente agregada (DAEC) (Figura 3).

Dentre os subgrupos DEC, *E.coli* Enterohemorrágica é o agente etiológico responsável pelo quadro clínico mais grave, a colite hemorrágica e síndrome hemolítica urêmica. EHEC coloniza o cólon e produz a toxina de Shiga na cavidade intestinal do hospedeiro. Após atingir a corrente sanguínea, a toxina é transportada até os rins, causando falência renal e morte do hospedeiro (NATARO, 1998; SILVA, 1999).

Outras linhagens como *E.coli* Enterotoxigênica e *E.coli* Enteroinvasiva são as mais frequentes causadoras da “diarreia do viajante”. Estes patótipos causam danos histopatológicos nas microvilosidades intestinais, causando diarreia aquosa em seus hospedeiros (KAPERET et al., 2004).

- ***E.coli* patogênica extraintestinal (ExPEC)**

Membros do grupo *E.coli* Patogênica Extraintestinal (ExPEC) tem recebido considerável atenção devido a sua complexa capacidade de causar infecções extraintestinais em animais e seres humanos (JOHNSON; RUSSO, 2002).

Diferente do grupo DEC, a presença dos patótipos ExPEC no intestino hospedeiro é insuficiente para causar infecção. Porém, estes patótipos possuem genes codificadores de fatores de virulência que possibilitam a bactéria subverter os mecanismos de defesa do hospedeiro, adquirir nutrientes essenciais para o seu desenvolvimento e provocar uma resposta inflamatória fora do ambiente intestinal (JOHNSON et al., 2005).

Este grupo possui representantes no grupo filogenético B2, com uma menor frequência do grupo D e são definidos com base no sítio de isolamento. Desta forma, as cepas de ExPEC isoladas de infecção urinária são conhecidas como *E.coli* uropatogênica (UPEC), as isoladas de meningites como *E.coli* associada à Meningite Neonatal (MNEC) e as isoladas de infecções em aves são denominadas *E.coli* patogênica aviária (APEC) (Figura 4) (RUSSO et al., 2000).

Dentre os membros ExPEC, APEC tem sido apontada como um patótipo emergente com potencial zoonótico. Estudos comparando UPEC e APEC apontam que estes patótipos podem compartilhar os mesmos grupos sorológicos e fatores de virulência tais como, presença de sideróforos, capsula, proteína termoestável, adesinas (MORA et al, 2009; TIVENDALE et al, 2010; MOULIN-SCHOULEUR et al., 2006, 2007).

Com isto, embora APEC não cause infecção diretamente aos seres humanos, ao colonizar o intestino, através da via fecal oral, este patótipo pode fornecer genes, geralmente localizados em grandes plasmídeos, que codificam fatores de virulência aos demais micro-organismos do microbioma intestinal humano.

2.2 *E.coli* patogênica aviária – APEC

O termo APEC é utilizado para designar o agente etiológico responsável pela infecção extraintestinal em aves. Tal infecção é genericamente denominada de colibacilose e é considerada uma das principais causas de morbidade e mortalidade na avicultura moderna. Geralmente a colibacilose é sistêmica ou localizada, multifatorial, possui caráter secundário e pode acometer galinhas, perus, papagaios e outras espécies de aves (BARNES et al., 1997). Embora a via de infecção causada por APEC não seja bem definida, a presença de *E.coli* na cama das aves e no aerossol formado nos galpões de criação, sugerem que as vias oral e respiratória sejam a porta de entrada para estes patótipos.

Desta forma, as cepas APEC colonizam o trato respiratório das aves jovens, de 4 a 9 semanas, imunossuprimidas por agentes primários que lesam o epitélio respiratório ou que infectam o sistema imunológico das aves. Dentre os agentes primários, estão: Vírus da bronquite infecciosa e da pneumovirose aviária; bactéria *Bordetella avium*, *Mycoplasma gallispticum*; e parasitas *Eimeia tenella* ou *Ascaridia gali* (GROSS, 1991).

Após a multiplicação da APEC na traqueia, ocorre a migração destes micro-organismos para a corrente sanguínea das aves. Assim, 48h após a infecção, as aves apresentam o quadro de septicemia aguda, resultando, na maioria dos casos, na morte dos animais. As aves que conseguem sobreviver à septicemia apresentam quadros de celulite, peritonite, pneumonia, pleuropneumonia, aerossaculite, pericardite, coligranuloma,

doença respiratória crônica complicada (DRCC), onfalite, salpingite, síndrome da cabeça inchada (SCI), osteomielite e ooforite (FERREIRA; KNOBL, 2009; GROSS, 1994).

2.3 Mecanismos de identificação da APEC através de fatores virulência

Pelo fato da produção avícola ser intensiva, devido ao aumento do consumo da carne de frango nas últimas décadas, questões relacionadas à sanidade das aves, possuem fundamental relevância aos produtores. Com isto, como cada isolado APEC pode abrigar diferentes associações de fatores capazes de induzir a infecção em aves, a identificação eficaz do seu agente etiológico é indispensável para o desenvolvimento de medidas de controle da colibacilose (DELICATO et al., 2003; CHOUIKHA, 2006; CORTES et al. 2008; DZIVA; STEVENS, 2008).

Normalmente, o diagnóstico da colibacilose é feito, primeiramente, pela observação durante a necropsia, de lesões cutâneas ou nos órgãos das aves. Em seguida, amostras são coletadas para identificação fenotípica do micro-organismo. Após a identificação da espécie *E.coli*, para que seja classificada como APEC, é necessária à identificação de fatores de virulência através de técnicas como a sorotipagem e/ou a reação em cadeia da polimerase (PCR) (JOHNSON; RUSSO, 2002).

Alguns mecanismos de virulência são frequentemente descritos e auxiliam na identificação das cepas APEC. São eles: sistemas de aquisição de ferro, produção de toxinas, capacidade de adesão, produção de colicina, presença de aerobactina, presença antígenos somáticos, antígenos capsular, hemaglutinina temperatura-sensível, resistência sérica ao soro, dentre outros (EWERS et al., 2004; LA RAGIONE et al., 2002; ROCHA et al., 2002).

- **Antígenos**

O método de diagnóstico geralmente utilizado por laboratórios na identificação dos patótipos APEC é a identificação sorológica. Este método está fundamentado na identificação dos antígenos: Somáticos (O), que correspondem a maior fração da parede celular, formada por lipopolissacarídeo (LPS); Capsular (K), pela presença do ácido polimérico N-acetil neuramínico; Flagelares (H), de natureza proteica; e Fimbriais (F), que possui natureza proteica e recobre a superfície bacteriana (FERREIRA; KNOBL, 2009).

Sabe-se que cada um desses antígenos possui propriedades particulares. Entretanto, a presença de antígeno capsular K1 tem sido relacionada com a patogenicidade de amostras de origem aviária, associada à septicemia nos animais (FERREIRA; KNOBL, 2009). Esta estrutura pode ser responsável pela resistência da bactéria aos efeitos bactericidas do soro da ave. Outro importante antígeno associado a isolados APEC é o somático “O”, caracterizado como uma endotoxina termoestável, liberada durante a fase de multiplicação ou após a morte bacteriana. Com isto, os principais sorotipos relacionados com a colibacilose aviária são: O1:K1; O2:K1; O36 e O78:K80. No Brasil os sorogrupos mais prevalentes são: O2, O21; O36; O50, O78, O88, O119 e O152 (REVOLLEDO et al., 2009; VITODO et al., 1997).

Entretanto, a identificação dos antígenos não reflete necessariamente a característica de virulência deste grupo. Além disto, esta técnica identifica um número limitado de estirpes.

- **Genes de virulência**

Uma forma eficaz de caracterizar o patótipo APEC tem sido através da identificação de genes contidos em grandes plasmídeos, em particular o ColV e ColBM. Estes genes são utilizados como marcadores de virulência, pois estão frequentemente envolvidos no estabelecimento da infecção em aves (RODRIGUEZ-SIEK et al., 2005; SKYBERG et al., 2003; BINNS et al., 1979; WOOLEY et al., 1998).

Dentre os genes reconhecidamente descritos como responsáveis pela infecção aviária estão; o gene *tsh*, que codifica a proteína termossensível com propriedade hemaglutinante, responsável pela adesão da bactéria nos estágios iniciais da infecção (DOZOIS et al. , 2000; DELICATO et al. 2003; GYLES; FAIRBROTHER, 2010); os genes *cva/cvi*, que expressam a proteína colicina V, responsável pelo estabelecimento da bactéria no sítio de infecção, por inibir o crescimento de outras espécies competidoras (REEVES et al., 1972); os genes *iuc/iutA* responsáveis pela biossíntese de aerobactina e receptores para captação de ferro (Neilands , 1991; Delicato et al , 2003; . Dho -Moulin e Fairbrother , 1999; . Vidotto et al , 1990); e o gene *iss*, que expressa uma lipoproteína responsável por conferir resistência aos efeitos bactericidas do soro das aves (BINNS et al., 1982).

2.4 Gene *increased serum survival* (iss)

O gene *increased serum survival* (*iss*) foi descrito pela primeira vez por Binns et al. (1979) e algumas evidências sugerem que este é um gene conservado, responsável por mediar a resistência da bactéria aos efeitos bactericidas do soro do hospedeiro (Pfaff-McDonough et al., 2000; Johnson et al., 2006). Apontado como um dos mais prevalentes em isolados APEC (PFAFF - MCDONOUGH et al., 2000; NOLAN et al., 2003; MCPEAKE et al., 2005; RODRIGUEZ – SIEK et al., 2005), o gene *iss* tem sido sugerido como um promissor fator para a detecção e controle deste patótipo (CHUBA et al., 1989; HORNE et al., 2000; LYNNE et al., 2006).

Estudos genéticos indicam que o gene *iss* pode ter evoluído a partir de um precursor derivado do gene bacteriófago lambda chamado *bor* (CHUBA et al., 1989; BARONDESS; BECKWITH, 1990). Com localização no plasmídeo conjugativo ColV-BM, e em menor frequência dentro do cromossomo, o gene *iss* tem sido considerado um marcador de virulência do patótipo APEC por ser detectado em aproximadamente 80% dos isolados de infecções extraintestinais (PFAFF - MCDONOUGH et al., 2000; MCPEAKE et al., 2005; RODRIGUEZ- SIEK et al., 2005; DELICATO et al., 2003; JOHNSON et al., 2006, 2008; DERAKHSHANDEH et al., 2009; MELLATA et al., 2009).

Este gene é responsável por codificar uma lipoproteína, de 10-11 kDa, na membrana externa da APEC que impede o depósito da proteína C3, do sistema complemento, sobre a superfície bacteriana. Esta capacidade de bloquear o complexo terminal do sistema complemento das aves, evita a lise da célula e confere ao microrganismo a capacidade de sobreviver na presença do soro (BINNS et al., 1982; MELLATA et al., 2003; NOLAN et al., 1992).

A expressão deste gene foi sugerida por CHUBA et al. (1986) como responsável pelo aumento, em torno de 20 vezes, da capacidade de resistência das células bacterianas aos efeitos do soro. Desde então, outros estudos corroboram com esta premissa. Resultados encontrados por Nolan (2003), por exemplo, demonstraram a associação da presença do gene *iss* com a ação letal da APEC em embriões de frangos. Mellata et al. (2003), observaram uma correlação entre a resistência ao soro e a capacidade da bactéria em permanecer nos fluidos corporais e órgãos. Tivendale et al. (2004), demonstraram que este gene pode contribuir com a virulência da APEC, após exposição pela via natural, respiratória, da infecção.

2.5 Fatores que dificultam o controle da colibacilose

Os fatores relacionados disseminação desta infecção estão relacionados à crescente demanda no setor avícola, que resulta na superpopulação dos animais nos aviários. Dentre os predisponentes mais importantes estão às altas concentrações de amônia, dificuldade na ventilação dos galpões de criação, variações externas de temperatura, umidade da cama das aves, alta densidade de animais e a deficiência no processo de desinfecção dos galpões (REVOLLEDO et al., 2009).

Outro importante fator é a utilização terapêutica de antibióticos como promotores de crescimento nas aves (MOORE et al., 1946; JUKES et al., 1950). Esta prática, realizada há cerca de 50 anos em diversos países, possui foco nos micro-organismos presentes no intestino das aves. Adicionados à ração dos animais, os promotores de crescimento supostamente diminuem a população de micro-organismos patogênicos e controlam a produção de metabolitos tóxicos (JUKES et al , 1956 ;VISEK ,1978 ; ANDERSON et al , 1999). Com isto, o produtor de aves visa melhorar a taxa de crescimento e/ou eficiência da conversão alimentar, proporcionar aumento do desempenho e reduzir a mortalidade dos animais. Quando são utilizados com esta finalidade, os antibióticos promotores de crescimento devem ser administrados em pequenas quantidades na alimentação do animal (JUKES et al , 1956).

A utilização de antimicrobianos como promotores de crescimento continuamente pode trazer sérios prejuízos aos produtores de aves. Isto porque, muitas vezes por falta de conhecimento técnico de alguns produtores, os antibióticos são utilizados de forma indiscriminada, prolongada, em concentrações subterapêuticas e em terapias inadequadas de antibióticos de amplo espectro. Esta ação pode favorecer a seleção natural de linhagens altamente resistentes aos antimicrobianos e que possuem genes relacionados à patogenicidade com alta capacidade de recombinação genética (JOHNSON et al,. 2004). Além de ocasionar prejuízos econômicos aos produtores, a utilização inadequada dos antimicrobianos é particularmente preocupante, pois, pode oferece risco à saúde do consumidor através da ingestão da carne de aves contaminada por APEC (LEVY et al.,1976; SAIF et al., 2008).

2.6 Potencial zoonótico do patótipo APEC

Os mecanismos de virulência da APEC, além de serem reconhecidamente responsáveis pela colibacilose, podem, também, indicar o potencial zoonótico destas cepas. Hipóteses levantadas por alguns estudos sugerem que este patótipo seria uma possível fonte de genes de virulência para cepas de *E.coli* do microbioma intestinal dos seres humanos (JOHNSON et al, 2007).

Apesar do pouco conhecimento sobre o reservatório para este patótipo, a própria ave tem sido relatada como reservatório para APEC. Alguns estudos apontam o trato intestinal de neonatos como um ambiente favorável à colonização, onde APEC pode representar 24,05% dos isolados (MORRIS et al., 1997; LU et al., 2003; CHRISTENSEN et al., 2003; PETERSEN et al., 2006; FASENKO et al., 2009).

Embora APEC não seja capaz de causar infecção intestinal em aves, a presença desta cepa no intestino de aves saudáveis proporciona a disseminação, através das fezes, destes patógenos para o meio ambiente. E, como estas bactérias possuem a capacidade de persistir por longo período na poeira presente nos aviários (HARRY, 1964), a inalação deste aerossol pode desencadear a infecção sistêmica nas aves. A predominância de sorotipos O1, O2 e O78 em isolados de fezes de aves clinicamente saudáveis, reforçam a ideia de que o trato intestinal das aves pode ser um excelente reservatório para APEC (BLANCO et al . , 1998).

Além de representar um risco às aves, a presença de APEC no intestino em frangos de corte pode representar uma fonte de contaminação no processo de evisceração, através do conteúdo intestinal e da bile. O intestino e a vesícula biliar podem romper ou serem cortadas, contaminando a carcaça, tubo de sucção e os canais de evisceração (LACAZ R, R., 1992.).

Embora APEC não esteja diretamente relacionada com o estabelecimento de infecção nos seres humanos, acredita-se que, após a ingestão de carne de aves contaminadas, estes patótipos colonizam o trato intestinal e podem transferir seus genes de virulência às cepas do microbioma humano (IKE et al., 1992; WOOLEY et al., 1998). Neste processo, ocorre a transferência horizontal destes genes através da conjugação bacteriana, onde as bactérias doadoras de plasmídeos convertem as cepas não patogênicas em patogênicas.

Esta hipótese foi investigada após estudos demonstrarem que patótipos APEC e UPEC podem apresentar regiões do genoma idênticos, evidenciando que algumas ExPEC humanas e aviárias são altamente similares (KARIYAWASAM et al., 2007; RODRIGUEZ et al., 2005; JOHNSON et al. 2007). Estudos filogenéticos também ressaltam o potencial zoonóticos de isolados APEC. Cepas ExPEC do grupo B2 isoladas de hospedeiros humanos e aves foram indistinguíveis. Tais isolados demonstraram ser virulentas e similares quando inoculadas em aves (MOULIN-SCHOULEUR et al., 2007). O sequenciamento de patótipos APEC revelou que este grupo está intimamente relacionado com o grupo ExPEC associado a infecção no trato urinário de seres humanos (JOHNSON et al., 2007).

Com isto, tem sido considerado que a virulência da APEC não está, necessariamente, relacionada à sua fonte de isolamento e sim a sua filogenia (EWERS et al., 2009). E o não monitoramento de isolados das fezes, pode negligenciar a possibilidade destas bactérias em apresentar um ou mais genes que representam grupo de risco potencial para saúde das aves e, conseqüentemente, para os seres humanos (DELICATO et al., 2003; JOHNSON et al., 2006; MCPEAKE et al., 2005; VANDEKERCHOVE et al., 2005).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Pesquisar o potencial zoonótico de cepas de *Escherichia coli* isoladas de fígados de frangos aprovados para o consumo humano no Estado de Pernambuco.

3.2 Objetivos Específicos

- Coletar, isolar e identificar cepas de *E. coli* a partir de amostras do fígado de carcaças de frangos em um abatedouro localizado na região metropolitana do Recife;
- Avaliar o nível de multirresistência a antimicrobianos de uso animal e/ou humano dentre os isolados;
- Avaliar a resistência de isolados multirresistentes ao sistema complemento utilizando soro de aves e soro humano.
- Determinar o grupo filogenético dos isolados;
- Determinar a presença do gene *iss* nos isolados de forma a caracterizar as cepas APEC;

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, D. B., V. J. MCCRACKEN, R. I. AMINOV, J. M. SIMPSON, R. I. MACKIE, M. W. A. VESTEGEN, AND H. R. GASKINS. Gut microbiology and growth-promoting antibiotics in swine. *Pig News Inf.* 20:115N–122N. 1999.
- BARNES, H. J.; VAILLANCOUT, J. P.; GROSS, W. B. *Colibacillosis*. In: BARNES, H. J. et al. *Disease of Poultry*. Iowa: Iowa State Press-A Blackwell Publishing Company, 1231p. cap.18, p.631-656, 2003.
- BARONDESS, J.J.; BECKWITH, J. A bacterial virulence determinant encoded by lysogenic coliphage λ . *Nature*, v. 346, p. 871-874, 1990.
- BINNS, MM; DAVIES, DL AND HARDY, KG. Cloned fragments of the plasmid ColV, I-K94 specifying virulence and serum resistance. *Nature*. 279: 778-781. 1979.
- BINNS, M. M.; MAYDEN, J.; LEVINE, R. P. Further characterization of complement resistance conferred on *Escherichia coli* by the plasmid genes traT of R100 and iss of ColV, I-K94. *Infection and Immunity*, v. 35, n. 2, p. 654-659, 1982.
- BLATTNER F R, PLUNKETT G I, BLOCH C A, PERNA N T, BURLAND V, RILEY M, COLLADO-VIDES J, GLASNER J D, RODE C K, MAYEW G F, GREGOR J, DAVIS N W, KIRKPATRICK H A, GOEDEN M A, ROSE D J, MAU B, SHAO Y. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science*. 1997;277:1453–1461.
- BONACORSI S P P, CLERMONT O, TINSLEY C, LE GALL I, BEAUDOIN J C, ELION J, NASSIF X, BINGEN, E. Identification of regions of the *Escherichia coli* chromosome specific for neonatal meningitis-associated strains. *Infect Immun*. 2000;68:2096–2101.
- BORDALO, A.A.; ONRASSAMI, R.; DECHSAKULWATANA, C.. Survival of faecal indicator bacteria in tropical estuarine waters (Bangpakong River, Thailand). 2002 / 47: received 21 January 2002, revised 6 June 2002 and accepted 16 August 2002..
- CHOUIKHA I. A *selC*-associated genomic island of the extraintestinal avian pathogenic *Escherichia coli* strain BEN2908 is involved in carbohydrate uptake and virulence. *J. Bacteriol.* 188:977–987. 2006.
- CHRISTENSEN, JP; CHADFIELD, MS; BOJESEN AM; BISGAARD, M. Investigations on the clonality of *E. coli* infections in industrial poultry production. Proceedings from the XIII Congress of the World Veterinary Poultry Association,. Denver, USA. 83. 2003.

CHUBA, P. J.; PALCHAUDHURI, S.; LEON, M. A. Contributions of *traT* and *iss* genes to the serum resistance phenotype of plasmid ColV2-K94. *FEMS Microbiology Letters*, v. 37, p. 135-140, 1986.

CHUBA, P.J.; LEON, M.A.; BANERJEE, A.; PALCHAUDHURI, S. Cloning and DNA sequence of plasmid determinant *iss*, coding for increased serum survival and surface exclusion, which has homology with lambda DNA. *Molecular and General Genetics*, v. 216, p. 287-292, 1989.

CLAUDE, S, J; LE VAILLANT, G; GUILLERMOU, G et al. Prediction of faecal contamination in shellfish production areas: Interest and limits of the salinity parameter. Ifremer, Laboratoire de Microbiologie, BP 80, 29280 Plouzané, France. June 2009.

CORTES MA. Inactivation of *ibeA* and *ibeT* results in decreased expression of type 1 fimbriae in extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strain BEN2908. *Infect. Immun.* 76:4129–4136. 2008

DELICATO, E. R., B. G; DE BRITO, L. C; GAZIRI, AND M. C; VIDOTTO. Virulence-associated genes in *Escherichia coli* isolates from poultry with colibacillosis. *Vet. Microbiol.* 94:97–103. 2003.

DHO-MOULIN, M; FAIRBROTHER J. M. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Review. Vet. Res.* **30**,299-316. (1999).

DOZOIS, C.M.; DAIGLE, F; CURTISS, R. Identification of pathogen-specific and conserved genes expressed in vivo by an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. *PNAS.* **100**, 247-252. 2003.

DZIVA F, STEVENS MP. Colibacillosis in poultry: unraveling the molecular basis of virulence of avian pathogenic *Escherichia coli* in their natural hosts. *Avian Pathol.* 37:355–366. 2008.

EWERS C., JANSSEN T., KIESSLING S., PHILIPP H.C., WIELER L.H. Molecular epidemiology of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from colisepticemia in poultry. *Veterinary Microbiology*, v.104, p.91-101, 2004.

EWERS, C; ANTÃO E.M; INES DIEHL; HANS-C; LOTHAR , H. Intestine and Environment of the Chicken as Reservoirs for Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*

- Strains with Zoonotic Potential. *applied and environmental microbiology*, jan. 2009, p. 184–192 vol. 75, 2009.
- FASENKO, GM; CHRISTOPHER, EEOD; MCMULLEN, LM. Spraying hatching eggs with electrolyzed oxidizing water reduces eggshell microbial load without compromising broiler production parameters. *Poultry Science* 88: 1121–1127. 2009.
- FERREIRA, A.J.P.; KNÖBL, T. Colibacilose Aviária. In: BERCHIERI JUNIOR, A. & MACARI, M. (Eds.). *Doenças das aves*. Campinas: Facta,. p.197-207, 2000.
- FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. *Microorganismos Patogênicos de Importancia em Alimentos*. In:_____. *Microbiologia dos Alimentos*. São Paulo: Atheneu, 182p. p.51-55, 1996.
- GROSS W.B. Colibacillosis, p.138-144. In: Calnek B.W., Barnes H.J., Beard C.W., Reid W.M. & Yoder J.H.W. (Eds), *Disease of Poultry*. 9th ed. Iowa State University Press, Ames. 1991.
- GROSS, W.B. Diseases due to *Escherichia coli* in poultry. In: GYLES, C.L. *Escherichia coli in domestic animals and humans*. Oxon: CAB international, p.237-259. 1994.
- GYLES C.L.; FAIRBROTHER J.M. Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals. *Escherichia coli*, p. 267-308. In: Gyles C.L., Prescott J.F., Songer J.G. & Thoen C.O. (Eds), 4th ed. Iowa: Wiley-Blackwell, Ames, Iowa. 2010.
- HACKER, J., G; BLUM-OEHLER, I. Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. *Mol. Microbiol.* 23:1089–1097. 1997.
- HARRY, E.G. The survival of *Escherichia coli* in the dust of poultry houses. *The Veterinary Record*, 76, 466_470. 1964.
- HAZEN, T. Fecal coliforms as indicators in tropical waters: A review. *Toxic Assess.* 3, 461–477. 1988.
- HERZER, P. J; S. INOUE; M. INOUE; T. S. Whittam. Phylogenetic distribution of branched RNA-linked multicopy single-stranded DNA among natural isolates of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 172:6175–6181. 1990.

HOLT, J. G.; KRIEG, N. R., SNEATH, P. H., STALEY, J. T. & WILLIAMS, S. T. *Facultatively Anaerobic Gram-Negative Rods*. In:_____. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 787p. cap.5, p.175-255, 1994.

IKE, K.; KUME, K.; KAWAHARA, K.; DANBARA, H. Serotyping of O and Pilus antigens of *Escherichia coli* strains isolated from chicks with colisepticemia. Jpn. J. Vet. Sci., v.52, p.1023–7, 1990.

JOHNSON J.R., DELAVARI P., KUSKOWSKI M., STELL A.L.. Phylogenetic distribution of extraintestinal virulence-associated traits in *Escherichia coli*, J. Infect. Dis. 183 78–88. 2001.

JOHNSON, J.R., RUSSO, T.A. Uropathogenic *Escherichia coli* as agents of diverse non-urinary tract extraintestinal infections. J. Infect. Dis. 186, 859–864. 2002.

JOHNSON, T.J.; SKYBERG, J.; NOLAN, L.K. Multiple antimicrobial resistance region of a putative virulence plasmid from *Escherichia coli* isolate incriminated in avian colibacillosis. Avian Dis., v. 48, p. 351-360, 2004.

JOHNSON, JR; RUSSO TA: Molecular epidemiology of extraintestinal pathogenic (uropathogenic) *Escherichia coli*. *Int J Med Microbiol*, 295:383-404. 2005.

JOHNSON T.J., SIEK K.E., JOHNSON S.J. & NOLAN L.K. DNA sequence of a ColV plasmid and prevalence of selected plasmidencoded virulence genes among avian *Escherichia coli* strains. J. Bacteriol.188(2):745-758. 2006.

JOHNSON TJ, KARIYAWASAM S, WANNEMUEHLER Y, MANGIAMELE P, JOHNSON SJ, DOETKOTT C, SKYBERG JA, LYNNE AM, JOHNSON JR, NOLAN LK. The genome sequence of avian pathogenic *Escherichia coli* strain O1: K1:H7 shares strong similarities with human extraintestinal pathogenic *E.coli* genomes. J. Bacteriol. 189:3228 –3236. 2007.

JUKES, T. H., E. L. R. STOKSTAD, R. R. TAYLOR, T. J. COMBS, H. M. Edwards and G. B. Meadows. 1950. Growth promoting effect of aureomycin on pigs. Arch. Biochem. 26:324–330.

JUKES, T. H., D. C. HILL AND H. D. Branion. 1956. Effect of feeding antibiotics on the intestinal tract of the chick. Poult. Sci. 35:716–723.

- KAPER, J.B., NATARO, J.P., MOBLEY, H.L. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 123–140. 2004.
- KARIYAWASAM, S.; SCACCIANOCE, J. A.; NOLAN, L. K. Common and specific genomic sequences of avian and human extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* as determined by genomic subtractive hybridization. *BMC Microbiology*, 2007.
- KONEMAN, E.W. et al. *Diagnóstico Microbiológico*, MEDSI, Rio de Janeiro, 1465p, 2008.
- LACAZ RUIZ, ROGÉRIO. *Microbiologia zootecnic*. São Paulo. Roca, 1992.
- LA RAGIONE, R. M; M. J. WOODWARD. Virulence factors of *Escherichia coli* serotypes associated with avian colisepticaemia. *Res. Vet. Sci.* 73:27–35. 2002.
- LEVY, S. B; G. B. FITZGERALD; A. B. MACONE. Spread of Antibioticresistant plasmids from chicken to chicken and from chicken to man. *Nature* 260:40–42. 1976.
- LU JR, IDRIS U, HARMON B, HOFACRE C, MAURER JJ, et al. Diversity and succession of the intestinal bacterial community of the maturing broiler chicken. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 6816–6824. 2003.
- MCPEAKE, SJ; SMYTH, JA AND BALL, HJ. Characterization of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) associated with colisepticaemia compared to faecal isolates from healthy birds. 2005.
- MELLATA, M.; DHO-MOULIN, M.; DOZOIS, C. M.; CURTIS III, R.; BROWN, P. K., ARNÉ, P.; BRÉE, A.; DESAUTELS, C.; FAIRBROTHER, J. M. Role of virulence in resistance of avian pathogenic *Escherichia coli* to serum and pathogenicity. *Infection and immunity*, Washington, v. 71, n. 1, p. 536-540, 2003.
- MERCK. *Manual de medios de cultivo*. Darmstadt, Alemanha: MERCK, 364p, 1994.
- MORA, A., LOPEZ, C., DABHI, G., BLANCO, M., BLANCO, J.E., ALONSO, M.P., HERRERA, A., MAMANI, R., BONACORSI, S., MOULIN-SCHOULEUR, M., BLANCO, J. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* O1:K1:H7/NM from human and avian origin: detection of clonal groups B2 ST95 and D ST59 with different host distribution. *BMC Microbiol.* 9, 132. 2009.

MOORE, P. R., A. EVENSON, T. D. LUCKEY, E. MCCOY, E. A. ELVEHJEM, AND E. B. HART. 1946. Use of sulphasuccidine, streptothricin and streptomycin in nutrition studies with the chick. J. Biol. Chem. 165:437–441.

MORRIS JG; POTTER M Emergence of new pathogens as a function of changes in host susceptibility. Emerging Infectious Diseases 3: 435–441. (1997).

MOULIN-SCHOULEUR, M., SCHOULER, C., TAILLIEZ, P., KAO, M.R., BRE´ E, A., GERMON, P., OSWALD, E., MAINIL, J., BLANCO, M., BLANCO, J. Common virulence factors and genetic relationships between O18:K1:H7 *Escherichia coli* isolates of human and avian origin. J. Clin. Microbiol. 44, 3484–3492. 2006.

MOULIN-SCHOULEUR, M; SYLVIE LAURENT; ANNIE B et al,. Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* Strains of Avian and Human Origin: Link between Phylogenetic Relationships and Common Virulence Patterns journal of clinical microbiology, oct. 2007.

NEILANDS, J.B. Mechanism and regulation of syntesis of aerobactin in *E. coli* K12 (pColV-K30). Can. J. Microbiol. **38**: 728-733. 1991.

NOLAN, LK; HORNE, SM; GIDDINGS, CW; FOLEY, SL; JOHNSON, TJ; LYNNE, AM AND SKYBERG, J. Resistance to serum complement, *iss* and virulence of avian *Escherichia coli*. Vet. Res. Commun., 27: 101-110. 2003.

PELCZAR JUNIOR, M.J.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R. Microbiologia, conceitos e aplicacoes. 2. ed. Sao Paulo: Makron Books do Brasil,v.2, p.111-125.1997.

PETERSEN, A; CHRISTENSEN, JP; KUHNERT, P; BISGAARD, M; OLSEN, JE. Vertical transmission of a fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* within an integrated broiler operation. Veterinary Microbiology 116: 120–128. 2006.

PFAFF-MCDONOUGH, SJ; HORNE, SM; GIDDINGS, CW; EBERT, JO; DOETKOTT, C; SMITH, HM AND NOLAN, LK. Complement resistance related traits among *Escherichia coli* isolates from apparently healthy birds and birds with colibacillosis. Avian Dis., 44: 23-33. 2000.

POMMEPUY, M.; HERVIO-HEAT, D.; CAPRAIS, M.P.; GOURMELON, M; LE SAUX, J.C.; LE GUYADER, L. Fecal Contamination in Coastal Areas: An Engineering Approach.

Ifremer, Centre de Brest, BP 70, 29280 Plouzanée, France. *Oceans and Health: Pathogens in the Marine Environment*. Edited by Belkin and Colwell, Springer, New York, 2005.

REEVES, P. The bacteriocins. In: Klein, A.; Springer, G. F.; Wittmann, H. G. (Ed.). *Molecular biology biochemistry and biophysics*. New York: Springer Verlag, p. 1-142. 1972.

REVOLLEDO L; ANTONIO J. PIANTINO FERREIRA. *Patologia aviária*. Barueri, SP: Manole, 2009.

ROCHA, A.C.G.P.; SILVA, A.B.; BRITO, B.G.; MORAES, H.L.S.; PONTES, A.P.; CÉ, M.C.; NASCIMENTO, V.P.; SALLE, C.T.P. Virulence factors of avian pathogenic *Escherichia coli* isolated from broilers from the south of Brazil. *Avian Disease*, v.46, n.3, p.749-753, 2002.

RUSSO TA; JOHNSON JR: proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *J Infect Dis*, 181:1753-1754. Smith, H. W. Observations on the flora of the alimentary tract of animals and factors affecting its composition. *J. Path. Bact.* v.89, p.95-122, 1965. 2000.

SAIF, Y. M. *Diseases of poultry*. Blackwell Publishing, Ames, IA. 2008.

SAVAGEAU, MA. *Escherichia coli* habitats, cell types and molecular mechanisms of gene control. *Am Nat* 122: 732–744. 1983.

SILVA, J.A. As novas perspectivas para o controle sanitário dos alimentos. *Higiene Alimentar*, v.13, n.65, p.19-25, 1999.

TIVENDALE, K. A., J. L. ALLEN, C. A. GINNS, B. S. CRABB, AND G. F. BROWNING. Association of *iss* and *iucA*, but not *tsh*, with plasmid-mediated virulence of avian pathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 72:6554–6560. 2004.

TIVENDALE, K.A., LOGUE, C.M., KARIYAWASAM, S., JORDAN, D., HUSSEIN, A., LI, G., WANNEMUEHLER, Y., NOLAN, L.K. Avian-pathogenic *Escherichia coli* strains are similar to neonatal meningitis *E. coli* strains and are able to cause meningitis in the rat model of human disease. *Infect. Immun.* 78, 3412–3419. 2010.

TORRES A.G. AND S.M. PAYNE. 1997. Haem iron-transport system in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Mol. Microbiol.* 23: 825–833.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L.. Anatomia funcional das células procarióticas e eucarióticas. In:_____.Microbiologia. Porto Alegre: Artmed. 6 ed. 822p. cap 4 p. 76-110, 2003.

VANDEKERCHOVE, D., F. VANDEMAELE, C. ADRIAENSEN, M. ZALESKA, et al., Virulence-associated traits in avian *Escherichia coli*: comparison between isolates from colibacillosis-affected and clinically healthy layer flocks. Vet. Microbiol. 108:75-87. 2005.

VARNAN, A. H.; EVANS, M. G. Foodborn Pathogens. An Illustrated Text. London: Marison. 557p. Publishing, 1996.

VIDOTTO M.C., NAVARRO H.R. & GAZIRI L.C.J. Adherence pili of pathogenic strains of avian *Escherichia coli*. Vet. Microbiol. 59(1):79-87. 1997.

VISEK, W. J. 1978. The mode of growth promotion by antibiotics. J. Anim. Sci. 46:1447–1469.

WATERS, VL AND CROSA, JH (1991). Colicin V virulence plasmids. Microbiol. Rev., 55: 437-450.

WOOLEY, R.E.; GIBBS, P.S.; BROWN, T.P.; GLISSON, J.R.; STEFFENS, W.L.; MAURER, J.L. Colonization of the chicken trachea by avirulent avian *Escherichia coli* transformed with plasmid pHK11. Avian Dis., v.42, p.194–8, 1998.

5. MANUSCRITO

Potencial patogênico de *Escherichia coli* isoladas de carcaças de frango aprovadas para o consumo humano no Estado de Pernambuco, Brasil

Renata Valença Vaz¹, Gisele Veneroni Gouveia², Jacqueline Ellen Camelo Batista¹, Nelito Jorge Andrade Monteiro¹, Mateus Matiuzzi da Costa², José Vitor Lima-Filho^{1*}

¹Laboratório de Microbiologia e Imunologia, Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife-PE – Brasil;

²Laboratório de Microbiologia e Imunologia Animal, Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina-PE – Brasil;

*Departamento de Biologia, Laboratório de Microbiologia e Imunologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, R. Dom Manoel de Medeiros s/n, Campus Dois Irmãos, Recife, Pernambuco, CEP 52171-900, Brasil. E-mail: jvitor@db.ufrpe.br - Tel: + 55 31 81 3320.6312 - Fax: + 55 31 81 3320.6300.

Artigo a ser submetido para a revista Foodborne Pathogens and Disease. ISSN: 1535-3141. Fator de Impacto JCR (2011): 2.260; QUALIS B1 na área de Medicina Veterinária.

Resumo

No presente estudo, o potencial patogênico de *Escherichia coli* isoladas de amostras de fígados de frango de carcaças aprovadas para o consumo humano foi investigado. As amostras (n = 110) foram obtidas de um abatedouro no Estado de Pernambuco, Brasil, e 88 isolados bacterianos foram identificados de forma presuntiva em Ágar Eosina Azul de Metileno. O perfil de resistência aos antibióticos desses isolados foi avaliado pelo método de disco-difusão, segundo critérios estipulados pelo Comitê para Padronização de Laboratórios Clínicos (CLSI). A seguir, dez isolados resistentes a antibióticos de três ou mais classes e dez susceptíveis foram selecionados e submetidos a testes de resistência ao soro sanguíneo de frango e humano. Nossos resultados demonstraram a existência de isolados com fenótipos de resistência à Estreptomicina (84,04%), Tetraciclina (44,68%), Amicacina (29,78%), Ceftazidina (21,27%) e Gentamicina (21,27%). Ainda, de maneira geral, os isolados multirresistentes aos antibióticos também apresentaram resistência aos efeitos bactericidas do soro de aves e ao soro humano. Estes isolados (n = 20) foram investigados filogeneticamente e pesquisados em relação à presença do gene *iss* (*increased serum survival*). Foi observado que os isolados apresentaram-se distribuídos filogeneticamente entre os quatros principais grupos (B2, D, B1, A) e sete isolados dos grupos B2, D e B1 apresentaram o gene *iss*. Em conclusão, nossos resultados apontam a presença de cepas de *E. coli* multirresistentes aos antibióticos e potencialmente patogênicas em carcaças de frango aprovadas para o consumo humano.

Palavra chave: 1. Potencial patogênico 2. *Escherichia coli* 3. Carcaça de frango.

Introdução

Membros do grupo *Escherichia coli* Patogênica Extraintestinal (ExPEC) tem recebido considerável atenção devido a sua complexa capacidade de causar infecções extraintestinais em animais e seres humanos (Johnson e Russo, 2002; 2005). O termo *E. coli* patogênica aviária (APEC) é utilizado para designar o agente etiológico responsável pela infecção extraintestinal em aves (Delicato et al., 2003). A colibacilose sistêmica ou localizada é uma doença multifatorial que possui caráter secundário e pode acometer galinhas, perus, papagaios e outras espécies de aves (Barnes et al., 1997). Dentre os fatores de virulência frequentemente descritos na literatura, a resistência ao complemento sérico codificada pelo gene *increased serum survival (iss)* tem sido considerado um marcador de virulência do patótipo APEC, por ser detectado em aproximadamente 80% dos isolados de infecções extraintestinais (Pfaff - McDonough et al., 2000; Delicato et al., 2003; McPeake et al, 2005 ; Rodriguez- Siek et al., 2005; Johnson et al, 2008; Derakhshandeh et al, 2009; Mellata et al., 2009).

Embora APEC não cause infecção intestinal em aves, a presença desta cepa no intestino de aves saudáveis proporciona sua disseminação para o meio ambiente através das fezes. Ainda, a predominância de *E. coli* sorotipos O1, O2 e O78 nas fezes de aves clinicamente saudáveis, reforça a ideia de que o trato intestinal das aves pode ser um excelente reservatório para APEC (Blanco et al., 1997). A fim de reduzir as perdas econômicas, os produtores de aves optam pela adição de antibióticos na ração animal de forma a controlar o crescimento indesejado de certas populações microbianas, melhorar a taxa de crescimento e/ou eficiência da conversão alimentar, proporcionar aumento do desempenho e reduzir a mortalidade das aves (Jukes et al, 1956). Porém, tal prática tem conduzido à seleção natural de linhagens bacterianas antibiótico-resistentes que também servem como fontes de genes de virulência e possuem alta capacidade de recombinação genética.

Embora APEC não seja diretamente correlacionada com infecções nos seres humanos acredita-se que, após a ingestão de carne de aves contaminadas, estes patótipos colonizem o trato intestinal e transfiram genes de virulência às cepas do microbioma humano (Ike et al., 1990; Wooley et al., 1998). Esta hipótese foi confirmada após estudos demonstrarem que patótipos APEC e *E.coli* patogênica urogenital (UPEC) apresentam regiões do genoma idênticos, evidenciando que algumas ExPEC humanas e aviárias são altamente similares (Rodriguez-Siek et al., 2005; Johnson et al. 2007; Kariyawasam et al., 2007). Considerando a análise filogenética de isolados de *E. coli* de diversos hospedeiros e regiões geográficas distintas, foram demonstrados quatro principais grupos: A, B1, B2 e D (Herzer et al., 1990; Hacker e Blum-Oehler, 1997; Johnson e Russo, 2002; La Ragione e Woodward, 2002). Segundo esta classificação, cepas com potencial patogênico pertencem principalmente para o grupo B2 e D enquanto que as cepas comensais pertencem ao grupo B1 e A (Bingen et al., 1998; Boyd e Hartl, 1998; Johnson e Stell, 2000). Assim, estudos filogenéticos também ressaltam o potencial zoonótico de isolados APEC (Ewers et al., 2009). Considerando o risco à saúde pública da ingestão da carne de frango contaminada por APEC resistentes a antibióticos, neste estudo *Escherichia coli* isoladas de fígados de frangos aprovados para o consumo humano no Estado de Pernambuco foram investigadas.

Material e Métodos

Obtenção das amostras

O total de 110 amostras de fígados de frango, aprovados para o consumo humano, foi obtido de um abatedouro avícola localizado na região metropolitana do Recife. As aves abatidas foram provenientes de três granjas diferentes localizadas nos municípios de Pombos (n=50), Camaragibe (n=30) e Paudalho (n=30), localizados no estado de

Pernambuco – Brasil. As amostras de fígado foram coletadas assepticamente, acondicionadas em recipientes estéreis e levadas ao Laboratório de Microbiologia e Imunologia do Departamento de Biologia da UFRPE, onde foram processadas.

Identificação de *Escherichia coli*

Os fígados coletados foram macerados e 1 g foi adicionado a 9 mL de meio de cultura líquido - Caldo Infusão de Cérebro Coração (*Brain Heart Infusion* - BHI), a fim de promover o enriquecimento das amostras, por 24h a 37°C. A partir das culturas, foi realizada semeadura por estrias em placas contendo meio seletivo ágar Eosina Azul de Metileno (EMB), que foram incubadas por 24h a 37°C. As colônias típicas, de cor verde com brilho metálico, foram confirmadas fenotipicamente como *E. coli* através dos testes bioquímicos (Koneman et al., 2001).

Testes de sensibilidade em disco

No teste de antibiograma, discos de papel de filtro impregnados com concentrações conhecidas de antibióticos foram adicionados às placas de Petri contendo Ágar Mueller-Hinton e semeadas com auxílio de um suabe com inóculo contendo 10^8 células/ mL (0,5 de turbidez na escala de MacFarland) dos isolados bacterianos. Após incubação das placas por 18-24 horas em estufa a 37° C, o diâmetro do halo inibitório formado foi medido com auxílio de um paquímetro. Os antibióticos testados foram: Amoxicilina- ácido clavulânico (10 µg), Cefalotina (30 µg), Ceftazidina (30 µg), Aztreonam (30 µg), Imipenem (10 µg), Gentamicina (10 µg) Amicacina (30 µg), Estreptomicina (10 µg), Ciprofloxacina (5 µg), Levofloxacina (5 µg), Cloranfenicol (30 µg) e Tetraciclina (30 µg). Os isolados foram classificados como sensíveis, com sensibilidade intermediária ou resistentes, segundo critérios do órgão internacional “Comitê para Padronização de Laboratórios Clínicos” (CLSI, 2012).

Ensaio de resistência ao complemento sérico

O ensaio de resistência ao complemento foi realizado a partir de metodologia adaptada de Samuelsen et al (2004). Amostras de sangue obtidas de aves e de um ser humano voluntário foram coletadas separadamente em tubos estéreis e deixados coagular. Logo após, cada amostra foi centrifugada (7000 rpm/ 5 min) e o soro sanguíneo separado em um novo tubo.

A seguir, 190 µL do soro de ave foram adicionados a 10 µL de uma suspensão contendo os isolados de *E. coli* (1×10^7 UFC/ mL). Após 60, 120, 240 e 360 min, alíquotas de 0,1 mL foram retiradas de cada tubo e semeadas em Agar MacConkey para enumeração das unidades formadoras de colônias. O mesmo procedimento foi realizado para o teste com o soro humano.

Uma cepa de *E. coli* comensal da bacterioteca do Laboratório de Microbiologia e Imunologia (Depto. de Biologia/ UFRPE), sensível ao soro humano ou animal, foi utilizada como controle negativo para resistência sérica.

Caracterização filogenética

As análises filogenéticas e a pesquisa do gene *iss* foram realizadas no laboratório de Microbiologia e Imunologia Animal da Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF), Petrolina-PE. A extração do DNA de *E.coli* foi feita através da lise térmica de acordo com Sá de Aquino (2013).

As análises filogenéticas foram realizadas por meio de reação em cadeia da polimerase (PCR), conforme descrito por Clermont et al (2000). As reações foram realizadas com um volume final de 25 µl, contendo os seguintes reagentes: tampão de

enzima 1X (10 mM de Tris-HCl pH 8,5, 50mM de KCl), 2 mM MgCl₂, 0,4 mM dNTP , 0,4 µM de cada *primer*, 2.5 U de *Taq* DNA polimerase, 15 µl de água MilliQ e 3 µl de DNA molde.

As sequências dos *primers* utilizados foram descritas por Clermont et al (2000): *ChuA*: forward GACGAACCAACGGTCAGGAT e reverse TGCCGCCAGTACCAAAGACA (279pb). *YjaA*: forward TGAAGTGTTCAGGAGACGCTG e reverse ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC (211pb). *TspE4C2*: forward GAGTAATGTTCGGGGCATTCA e reverse CGCGCCAACAAAGTATTACG (152pb). Para realização da PCR foram utilizadas as seguintes condições: Desnaturação por 5min a 94°C; 30 ciclos de 30s a 94°C, 30s a 55°C, e 30s a 72°C; e extensão final por 7min a 72°C. Os resultados das PCRs foram visualizados em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo.

Pesquisa do gene *iss*

A pesquisa do gene *iss* foi adaptada da metodologia descrita por Johnson et al (2008b). As reações foram realizadas com um volume final de 25 µl contendo os seguintes reagentes: tampão de enzima 1X (10 mM de Tris-HCl pH 8,5, 50 mM de KCl), 2 mM MgCl₂, 0,4 mM dNTP , 0,4 µM de cada *primer*, 2.5 U de *Taq* DNA polimerase, 15 µl de água MilliQ e 3 µl de DNA molde. A sequência do *primer* utilizado foi descrita por Johnson (2008): Forward CAGCAACCCGAACCACTTGATG e Reverse AGCATTGCCAGAGCGG CAGAA (323pb). Para realização da PCR foram utilizadas as seguintes condições: Desnaturação 4min a 94°C; 30 ciclos de 45s a 94°C, 45s a 55°C, e 60s a 72°C; e extensão final por 7min a 72°C. Os resultados das PCRs foram visualizados em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo.

Resultados

Dentre 110 amostras de fígados de frangos coletadas de carcaças aprovadas para o consumo humano, *E. coli* foi identificada em 88. Todos os isolados identificados foram submetidos ao teste de antibiograma com doze antibióticos utilizados na medicina humana e animal (Tabela 1). Segundo critérios estipulados pelo órgão internacional “Comitê para Padronização de Laboratórios Clínicos” (CLSI, 2012), nossos resultados demonstraram que os isolados apresentaram fenótipos resistência à Estreptomicina (84,04%), Tetraciclina (44,68%), Amicacina (29,78%), Ceftazidina (21,27%), Gentamicina (21,27%), Cloranfenicol (9,57%) Cefalotina (8,51%) e Levofloxacino (2,12%). Ainda, 10 isolados (2, 9, 12, 51, 54, 57, 59, 71, 72 e 73) apresentaram resistência a três ou mais classes de antibióticos e foram considerados multirresistentes. Esses isolados e outros 10 selecionados dentre àqueles com menor índice de resistência aos antibióticos (52, 53, 56, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66) foram submetidos ao teste de resistência ao complemento sérico de ave e humano.

Nossos resultados demonstraram que, com exceção do isolado 72, todos aqueles com fenótipos de multirresistência aos antibióticos também apresentaram resistência ao efeito bactericida do soro de ave (Figura 1). Particularmente, após 6 h de exposição ao soro, os isolados 54, 57, 71 e 73 apresentaram cerca de 10 vezes mais bactérias em relação ao inoculo inicial (aproximadamente 10^7 UFC/ mL). Contudo, dentre os isolados que apresentaram maior susceptibilidade aos antimicrobianos, seis se mostraram sensíveis ao soro de ave e quatro se mostraram resistentes (56, 60, 62 e 65) (Figura 1). Com relação à resistência ao soro humano dos isolados multirresistentes a antibióticos, os mesmos permaneceram em quantidades que variaram entre 10^4 e 10^6 UFC/ mL durante as seis horas em que foram expostas aos efeitos do complemento sérico, o mesmo sendo observado para os isolados mais sensíveis aos antimicrobianos, com exceção do isolado 52 (Figura 2).

A caracterização filogenética demonstrou que dentre os 10 isolados com fenótipos de multirresistência aos antimicrobianos, dois pertencem ao grupo D, seis fazem parte do grupo B1 e dois do grupo A (Tabela 2). Já dentre os isolados com fenótipos de susceptibilidade aos antimicrobianos, foi demonstrado que um isolado pertence ao grupo B2, um ao grupo D, cinco ao grupo B1 e três do grupo A (Tabela 2). A presença do gene *iss* foi detectada em apenas dois dos dez isolados multirresistentes aos antimicrobianos (2 e 54) e agrupados filogeneticamente em D e B1, respectivamente. Dentre os isolados susceptíveis aos antimicrobianos, o gene *iss* foi positivo para as cepas 62, 64, 65, pertencentes ao grupo B1, e 60 e 61, pertencentes aos grupos B2 e D, respectivamente.

Discussão

A utilização de antibióticos como promotores de crescimento é prática comum em diversos países, desde que foi associada com a melhora da taxa de crescimento, eficiência alimentar, aumento do desempenho e produção animal (Moore et al., 1946; Jukes et al., 1950). No entanto, esta prática é atualmente proibida na União Européia, considerando o acúmulo evidências sobre a possibilidade de transferência de transposons e plasmídeos conjugativos entre componentes da microbiota animal que conferem resistência a múltiplas drogas (Aarestrup et al, 2001).

No presente estudo, foi mostrado que um maior percentual de isolados de *E. coli* apresentou fenótipos de resistência aos antibióticos das classes dos aminoglicosídeos, tetraciclina, cefalosporinas e fluoroquinolonas. Tais antibióticos têm sido administrados em doses subterapêuticas em animais sem quadro infeccioso ou incluídos na ração (Barnes, 1958; Ferreira e Knöbl 2000; Xu, 2001). Resultados semelhantes sugerem a disseminação de cepas de *E.coli* resistentes à tetraciclina e estreptomicina, reforçando os riscos relacionados ao uso inadequado dos antimicrobianos (Lambie et al., 2000; Van Den Bogaard et al. 2001; Smith et al , 2007; Zakeri e Kashefi, 2012). É particularmente

preocupante a resistência às fluoroquinolonas, uma vez que este grupo de antibiótico é comumente utilizado no tratamento de infecções em seres humanos por possuir baixa toxicidade e amplo espectro de ação (Blanco et al, 1997; White et al., 2000; Hooper, 2001; Livermore et al., 2002; Vandemaele et al, 2003; Maslow et al , 2004).

Embora *E. coli* seja considerado um micro-organismo comensal intestinal, a disseminação de fenótipos resistentes a múltiplas drogas pode indicar a possível transferência de genes de virulência presentes no cromossomo ou plasmídeos, tais como como os que conferem resistência aos efeitos bactericidas do soro das aves (Johnson et al., 2004). A capacidade das cepas de *E.coli* em resistir aos efeitos bactericidas do soro é frequentemente associada à presença do gene *iss*, utilizado como marcador de virulência dos patótipos APEC (Dozois et al.,1992). No presente estudo, nós demonstramos que, frangos clinicamente saudáveis e aprovados para o consumo humano apresentaram fenótipos resistentes aos efeitos bactericidas do soro de ave. Entretanto, apenas sete isolado foram positivos para a presença do gene *iss*, sugerindo que outros genes podem estar envolvidos com a resistência ao soro em cepas comensais de *E. coli*. Resultados semelhantes foram descritos por Ewers et al (2009), que ao examinar *E.coli* isoladas de frangos clinicamente saudáveis, não verificou relação entre os fenótipos resistentes ao soro de ave com a presença do gene *iss*. O mesmo foi observado por Vandekerchove et al (2005), levantando a questão se o gene *iss* seria um útil marcador de virulência de cepas APEC.

Apesar de outros mecanismos de virulência tais como cápsula, lipopolissarídeos e o gene *traT*, que codifica uma proteína de membrana que dificulta a ação do sistema complemento, podem ser responsáveis por mediar à resistência ao soro hospedeiro e contribuir na virulência de cepas patogênicas extraintestinais (Mellata et al., 2003; Dziva, 2008), aqui nós mostramos que os isolados que apresentaram o gene *iss* estão distribuídos nos agrupamentos filogenéticos B1, B2 e D. Considerando que comumente

membros do grupo *E. coli* Patogênica Extraintestinal (ExPEC) estão associados ao grupo B2, e com uma menor frequência do grupo D, ficou claro que cepas supostamente comensais, ou seja, pertencentes ao grupo B1, também podem abrigar e possivelmente compartilhar genes de virulência como o *iss* (Russo e Johnson., 2000). Rodriguez-Siek et al (2005) também já haviam verificado a presença de isolados APEC no grupo filogenético A, reconhecido por ser constituído principalmente por cepas comensais de *E. coli* (Clermont et al., 2000). Moulin-Schouleur et al (2007) indicaram patótipos APEC distribuídos nos grupos B1, B2 e Ewers et al (2009) encontraram regular distribuição dos fenótipos de *E. coli*, resistentes ao soro, entre os grupos filogenéticos A, B1, B2, e D. Kobayashi et al (2011), ao analisar *E.coli* isoladas da carcaça de frango e carne de aves comerciais de varejo, apontou a classificação filogenética das cepas no grupo A.

Cepas APEC têm sido recuperadas a partir de fezes de aves aparentemente saudáveis (Rodriguez- Siek et al, 2005; Ewers et al, 2009), reforçando a ideia de que o trato intestinal das aves é um ambiente propício à troca de genes com cepas comensais.

Conclusão

Em conclusão, nossos dados indicam que cepas de *E. coli* isoladas de carcaça de aves aprovadas para o consumo humano representam um potencial risco de causar infecções em mamíferos e aves. Além disso, uma vez consumida na alimentação humana, a carne contaminada com tais cepas pode virtualmente servir como fonte de genes de resistência a antibióticos para bactérias do microbioma intestinal humano.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE) pela bolsa de estudos concedida ao primeiro autor. Agradecem também ao Laboratório de Microbiologia e Imunologia Animal, Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina-PE – Brasil pelo apoio dado às análises moleculares.

Referências bibliográficas

Aarestrup FM, Seyfarth AM, Emborg HD, Pedersen K, Hendriksen RS & Bager F. Effect of abolishment of the use of antimicrobial agents for growth promotion on occurrence of antimicrobial resistance in fecal enterococci from food animals in Denmark. *Antimicrob Agents Ch* 2001; 45: 2054–2059.

Barnes HJ, Vaillancout JP, Gross WB. *Colibacillosis*. In: Barnes, H. J. et al. *Disease of Poultry*. Iowa: Iowa State Press-A Blackwell Publishing Company, 2003. 1231p. cap.18, p.631-656.

Bingen EB, Picard N, Brahim S, Mathy P, Desjardins J, Elion E. Phylogenetic analysis of *Escherichia coli* strains causing neonatal meningitis suggests horizontal gene transfer from a predominant pool of highly virulent B2 group strains. *J. Infect. Dis.* 1998; 177:642–650.

Blanco JE, Blanco M, Mora A, Blanco J. Prevalence of Bacterial Resistance to Quinolones and Other Antimicrobials Among Avian *Escherichia Coli* Strains Isolated from Septicemic and Healthy Chickens in Spain. *J. Clin. Microbiol.* 1997; 35: 2184-2185.

Boyd EF, Hartl DL. Chromosomal regions specific to pathogenic isolates of *Escherichia coli* have a phylogenetically clustered distribution. *J. Bacteriol.* 1998; 180:1159–1165.

Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66, 4555–4558.

[CLSI] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-Second Informational Supplement. CLSI Document M100-S22. Wayne, PA: CLSI, 2012.

Delicato ERBG, De Brito LC, MC Vidotto. Virulence-associated genes in *Escherichia coli* isolates from poultry with colibacillosis. *Vet. Microbiol.* 2003; 94:97–103.

Derakhshandeh A, Zahraei Salehi T, Tadjbakhsh H, Karimi V. Identification, cloning and sequencing of *Escherichia coli* strain v1378 (O78:K80) ISS gene isolated from poultry colibacillosis in Iran. *Letter in Applied Microbiology* 2009; 49, 403–407.

Dho-Moulin M. Les *Escherichia coli* pathogènes des volailles. *Ann. Me´d. Ve´t.* 1993; 137, 353–357.

Dozois CM, Fairbrother JM, Harel J, Bosse´ M. Papand pil-related DNA sequences and other virulence determinants associated with *Escherichia coli* isolated from septicemic chickens and turkeys. *Infect. Immun.* 1992; 60, 2648–2656.

Dziva F, Stevens MP. Colibacillosis in poultry: unraveling the molecular basis of virulence of avian pathogenic *Escherichia coli* in their natural hosts. *Avian Pathol.* 2008.37:355–366.

Ewers C, Antão, EM, Ines Diehl, Hans-C; Lothar H. Intestine and Environment of the Chicken as Reservoirs for Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* Strains with Zoonotic Potential. *applied and environmental microbiology*, jan. 2009; 184–192 vol. 75, 2009.

Ferreira AJP, Knöbl T. Colibacilose Aviária. In: BERCHIERI JUNIOR, A. & MACARI, M. (Eds.). *Doenças das aves*. Campinas: Facta. 2000; 197-207.

Fricke WF, Wright MS, Lindell AH, Harkins DM, Baker-Austin C, Ravel J, Stepanauskas R. Insights into the environmental resistance gene pool from the genome sequence of the multidrug-resistant environmental isolate *Escherichia coli* SMS-3-5. *J Bacteriol.* 2008; 190: 6779–6794.

Galland JC, Hyatt DR, Crupper SS, Acheson DW. Prevalence, antibiotic susceptibility, and diversity of *Escherichia coli* O157:H7 isolates from a longitudinal study of beef cattle feedlots. *Appl. Environ. Microbiol.* 2001; 67:1619-1627.

Guardabassi L, Schwarz S, Lloyd DH. Pet animals as reservoirs of antimicrobial-resistant bacteria. *J Antimicrob Chemoth* 2004, 54: 321–332.

Guerra B, Junker E, Schroeter A, Malorny B, Lehmann S, Helmuth R. Phenotypic and Genotypic Characterization of Antimicrobial Resistance in German *Escherichia Coli* Isolates from Cattle, Swine and Poultry. *J. Antimicrob. Chemother.* 2003; 52: 489-492.

Hacker JG, BLUM-OEHLER I. Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. *Mol. Microbiol.* 1997; 23:1089–1097.

Herzer PJ, Inouye S, Inouye M, Whittam. Phylogenetic distribution of branched RNA-linked multicopy single-stranded DNA among natural isolates of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 172:6175–6181. 1990.

Hooper DC. Mechanisms of Action of Antimicrobials: Focus on Fluoroquinolones. Clin. Infect. Dis. 2001; 32: 9-15.

Ike K, Kume K, Kawahara K, Danbara H. Serotyping of O and Pilus antigens of *Escherichia coli* strains isolated from chicks with colisepticemia. Jpn. J. Vet. Sci., 1990; v.52, p.1023–7.

Johnson JR, Stell AL. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. J. Infect. Dis. 2000; 181:261–272.

Johnson JR, Russo TA. Uropathogenic *Escherichia coli* as agents of diverse non-urinary tract extraintestinal infections. J. Infect. Dis. 2002; 186, 859–864.

Johnson JR, Russo TA. Molecular epidemiology of extraintestinal pathogenic (uropathogenic) *Escherichia coli*. *Int J Med Microbiol*, 2005; 295:383-404.

Johnson TJ, Skyberg J, Nolan LK. Multiple antimicrobial resistance region of a putative virulence plasmid from *Escherichia coli* isolate incriminated in avian colibacillosis. Avian Dis., , 2004; 351-360.

Johnson TJ, Johnson JS, Nolan LK. Complete DNA sequence of a ColBM plasmid from avian pathogenic *Escherichia coli* suggests that it evolved from closely related ColV virulence plasmids. Journal of Bacteriology 2006; 188, 5975– 5983.

Johnson TJ, Kariyawasam S, Wannemuehler Y, Mangiamele P, Johnson SJ, Doetkott C, Skyberg JA, Lynne AM, Johnson JR, Nolan LK. The genome sequence of avian pathogenic *Escherichia coli* strain O1: K1:H7 shares strong similarities with human extraintestinal pathogenic *E.coli* genomes. J. Bacteriol. 2007; 189:3228 –3236.

Johnson JT, Wannemuehler MY, Nolan KL. Evolution of the ISS gene in *Escherichia coli*. Applied and Environmental Microbiology 2008a; 74, 2360–2369.

Johnson TJ, Yvonne Wannemuehler, Curt Doetkott, Sara J. Johnson, Sandra C. Rosenberger, Lisa K. Nolan. Identification of Minimal Predictors of Avian Pathogenic

Escherichia coli Virulence for Use as a Rapid Diagnostic Tool. J Clin Microbiol. December; 46(12): 2008b; 3987–3996.

Johnson JR, Kuskowski MA, Owens K, Clabots C, Singer RS. Virulence genotypes and phylogenetic background of fluoroquinolone-resistant and susceptible *Escherichia coli* urine isolates from dogs with urinary tract infection. Vet Microbiol 2009; 136: 108–114.

Jukes TH, Stokstad ELR, Taylor RR, Combs TJ, Edwards HM, Meadows GB. Growth promoting effect of aureomycin on pigs. Arch. Biochem. 1950. 26:324–330.

Kariyawasam S, Scaccianoce JA, Nolan LK. Common and specific genomic sequences of avian and human extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* as determined by genomic subtractive hybridization. BMC Microbiology, 2007.

Kobayashi RKT, Aquino I, Ferreira ALS, Vidotto MC. EcoR Phylogenetic Analysis and Virulence Genotyping of Avian Pathogenic *Escherichia coli* Strains and *Escherichia coli* Isolates from Commercial Chicken Carcasses in Southern Brazil. Foodborne Pathogens and Disease. 2011; 8(5): 631-634.

Koneman EW. *Diagnóstico Microbiológico*, MEDSI, Rio de Janeiro, , 2008. 1465p.

LA Ragione RM, WOODWARD MJ. Virulence factors of *Escherichia coli* serotypes associated with avian colisepticaemia. Res. Vet. Sci. 2002; 73:27–35.

Lambie N, Ngeleka M, Brown G, Ryan J. Retrospective study on *Escherichia coli* infection in broilers subjected to postmortem examination and antibiotic resistance of isolates in Trinidad. Avian. Dis. 2000; 44:155-160.

Livermore DM, James D, Reacher M, Graham C, Nichols T, Stephens P, Johnson AP, George RC. Trends in fluoroquinolone (ciprofloxacin) resistance in *Enterobacteriaceae* from bacteremias, England and Wales, 1990–1999. Emerg. Infect. Dis. 2002; 8:473–478.

Lynne MA, Skyberg AG, Logue MC, Nolan KL. Detection of ISS and BOR on the surface of *Escherichia coli*. Journal of Applied Microbiology 2007; 102, 660–666.

Maslow JN, Lautenbach E, Glaze T, Bilker W, Johnson JR. Colonization with extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* among nursing home residents and its relationship to fluoroquinolone resistance. Antimicrob Agents Ch 2004; 48: 3618–3620.

Mcpeake SJ, Smyth JA, Ball HJ. Characterization of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) associated with colisepticaemia compared to faecal isolates from healthy birds. 2005.

Mellata M, Dho-Moulin M, Dozois CM, Curtis R, Brown PK, Arné P, Brée A, Desautels C, Fairbrother JM. Role of virulence in resistance of avian pathogenic *Escherichia coli* to serum and pathogenicity. *Infection and immunity*, Washington, 2003; 536-540.

Mellata M, Touchman WJ, Curtiss R. Full sequence and comparative analysis of the plasmid pAPEC-1 of avian pathogenic *E. coli* v7122 (O78:K89:H9). *PLoS ONE* 2009; 4, 1–12.

Molbak K. Spread of resistant bacteria and resistance genes from animals to humans—the public health consequences. *J Vet Med B* 2004; 51: 364–369.

Moore PR, Evenson A, Luckey TD, McCoy E, Elvehjem EA, HART EB. Use of sulphasuccidine, streptothricin and streptomycin in nutrition studies with the chick. *J. Biol. Chem.* 1946. 165:437–441.

Moulin-Schouleur M, Sylvie Laurent, Annie B. Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* Strains of Avian and Human Origin: Link between Phylogenetic Relationships and Common Virulence Patterns *journal of clinical microbiology*, oct. 2007.

Nolan LK, Horne SM, Giddings CW, Foley SL, Johnson TJ, Lynne AM, Skyberg J. Resistance to serum complement, ISS and virulence of avian *Escherichia coli*. *Veterinary Research Communication* 2003; 27, 101–110.

Ochman H, Selander RK. Standard reference strains of *Escherichia coli* from natural populations. *J. Bacteriol.* 1984; 157:690–693.

Pfaff-McDonough SJ, Horne SM, Giddings CW, Ebert JO, Doetkott C, Smith HM, Nolan LK. Complement resistance related traits among *Escherichia coli* isolates from apparently healthy birds and birds with colibacillosis. *Avian Dis.*, 2000; 44: 23-33.

Rodriguez-Siek, K. E., C. W. Giddings, C. Doetkott, T. J. Johnson, and L. K. Nolan. Characterizing the APEC pathotype. *Vet. Res.* 2005; 36:241–256.

Russo TA, Johnson JR. proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *J Infect Dis*, 2000; 181:1753-1754.

Smith, H. W. Observations on the flora of the alimentary tract of animals and factors affecting its composition. *J. Path. Bact.* v.89, p.95-122, 1965. 2000.

Sá de Aquino, M.C; Gouveia, G.V; Krewer, C.C; Veschi, J.L.A; Mattos-Guaraldi, A.L; Costa, M.M. Distribution of PLD and FagA, B, C and D genes in *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates from sheep and goats with caseus lymphadenitis. *Genetics and Molecular Biology*, 2013; 36, 2, 265-268.

Saenz Y, Zarazaga M, Brinas L, Ruiz-Larrea F, Torres C. Mutations in GyrA and ParC Genes in Nalidixic Acidresistant *Escherichiacoli* Strains from Food Products, Humans and Animals. *J. Antimicrob. Chemother.* 2003; 51: 1001-1005.

Samuelsen Ø, Haukland HH, Ulvatne H, et al. Anti-complement effects of lactoferrin-derived peptides. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2004;41:141-8.

Smith JL, Fratamico PM, Gunther NW. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Foodborne Pathog Dis* 2007; 4: 134–163.

Van den Bogaard AE, London N, Driessen C, Stobberinhgh EE. Antibiotic resistance of faecal *Escherichia coli* in poultry, poultry farmers and poultry slaughterers. *J. Antimicrob. Chemother.* 2001; 47:763-771.

Vandekerchove D, Vandemaele F, Adriaensen C, Zaleska M. Virulence-associated traits in avian *Escherichia coli*: comparison between isolates from colibacillosis-affected and clinically healthy layer flocks. *Vet. Microbiol.* 2005; 108:75 87.

Vandemaele FJ, Mugasa JP, Vandekerchove D, Goddeeris BM. Predominance of the *papGII* allele with high sequence homology to that of human isolates among avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Vet. Microbiol.* 2003; 97:245–257.

White DG, Piddock LJ, Maurer JJ, Zhao S, Ricci V, Thayer SG. Characterization of Fluoroquinolone Resistance Among Veterinary Isolates of Avian *Escherichia Coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2000; 44: 2897-2899.

Wieser A, Romann E, Magistro G, Hoffmann C, Nörenberg D, Weinert K & Schubert S. A multiepitope subunit vaccine conveys protection against extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in mice. *Infect Immun* 2010; 78: 3432–3442.

Wooley RE, Gibbs OS, Brown TP, Glisson JR, Steffens WL, Maurer JL. Colonization of the chicken trachea by avirulent avian *Escherichia coli* transformed with plasmid pHK11. *Avian Dis.*1998; 194–8.

Xu, S. Actions China needs to take in response to the emergence of antimicrobial resistance. *Chinese J. Vet. Drugs* 2001; 35:39–41.

Zakeri, A.; Kashefi, P. Antimicrobial susceptibilities of avian *Escherichia coli* isolates in Tabriz, Iran *African Journal of Biotechnology*. 2012; 4467-4470.