

FLÁVIO SILVEIRA

**“CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS
BRASILEIROS DE *Escherichia coli* AVIÁRIA”**

**CAMPINAS
2013**



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

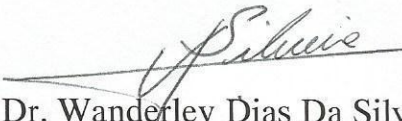
INSTITUTO DE BIOLOGIA

FLÁVIO SILVEIRA

**“CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS
BRASILEIROS DE ESCHERICHIA COLI AVIÁRIA”**

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) <u>FLÁVIO SILVEIRA</u>
é aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia da UNICAMP para
obtenção do Título de Mestre em
Genética e Biologia Molecular,
na área de Microbiologia.


Orientador: Prof. Dr. Wanderley Dias Da Silveira

CAMPINAS,
2013

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

Si39c Silveira, Flávio, 1986-
Caracterização molecular de isolados brasileiros de *Escherichia coli* aviária /
Flávio Silveira. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Wanderley Dias da Silveira.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de
Biologia.

1. *Escherichia coli* patogênica aviária. I. Silveira, Wanderley Dias, 1956-. II.
Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Molecular characterization of Brazilian strains of avian *Escherichia coli*

Palavras-chave em inglês:

Avian pathogenic *Escherichia coli*

Área de concentração: Microbiologia

Titulação: Mestre em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Wanderley Dias da Silveira [Orientador]

Ângelo Berchieri Junior

Marcelo Brocchi

Data de defesa: 20-06-2013

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular

Campinas, 20 de junho de 2013

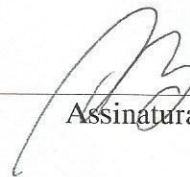
BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Wanderley Dias Da Silveira (orientador)



Assinatura

Prof. Dr. Marcelo Brocchi



Assinatura

Prof. Dr. Angelo Berchieri JUNIOR



Assinatura

Dra. Fabiana Fantinatti Garboggini

Assinatura

Dr. Oliveiro Caetano De Freitas Neto

Assinatura

AGRADECIMENTOS

À minha família (Eraldo de Vargas Silveira, Cleci Tibola Silveira, Polyanna Silveira) e minha segunda família (Silvia Rossato, Glademir Rossato, Lays Rossato e Ígor Gabriel Rossato), pela vida, razão dela, confiança e estímulos antes e durante todo esse período;

À Universidade Estadual de Campinas e ao Governo Federal, através do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo ensino de qualidade e pelo suporte financeiro durante o mestrado;

Ao Governo do Estado de São Paulo, através da FAPESP, por ter aprovado os projetos números 2010/51421-8 e 2012/04931-6, cujas verbas viabilizaram parte deste trabalho;

Ao Professor Doutor Wanderley Dias da Silveira, pela oportunidade, amizade e ensinamentos constantes;

Ao Dr. Renato Pariz Maluta (co-orientador), pelos auxílios constantes na elaboração da dissertação e pesquisas.

À Dr^a. Janaína Luisa Leite Garbim, Dr^a. Monique Ribeiro Tiba Casas e Dr^a. Jaqueline Boldrin de Paiva pela colaboração nas pesquisas e conselhos profissionais e pessoais.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular Bacteriana, Rena, Lívia, Bianca, Ricardo, Izildinha, Murilo, Thaís, Cris, Renú e Dona Luzia, pelo companheirismo, amizade e auxílio constante para meu crescimento pessoal e profissional;

Ao Movimento Estudantil da Unicamp, em especial a galera do Pró-Pós: Alan, Gutavo, Carol, Pedro, Gabi, Manassés, Hugo, Christian, Marcelo... À galera da Associação Nacional dos Pós-Graduandos: Luana, Hyllo, Jouhanna, Maíra, Flecha, Marcelinho, Juliano, Lenilton, Peixe, David e tantos outros que lutaram e que lutam para melhorar não só nossas condições para uma formação de qualidade, como pesquisadores, mas também nossa sociedade;

Aos meus parceiros da República Viracopos: Pedro, Randerson, Giovani, Johann, Kuririn, Kaleb, Amilcar, Bruno, Manaus, Sinop, Pipinho e Arthur;

Aos amigos Fernanda, Pablo, Nany, Leandro e Isa, pela parceria e amizade em Campinas;

Aos estudantes da UFMT - Campus de Sinop, parceiros de construção do conhecimento em Microbiologia, às turmas da Engenharia Agrícola e Ambiental, Engenharia Florestal e Agronomia, por quem torço e estimo muito! E que deram sentido à minha profissão e a quem me esforço a cada dia para ser considerado um educador.

*“Agora você é livre para achar os atalhos pela floresta.
Mas lembre-se: Ela é muito densa e quem volta, volta diferente.”*

Milton Hatoum

SUMÁRIO

ÍNDICE DE TABELAS	xi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xii
ÍNDICE DE QUADROS	xv
RESUMO	xvi
ABSTRACT	xviii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. Objetivo Geral.....	12
2.1 Objetivos Específicos	12
3. MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1 População estudada.....	13
3.2 Isolamento e identificação fenotípica de <i>Escherichia coli</i>	14
3.3 Preparação do extrato de DNA.....	15
3.4 Detecção de genes de virulência por PCR.....	15
3.5 Determinação de grupo filogenético por PCR	20
3.6 Determinação dos sorotipos	23
3.7 Teste de patogenicidade <i>in vivo</i>	23
3.8 Análise de Agrupamento dos Genes de Virulência	24
3.9 Análise Estatística	24
3.10 Meios de cultura e soluções	24
4 RESULTADOS.....	27
4.1 Teste de patogenicidade <i>in vivo</i>	27
4.2 Frequência de detecção dos genes relacionados à virulência	28
4.3 Determinação do Grupo Filogenético	35
4.4 Determinação dos sorogrupos	37
4.5 Caracterização geral das linhagens de <i>Escherichia coli</i> de origem aviária	42
4.6 Análise de agrupamento	48
5 DISCUSSÃO.....	54
5.1 Patogenicidade <i>in vivo</i>	55
5.2 Detecção dos genes associados à virulência (GAV).....	56

5.3 Tipagem filogenética	67
5.4 Determinação dos antígenos O e H	69
5.5 Análise de agrupamento	70
6 CONCLUSÃO	72
7 REFERÊNCIAS	73

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Local e origem de isolamento das linhagens analisadas.....	14
Tabela 2. Genes relacionados à virulência, sequências de nucleotídeos iniciadores, tamanho do produto de amplificação, temperatura de anelamento, controles e referências utilizadas para as PCRs.	18
Tabela 3. Sequência de nucleotídeos iniciadores para os genes <i>chuA</i> , <i>yjaA</i> e para o fragmento de DNA TspE4C2, tamanho do produto de amplificação e suas respectivas temperatura de anelamento.	22
Tabela 4. Frequência (%) dos genes relacionados à virulência em linhagens APEC e AFEC.	30
Tabela 5. Frequência (%) dos genes relacionados à virulência em linhagens de Alta/Média e Baixa patogenicidade.....	32
Tabela 6. Frequência (%) de detecção dos genes e genótipos do sistema de secreção tipo 6 (SST6) em linhagens de E. coli aviária.....	34
Tabela 7. Sorotipagem O e H para as linhagens de E. coli de alta, média e baixa patogenicidade.....	38
Tabela 8. Sorotipagem O e H para as linhagens APEC.	40
Tabela 9. Sorotipagem O e H para as linhagens AFEC.	40
Tabela 10. Caracterização molecular, filogenética, patogênica e sorológica das linhagens ditas APEC encaminhadas ao LBMB. Os fatores de virulência (FV) plasmidiais estão entre parênteses e na cor vermelha para melhor observação.	43
Tabela 11. Caracterização molecular, filogenética, patogênica e sorológica das linhagens ditas AFEC encaminhadas ao LBMB. Os genes plasmidiais associados à virulência estão entre parênteses e na cor vermelha para melhor observação.	46

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representação dos produtos de amplificação da PCR, de DNAs padrões e linhagens aleatórias, para os genes <i>fimH</i> , <i>irp-2</i> , <i>gimB</i> , <i>fepC</i> e <i>iucD</i> . Nas margens, está representado o marcador de peso molecular para 100 pares de base.	17
Figura 2. Árvore dicotômica para determinar o grupo filogenético de linhagens de <i>E. coli</i> , utilizando os resultados da PCR dos genes <i>chuA</i> , <i>yjaA</i> e o fragmento de DNA TspE4.C2.	21
Figura 3. Produtos da amplificação da PCR, de amostras aleatórias, para os genes <i>chuA</i> , <i>yjaA</i> e TspE4.C2. Nas margens, está representado o marcador de peso molecular de 100 pares de base.	22
Figura 4. Frequência de linhagens de <i>E. coli</i> de origem aviária como alta, média e baixa patogenicidade em teste com pintos de um dia de idade.	27
Figura 5. Tipos de lesões de colibacilose encontradas nas necropsias realizadas. A) Ave inoculada com linhagem não virulenta DH5 α ; B) Ave inoculada com linhagem RS44c; C) saco pericárdico sem alterações, D) Fígado sem alterações, E) Pericardite, F) Peri-hepatite.	28
Figura 6. Frequência de linhagens de <i>E. coli</i> consideradas APEC, AFEC e APEC por Estado, alocadas dentro de cada grupo filogenético de <i>E. coli</i>	35
Figura 7. Frequência de linhagens de <i>E. coli</i> de origem aviária de Baixa patogenicidade versus Alta e Média patogenicidade, alocadas dentro de cada grupo filogenético de <i>E. coli</i> . *(p<0,05) **(p<0,001).	36
Figura 8. Árvore de agrupamento das linhagens de <i>E. coli</i> de origem aviária conforme o perfil gênico. A identificação dos genes segue uma classificação em cores onde em preto estão os genes relacionados à fímbrias e adesinas (<i>fimH</i> , <i>crl</i> , <i>csgA</i> , <i>tsh</i> , <i>papC</i> , <i>lpf_{O157/O1-154}</i> , <i>hra</i> , <i>lpf_{O157/O1-141}</i> , <i>sfa</i> , <i>iha</i> e <i>afA</i>); vermelho estão os genes relacionados a captação de ferro (<i>iucD</i> , <i>iutA</i> , <i>iroN</i> , <i>sitDe</i> , <i>fepC</i> , <i>irp-2</i> , <i>fyuA</i> e <i>sitDc</i>); amarelo são os genes associados a resistência ao soro (<i>ompT</i> , <i>iss</i> , <i>traT</i> , <i>cvi</i> , <i>neuc</i> , <i>kpsMT2</i> e <i>kpsMT3</i>); verde são os genes relacionados a	

toxinas (*hlyF*, *ast*, *vat* e *sat*); azul estão os genes relacionados a invasinas (*ibeA* e *gimB*) e em lilás são os genes relacionados a fatores diversos (*vgrG*, *clpV*, *icmf*, *hcp*, *malX* e *pic*). Abaixo está a classificação das linhagens conforme a identificação como APEC (P), AFEC (F), Estado de origem (PE,SP, PR e RS), Patogenicidade (A=alta, M=média, B=baixa). I, IIa, IIb, IIc e as respectivas linhas cinza, marrom, azul e rosa representam os agrupamentos encontrados..... 49

Figura 9. Árvore de agrupamento das linhagens de *E. coli* de origem aviária conforme o perfil de genes que apresentaram diferença estatística ($p<0,05$ e $p<0,001$) entre as linhagens de alta e média patogenicidade frente as de baixa patogenicidade. A identificação dos genes segue uma classificação em cores onde em preto estão os genes relacionados à fímbrias e adesinas (*fimH*, *tsh* e *papC*); vermelho estão os genes relacionados a captação de ferro (*iucD*, *iutA*, *iroN*, *sitDe*, *fepC*, *irp-2* e *fyuA*); amarelo são os genes associados a resistência ao soro (*ompT*, *iss* e *cvi*); verde está o gene relacionado a hemolisina (*hlyF*); e em lilás o gene relacionado a ilha de patogenicidade de EHEC (*malX*). Abaixo está a classificação das linhagens conforme a identificação como APEC (P), AFEC (F), Estado de origem (PE,SP, PR e RS), Patogenicidade (A=alta, M=média, B=baixa). III e IV e as respectivas linhas preta e roza rosa representam os agrupamentos encontrados..... 51

Figura 10. Árvore de agrupamento das linhagens de *E. coli* de origem aviária conforme o perfil de genes que apresentaram diferença estatística extremamente significativa ($p<0,001$) entre as linhagens de alta e média patogenicidade frente as de baixa patogenicidade. A identificação dos genes segue uma classificação em cores onde em vermelho estão os genes relacionados a captação de ferro (*iucD*, *iutA*, *iroN* e *fepC*); amarelo são os genes associados a resistência ao soro (*ompT* e *cvi*) e em verde está o gene relacionado a hemolisina (*hlyF*). Abaixo está a classificação das linhagens conforme a identificação como APEC (P), AFEC (F), Estado de origem (PE,SP, PR e RS), Patogenicidade (A=alta, M=média, B=baixa). V, VI e VII e as

respectivas linhas preta, marrom e rosa representam os agrupamentos encontrados.	53
---	----

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1. Caracterização bioquímica para <i>E. coli</i> pelos meios EPM, MILi e Citrato de Simmons.	15
--	----

RESUMO

Linhagens de *Escherichia coli* patogênicas para aves (APEC) causam doenças extra-intestinais em aves, acarretando perdas econômicas substanciais à produção avícola brasileira. Os fatores relacionados à patogenicidade são diversificados e incluem fímbrias, sistemas de captação de ferro, resistência ao soro do hospedeiro, toxinas, invasinas dentre outros. A análise e detecção de alguns genes associados à virulência (GAV), auxiliam a distinguir linhagens APEC de linhagens comensais, geralmente de origem fecal (AFEC). O objetivo deste estudo foi caracterizar 120 linhagens brasileiras de *Escherichia coli* aviária (91 APEC e 29 AFEC), oriundas de quatro Estados brasileiros (PE, SP, PR e RS). Foram pesquisados 34 GAV e quatro genes relacionados ao sistema de secreção tipo 6 (SST6) similares a O157:H7 cepa Sakai, análise filogenética, sorotipagem, análise de agrupamento e teste de patogenicidade *in vivo*. Em APEC, os GAV de maior frequência foram *fimH* (83,5%), *hlyF* (71,4%), *crl* (64,8%), *csg* e *iucD* (57,1%), *iutA* (54,9) e *ompT* (52,7%). Nenhuma das linhagens apresentou os genes *sat*, *gimB* e *afa*. Nas linhagens AFEC, os genes de maior frequência foram *fimH* (75,9%), *vgrG* (69%) e *traT* (55,2%). Nenhuma linhagem apresentou os genes, *lpfA_{O157/O1-154}*, *kpsMT3*, *sfa*, *iha*, *gimB*, *sat* e *afa*. Em relação aos genes do SST6, apenas uma linhagem apresentou conjuntamente os quatro genes pesquisados. Na determinação do grupo filogenético (GF), 16 (55,2%) linhagens AFEC foram classificadas como pertencentes ao GF A e 11 (37,9%) como B1. Tanto o GF B2 quanto o D apresentaram duas (6,8%) linhagens cada. Já para as linhagens APEC, 36 (40,2%) foram classificadas como B1, 26 (28,3%) como D, 15 (16,3%) como B2 e 14 (15,2%) como A. Em relação à sorotipagem, dentre as APEC, 49 sorotipos foram identificados. As linhagens O não-tipáveis foram as mais frequentes, 25 (27,5%), onde o antígeno H21 apresentou-se associado em dez (11%) das linhagens. Dentre os sorogrupos identificados, o antígeno O8 foi o mais frequente, estando presente em 12 (13,2%) das linhagens APEC. Quanto a patogenicidade *in vivo*, 46 (50,5%) linhagens APEC foram classificadas como de alta patogenicidade, 13 (14,3%) de média patogenicidade e 32 (35,2%) de baixa patogenicidade. Entre as linhagens AFEC, 7 (24,1%) apresentaram alta patogenicidade, 8 (27,5%) média patogenicidade e 14 (48,2%) baixa patogenicidade. De uma maneira geral, apesar de as *E. coli* aviárias serem consideradas um grupo muito

diversificado em relação à presença de GAV, sorotipos, perfil de patogenicidade e grupos filogenéticos, é possível observar diferenças marcantes entre linhagens pertencentes ao patotipo APEC das linhagens comensais, especialmente através da composição de genes relacionados à fatores de virulência. Dentre as características estudadas, a presença de determinados GAV, em especial *iucD*, *iutA*, *iroN*, *fepC*, *ompT*, *cvi* e *hlyF*, tem o potencial de servir como marcadores moleculares para o patotipo APEC de linhagens brasileiras. Em relação à patogenicidade, é possível estabelecer a seguinte relação: quanto maior a presença de fatores de virulência, de ações diversas, maior a patogenicidade das linhagens. Além disso, as linhagens que mais possuíam genes relacionados à captação de ferro do hospedeiro, foram as mais virulentas.

ABSTRACT

Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) strains cause extra-intestinal diseases in birds, leading to substantial economic losses to the Brazilian poultry production. The factors related to pathogenicity are diverse and include fimbriae, iron acquisition systems, resistance to host serum, toxins, invasins among others. The detection and analysis of some genes associated with virulence (VAG) are useful to distinguish APEC strains of commensal strains, usually of faecal origin (AFEC). The aim of this study was to characterize 120 Brazilian strains of avian *Escherichia coli* (91 APEC and 29 AFEC) collected from four Brazilian states (PE, SP, PR and RS). We surveyed 34 GAV and four genes related to type 6 secretion system (T6SS) similar to O157: H7 strain Sakai, phylogenetic analysis, serotype, cluster analysis and pathogenicity test *in vivo*. In APEC the higher frequency GAV were *fimH* (83.5%) *hlyF* (71.4%), *crl* (64.8%) and *iucD*, *csg* (57.1%) *iutA* (54.9) and *ompT* (52.7%). None of the strains contained genes *sat*, *gimb* and *afa*. In AFEC strains, the genes with higher frequency were *fimH* (75.9%) *vgrG* (69%) and *traT* (55.2%). No strain showed genes *lpfA*_{O157/O1-154}, *kpsMT3*, *sfa*, *iha*, *gimB*, *sat* or *afa*. In relation to the genes T6SS, only one strain showed the four genes studied. In determining the phylogenetic group (GF), 36 (40.2%) APEC strains were classified as B1, 26 (28.3%) as D, 15 (16.3%) as B2 and 14 (15.2%) as A. Sixteen (55.2%) AFEC strains were classified as belonging to GF A and 11 (37.9%) as B1. Both GF B2 as D had two (6.8%) strains each. Regarding serotyping, among APEC, 49 serotypes were identified. The non-typable strains were the most frequent, 25 (27.5%), where the antigen H21 was associated to ten (11%) strains. Among the serogroups identified, antigen O8 was the most frequent, being present in 12 (13.2%) of APEC strains. Regarding to pathogenicity test, 46 (50.5%) APEC strains were classified as highly pathogenic, 13 (14.3%) of medium pathogenicity and 32 (35.2%) of low pathogenicity. Among the AFEC strains, 7 (24.1%) showed high pathogenicity, 8 (27.5%) medium pathogenicity and 14 (48.2%) low pathogenicity. In general, although avian *E. coli* could be considered a very diverse group in relation to the presence of VAG, serotypes, pathogenicity profile and phylogenetic groups, it is possible to observe significant differences between strains belonging to the APEC pathotype to strains isolated from apparently healthy birds, especially through the composition of genes related the

virulence factors. Among the characteristics studied, the presence of certain VAGs, particularly *iucD*, *iutA*, *iroN*, *fepC*, *ompT*, *cvi* and *hlyF*, has the potential to act as molecular markers to the APEC pathotype of Brazilian strains. Regarding pathogenicity, we can establish the following relationship: the higher the presence of virulence factors of various actions, the more pathogenic the strains are. Furthermore, the strains that possessed more genes related to iron uptake from the host, were the most virulent.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é um grande produtor mundial de carne de frango e seus derivados. Em 2011, o total de carne de frango produzida foi acima de 13 milhões de toneladas, das quais, cerca de 30% foram exportadas para diferentes países, gerando uma receita cambial de aproximadamente seis bilhões de dólares. As demais 70% foram destinadas ao mercado interno, garantindo a produção de alimento de alto valor nutricional para a população brasileira. Estes dados garantem ao Brasil o terceiro lugar mundial na produção de carne de frangos, apenas atrás dos Estados Unidos da América e da China, e o primeiro lugar na exportação mundial deste produto (Ubabef, 2012).

Apesar de ser um importante segmento econômico, a indústria avícola, assim como os demais ramos da pecuária e agricultura, está sujeita a fatores que podem afetar de maneira significativa os seus rendimentos e custos. Entre esses fatores, destacam-se as doenças infecciosas causadas por micro-organismos patogênicos (vírus, bactérias e fungos) e, principalmente, por diferentes grupos da bactéria *Escherichia coli*, agentes significativos de morbidade e mortalidade (Gross, 1994).

Escherichia coli é uma bactéria gram-negativa, anaeróbia facultativa, pertencente à família Enterobacteriaceae que coloniza o trato gastrointestinal de aves (Sojka e Carnaghan, 1961) e mamíferos (Gyles e Fairbrother, 2010). Esta bactéria permanece, geralmente, confinada ao lúmen intestinal, entretanto em hospedeiros debilitados ou imunossuprimidos, ou quando as barreiras físicas ou fisiológicas são violadas, pode causar infecções severas. Além disso, existem linhagens de *E. coli* originárias de clones patogênicos altamente adaptados que são capazes de causar doenças em seres saudáveis (Nataro e Kaper, 1998; Kaper *et al.*, 2004).

Linhagens de *E. coli* patogênicas para aves são denominadas em inglês de “Avian Pathogenic *Escherichia coli*” (APEC) (Dho-Moulin e Fairbrother, 1999) estando presentes na microbiota intestinal e superfícies mucosas de aves domésticas e selvagens podendo, também, ser isoladas do ambiente onde as aves se encontram causando infecções extra-intestinais responsáveis por perdas econômicas significativas na indústria aviária (Dho-Moulin e Fairbrother, 1999; La Ragione e Woodward, 2002).

A maioria das linhagens está associada a infecções extra-intestinais, onde o termo colibacilose é empregado para englobar o grande número de lesões ocasionadas por APEC, dentre as quais: septicemia, celulite, pericardite, perihepatite, onfalite, peritonite, infecções do trato respiratório e da gema dos ovos, e síndrome da cabeça inchada. Acredita-se que, exceto para as infecções da gema do ovo, todas estas infecções requeiram fatores predisponentes, que incluem condições ambientais e infecções primárias, principalmente virais, o que fariam com que estas linhagens atuem como agentes patogênicos secundários (Dho-Moulin e Fairbrother, 1999).

Infecções do saco da gema são observadas no período final de incubação do ovo sendo, geralmente, resultantes da contaminação fecal de sua superfície e, em menor frequência, de aves com infecção ovariana. Essas infecções, normalmente, resultam ou na mortalidade do embrião ou de aves com até duas semanas de idade, ou podem estender-se à cavidade abdominal da ave, causando peritonite e pericardite (Dho-Moulin e Fairbrother, 1999).

Sabe-se, contudo, que a doença mais importante associada à APEC, a septicemia, inicia-se como uma infecção do trato respiratório, denominada “doença crônica respiratória”, ou “aerossaculite”. Se não tratada, essa infecção pode evoluir à bacteremia e à infecção generalizada e consequente morte da ave (Gross, 1994; Dho-Moulin e Fairbrother, 1999).

Também, acredita-se que infecções respiratórias por APEC são, geralmente, secundárias às infecções iniciais causadas pelo vírus da doença de “Newcastle”, pelo vírus da bronquite infecciosa das galinhas ou por *Mycoplasma gallisepticum*. A suscetibilidade das aves às APEC aumenta devido à desciliação das células do trato respiratório superior, causada pela exposição à amônia e poeira contaminada presentes no ambiente dos galpões avícolas. Lesões no trato respiratório incluem aerossaculite com exudato fibroso, infiltração inicial de heterófilos e uma subsequente predominância de fagócitos mononucleares. Em infecções generalizadas, pericardite e perihepatite também são observadas. Em aves adultas pode ocorrer septicemia aguda, podendo ser observadas pericardite, peritonite, necrose no fígado ou ausência de lesões. Em aves de postura, APEC podem infectar o oviduto, via saco aéreo abdominal esquerdo, podendo levar à salpingite e à perda da capacidade de postura. Esporadicamente, APEC podem invadir a cavidade peritoneal, via oviduto, causando peritonite e morte. Em frangos e aves de postura, APEC pode participar de uma síndrome específica das galinhas, denominada síndrome da cabeça inchada (SHS: “Swollen Head Syndrom”). Lesões observadas nessa

síndrome incluem o edema gelatinoso da pele facial e dos tecidos periorbitais e, em alguns casos, no tecido subcutâneo e nas glândulas lacrimais (Gross, 1994).

Tanto em frangos como em aves de postura, APEC também estão associadas à celulite que se caracteriza como dermatite necrótica do abdome inferior e de coxas. Essas doenças não causam sinais clínicos e mortalidade, mas as lesões subcutâneas fibrosas associadas a elas resultam em perdas econômicas devido à condenação das carcaças (Gross, 1994; Dho-Moulin e Fairbrother, 1999).

Devido a esta grande diversidade de apresentação da colibacilose aviária, mais recentemente, tem-se discutido a hipótese da existência de subpatotipos de APEC, caracterizados conforme o tipo de lesão/síndrome que produzem (Septicemia, Onfalite e Síndrome da Cabeça Inchada), cada um associado a um perfil específico de genes relacionados à virulência (Maturana *et al.*, 2011). Um estudo envolvendo o sequenciamento de plasmídios de alto peso molecular presentes em APEC demonstrou que tipos de linhagens isoladas de casos de salpingite, seguida por peritonite e sepse, mostraram-se muito similares indicando, assim, a possibilidade de haver mais de um subpatotipo de APEC (Olsen *et al.*, 2012), o que faz com que ferramentas de diagnóstico molecular possam ser desenvolvidas para se detectar e estudar os diferentes patotipos existentes, pois a técnica tradicionalmente utilizada, a sorotipagem, além de não levar em consideração esta possível classificação, não demonstra, ou indica, a presença de possíveis genes importantes relacionados à patogenicidade.

Neste sentido, as linhagens APEC mais comumente isoladas pertencem a certos sorogrupos, particularmente O1, O2, O8, O15, O18, O35, O78, O88 e O109, sendo os sorogrupos O1, O2 e O78 os mais frequentemente associados à colibacilose aviária (Knöbl *et al.*, 2001; Ngeleka *et al.*, 2002; Ewers *et al.*, 2004; Mcpeake *et al.*, 2005). Entretanto, grande parte das linhagens não pertence aos sorogrupos identificados como patogênicos, e são classificados, então, como linhagens “não tipáveis” (Dho-Moulin e Fairbrother, 1999; Moura *et al.*, 2001; Silveira *et al.*, 2002; Mcpeake *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2009). No Brasil, existe carência de informações sobre o perfil sorológico das linhagens causadoras de colibacilose. Uma explicação para tanto está na inexistência de antisoros específicos confiáveis, fazendo-se necessário o desenvolvimento de técnicas moleculares para a caracterização de genes relacionados à virulência (Ewers *et al.*, 2004; Johnson *et al.*, 2008b).

Portanto, muitos fatores de virulência (FV) foram identificados em APEC, como: fatores de colonização relacionados à capacidade de adesão mediada por adesinas, fimbriais ou não, ao trato respiratório; fatores de resistência às defesas imunológicas do hospedeiro; a capacidade de multiplicação da bactéria no hospedeiro pela expressão de sideróforos e a produção de efeitos citopáticos, dentre outros (Gross, 1994; Dho-Moulin e Fairbrother, 1999; La Ragione e Woodward, 2002).

Evidências de que a habilidade de *E. coli* em aderir ao epitélio do trato respiratório de aves poderia ser considerado um fator de virulência foi, inicialmente, proposto pela observação de que uma linhagem virulenta e fimbriada era mais dificilmente destacada da traqueia de perus do que uma linhagem não virulenta e afimbriada (Arp e Jensen, 1980). As fímbrias tipo 1, P e “curli” são adesinas presentes em linhagens APEC, contudo um estudo realizado por Campos *et al.* (2005) sugere que certas linhagens podem apresentar outras adesinas ainda não identificadas.

A fímbria tipo 1 é amplamente encontrada em linhagens de *E. coli* e possui capacidade adesiva, que permite à bactéria aderir às células do trato respiratório superior de aves (Wooley *et al.*, 1998; La Ragione e Woodward, 2002). Apesar da fímbria tipo 1 ser mais frequente em linhagens APEC do que entre linhagens não patogênicas, outros fatores são necessários à patogenicidade bacteriana. Pourbakhsh *et al.* (1997) sugerem que a fímbria tipo 1 pode estar associada à colonização inicial do trato respiratório superior e que adesinas fimbriais P, possivelmente, estão envolvidas no estabelecimento da população bacteriana nos órgãos internos das aves. Wooley *et al.* (1998) também sugerem que fatores adicionais como motilidade e produção de colicina V resultariam no aumento da colonização bacteriana e das lesões na traqueia; embora Marc *et al.* (1998), utilizando linhagens APEC mutantes *fim*-, tenham demonstrado que fímbrias tipo 1 não são estritamente requeridas como fatores de colonização do trato respiratório no desenvolvimento de colibacilose aviária.

Já as adesinas P, fimbriais, foram inicialmente descritas em linhagens de *E. coli* associadas a infecções do trato urinário de humanos. Nesse tecido, as fímbrias P são responsáveis pela adesão da bactéria às células uroepiteliais, constituindo-se num importante determinante no desenvolvimento da pielonefrite (Mol e Oudega, 1996). Estas adesinas são codificadas pelo grupo gênico *pap*, localizado no cromossomo bacteriano

compreendendo 11 genes. Linhagens APEC também apresentam fímbrias P em sua superfície (Dozois *et al.*, 1995; Pourbakhsh *et al.*, 1997). A expressão de fímbrias P em linhagens APEC possivelmente está associada à colonização do saco aéreo, pulmões e órgãos internos de aves (Pourbakhsh *et al.*, 1997). A presença de sequências *pap* em linhagens patogênicas de *E. coli* aviária também sugere a associação da fímbria P à patogenicidade de APEC (Janßen *et al.*, 2001; Knöbl *et al.*, 2001; Stordeur *et al.*, 2002; Ewers *et al.*, 2004; Campos *et al.*, 2005; Mcpeake *et al.*, 2005).

Fímbrias “curli” são estruturas proteicas finas e encaracoladas, encontradas na superfície celular de *E. coli* e *Salmonella*, responsáveis pela ligação da bactéria à matriz extracelular (Collinson *et al.*, 1993). Estão envolvidas na sobrevivência da bactéria em ambientes externos ao hospedeiro, assim como em sua colonização inicial (Olsen *et al.*, 1993). Sequências genéticas “curli” são amplamente encontradas em linhagens APEC. Maurer *et al.* (1998) detectaram o gene *csgA* em todas as linhagens APEC analisadas. O mesmo gene foi encontrado em cerca de 90% das linhagens de *E. coli* isoladas de avestruzes com doença respiratória (Knöbl *et al.*, 2001) e em 70% das linhagens APEC analisadas por Campos *et al.* (2005).

Outras adesinas já identificadas em APEC compreendem a fímbria AC/1 e fímbrias “tipo 1-like” (La Ragione e Woodward, 2002). A presença de sequências associadas à expressão das adesinas F17, Afa, Sfa e Eae, em linhagens APEC, poderia ser indicativo que essas adesinas estariam na superfície deste grupo bacteriano (Stordeur *et al.*, 2002; Campos *et al.*, 2005; Mcpeake *et al.*, 2005). Contudo, a baixa frequência de detecção destas sequências entre as linhagens pode indicar que essas adesinas, geralmente, não estão associadas ao processo de colonização de APEC nos tecidos do hospedeiro. A importância de se estudar essas adesinas, mesmo que não estejam amplamente presentes na maioria das linhagens APEC, se dá pelo fato de que estas, quando presentes, indicam um potencial zoonótico a estes tipos de linhagens. Estudos recentes tem demonstrado que muitas dessas linhagens tem relações filogenéticas próximas às ExPEC uropatogênicas (UPECs) (Ewers *et al.*, 2004; Johnson *et al.*, 2008a; Bauchart *et al.*, 2010).

Em relação a outro fator de adesão, o gene *tsh* codifica uma proteína auto-transportadora pertencente à classe serino-protease (SPATE) que é secretada por APEC e que causa aglutinação de eritrócitos de aves (Dutta *et al.*, 2002) e, em processos

infecciosos, poderia estar associada à aerosaculite e colisepticemia (Provence e Curtiss, 1994; Dozois *et al.*, 2000). A proteína Tsh é sintetizada como um precursor de 140 kDa que é clivado no periplasma da célula bacteriana, resultando em duas proteínas: uma de 33 kDa, inserida na membrana externa que atua como um domínio passageiro (“passenger”) e outra de 106 kDa que é secretada ao meio extracelular, permanecendo temporariamente ligada ao envelope celular, possivelmente mediando a adesão bacteriana durante os estágios iniciais da infecção, antes de ser liberada no ambiente extracelular (Stathopoulos *et al.*, 1999). Após sua secreção, a subunidade de 106 kDa, apresenta atividade proteolítica, o que a caracteriza como sendo uma proteína bifuncional com propriedades adesivas e proteolíticas (Kostakioti e Stathopoulos, 2004). Além disso, linhagens APEC sobrevivem em ambientes com baixa disponibilidade de ferro, particularmente no hospedeiro, devido à expressão de sistemas de aquisição de ferro e sideróforos que competem com ferro e com transferrinas do hospedeiro (Dho e Lafont, 1984). Vários sistemas de captação de ferro foram identificados em APEC, entre eles, os sistemas *iroBCDE* (Dozois *et al.*, 2003), o operon aerobactina (Vidotto *et al.*, 1991) e o operon yersinia bactina (Janßen *et al.*, 2001), que parecem contribuir para a virulência bacteriana. Em linhagens de *E. coli* aviária, sistemas de captação de ferro podem ser codificados por genes localizados em plasmídios ColV (Johnson *et al.*, 2006; Sabri *et al.*, 2006) ou em ilhas de patogenicidade presentes em plasmídios e no cromossomo (Kariyawasam *et al.*, 2006).

A capacidade de resistência aos efeitos bactericida do sistema complemento existente no soro do hospedeiro, mediada por estruturas da superfície bacteriana como cápsula, lipopolissacarídeos e proteínas da membrana externa é, frequentemente, associada à patogenicidade de APEC (Dho-Moulin e Fairbrother, 1999). Wooley *et al.* (1998) demonstraram que a resistência ao poder bactericida do soro presente em linhagens APEC de galinha pode estar associada ao quadro clínico de septicemia. Pfaff-McDonough *et al.* (2000) sugerem que o fator *iss* (“increased serum survival”) está associado à patogenicidade de APEC, pois o gene *iss* é encontrado mais frequentemente em linhagens isoladas de aves com colisepticemia do que em linhagens de aves saudáveis, independente do sorotipo, espécie de ave e lesão de origem. A presença do gene *iss* no cromossomo e em plasmídios conjugativos ColV (Johnson *et al.*, 2002; Mellata *et al.*, 2003) também é considerado um indicativo da ação do fator *iss* na patogenicidade de APEC. A deleção sítio

dirigida do gene *iss*, no estudo realizado por Lynne *et al.* (2007), demonstrou que o mutante teve sua capacidade de resistência ao soro diminuída, ao passo que com a reinserção do gene neste mutante, o mesmo retornou ao estado selvagem inicial de resistência, comprovando desta maneira a importância do gene *iss* neste mecanismo de patogenicidade. Além da contribuição do fator *iss*, Mellata *et al.* (2003) sugerem que o polissacarídeo O78 e a cápsula K1 constituem FV que aumentam a resistência bacteriana ao poder bactericida do soro do hospedeiro por APEC.

Há poucos relatos demonstrando que a produção de toxinas está relacionada à patogenicidade de APEC (Dho-Moulin e Fairbrother, 1999). A atividade citotóxica de linhagens APEC às células Vero foi observada por Fantinatti *et al.* (1994) e por Parreira e Yano (1998). Parreira e Gyles (2002) verificaram que linhagens APEC isoladas de galinhas com celulite, septicemia, síndrome da cabeça inchada e de perus doentes com septicemia apresentaram genes que codificam Shiga toxina (*stx*). Posteriormente, esses autores (Parreira e Gyles, 2003) descreveram uma citotoxina vacuolizante em uma linhagem de *E. coli*, codificada pelo gene *vat* pertencente a uma ilha de patogenicidade. Embora o gene *vat* tenha sido identificado em linhagens APEC, não existem dados que indiquem que este seja o único gene responsável pela patogenicidade (Ewers *et al.*, 2004; Ewers *et al.*, 2005).

O desenvolvimento de técnicas de biologia molecular, como a tecnologia da expressão *in vivo* (Mahan *et al.*, 1993), captura seletiva de sequências transcritas (SCOTS) (Graham e Clark-Curtiss, 1999), indução diferencial de fluorescência (Valdivia e Falkow, 1997) e mutagênese com transposon “signature-tagged” (STM) (Hensel *et al.*, 1995) vem adicionando novos conhecimentos na identificação de fatores de patogenicidade bacteriana, pois possibilitam verificar quais genes são expressos durante a infecção. Pelo sequenciamento de cDNAs provenientes da seleção de sequências transcritas patógeno-específicas (SCOTS), Dozois *et al.* (2003) verificaram que transcritos relacionados a possíveis adesinas, à síntese de LPS, à captação de ferro e a genes de plasmídios e fagos eram específicos à linhagem X⁷¹²² de *E. coli* patogênica para aves.

Análises filogenéticas demonstraram que linhagens de *E. coli* pertencem a quatro grupos filogenéticos principais, denominados A, B1, B2 e D (Selander *et al.*, 1987; Herzer *et al.*, 1990). Linhagens extra-intestinais e linhagens virulentas humanas pertencem, principalmente, aos grupos filogenéticos B2 e D, enquanto que linhagens comensais

pertenceriam, principalmente, aos grupos A e B1 (Clermont *et al.*, 2000). Um estudo realizado por Johnson *et al.* (2003), com 110 linhagens de *E. coli* isoladas da cloaca de aves, demonstrou que 25 a 30% pertenciam aos grupos filogenéticos A, B1 e D e 14% ao grupo B2. Estudo realizado por Rodriguez-Siek *et al.* (2005) com APEC causadoras de colibacilose aviária demonstrou que cerca de 50% das linhagens analisadas eram dos grupos filogenéticos A e B1 e que a outra metade eram dos grupos filogenéticos B2 e D. Os autores sugeriram que a classificação de 50% das APEC no grupo filogenético A, considerado como um grupo de linhagens não patogênicas e comensais em humanos (Clermont *et al.*, 2000), deve-se à natureza oportunista das infecções das quais as linhagens foram isoladas.

Embora muitos dos trabalhos citados acima tenham sido realizados procurando estabelecer os mecanismos de patogenicidade presentes em linhagens APEC, nenhum deles demonstrou, de maneira definitiva, quais poderiam ser estes mecanismos. Todos demonstraram a possível presença de genes específicos e a provável função destes genes, em certos passos da patogenia.

O laboratório de Biologia Molecular Bacteriana/DGEB/IB tem se dedicado, há vários anos, ao estudo de APEC, visando caracterizar esses tipos de linhagens bacterianas quanto às suas características biológicas que poderiam estar relacionadas à patogenicidade como: resistência a antibióticos, expressão de fímbrias e flagelos; colicinas, enterobactinas, resistência ao poder bactericida do soro do hospedeiro, expressão de fímbrias, capacidade de adesão e invasão de linhagens celulares (Fantinatti *et al.*, 1994; Silveira *et al.*, 1998; Stehling *et al.*, 2003a; Nakazato *et al.*, 2007; Stehling *et al.*, 2008), genéticas como, existência de genes relacionados à patogenicidade em plasmídios e em cromossomo e populacionais, dentre os quais a estrutura clonal através de técnicas moleculares, tais como isoenzimas, ribotipagem, ERIC-PCR, RAPD-PCR, REP-PCR (Silveira *et al.*, 2002; Stehling *et al.*, 2003b; Brocchi *et al.*, 2006; Campos *et al.*, 2008).

Nos trabalhos acima descritos, realizados com linhagens APEC causadoras de septicemia, síndrome da cabeça inchada e onfalite, constatou-se que genes de patogenicidade podem estar localizados tanto em plasmídios conjugativos e/ou não conjugativos quanto no cromossomo; descreveu-se que alguns desses plasmídios apresentam características ainda não descritas na literatura; verificou-se que determinadas

proteínas da membrana externa conferem uma maior virulência; relatou-se que os diferentes grupos patogênicos, dependendo da técnica utilizada, apresentam uma distribuição clonal de semelhança quanto ao seu genoma e, principalmente, que muitos dos possíveis genes que conferem o caráter patogênico ainda não estavam descritos na literatura.

Neste contexto, recentemente foram publicados trabalhos demonstrando que a presença do sistema de secreção tipo 6 (SST6) (Pukatzki *et al.*, 2006) pode contribuir para a patogenicidade de uma linhagem APEC (De Pace *et al.*, 2010; De Pace *et al.*, 2011). Este novo sistema de secreção em bactérias gram-negativas está envolvido com a secreção de macromoléculas provenientes do citoplasma e periplasma da célula bacteriana para o meio externo ou interior de células do hospedeiro, tornando-se importante na virulência de vários patógenos como *Pseudomonas aeruginosa* (Mougous *et al.*, 2006), *Vibrio cholerae* (Pukatzki *et al.*, 2006) e diversas outras bactérias (Filloux *et al.*, 2008; Filloux, 2009), incluindo APEC (Shrivastava e Mande, 2008).

O operon do SST6 contém de 12 a 20 genes, mas sua composição e organização variam entre as espécies. As proteínas derivadas desses genes atuam na montagem de uma estrutura tubular, formada pelas proteínas Hcp e VgrG, a qual é energizada por um sistema ATPase desempenhado por proteínas da família ClpV (Filloux, 2009). As proteínas Hcp e VgrG desempenham o duplo papel de formação da nano maquinaria tubular e de produtos de secreção (Dudley *et al.*, 2006; Pukatzki *et al.*, 2007; Zheng e Leung, 2007). O domínio C-terminal da proteína VgrG é similar a várias enzimas bacterianas e eucarióticas, sugerindo que, provavelmente, interfira nas vias de sinalização ou função celular do hospedeiro. Evidências indicam que, em *V. cholerae*, uma das proteínas VgrG secretadas, possui atividade “cross-linking” na actina, *in vitro*, sugerindo uma possível translocação para dentro de macrófagos, por um mecanismo dependente de SST6 (Pukatzki *et al.*, 2007). Esse estudo sugere, ainda, que as proteínas VgrG formem um complexo que pode agir como uma estrutura, em forma de gancho, que penetra a membrana, transportando o domínio efetor de VgrG para o citoplasma da célula hospedeira. Contudo, ainda não está claro se VgrG age como um transportador ou como um efetor sob condições fisiológicas, ou se ambas as funções são igualmente importantes (Pukatzki *et al.*, 2007). A proteína Hcp

forma anéis hexaméricos responsáveis pela forma tubular do SST6 sendo, também, uma potente hemolisina (Mougous *et al.*, 2006; Ballister *et al.*, 2008; Leiman *et al.*, 2009).

Outro fator importante neste complexo aparato secretório são as proteínas da família IcmF. Elas ficam localizadas na membrana interna dessas bactérias e são componentes essenciais para a secreção do Hcp de vários patógenos animais entre eles: *V. Cholerae*, *Aeromonas hydrophila*, *E. tarda* e *Pseudomonas aeruginosas* (Pukatzki *et al.*, 2007; Zheng e Leung, 2007; Suarez *et al.*, 2008). No entanto, nada se sabe sobre a prevalência deste sistema em APEC para se determinar a importância deste possível fator de virulência na patogenidade em linhagens de campo.

Com o exposto até aqui, verificamos que no Brasil não existem trabalhos publicados com o objetivo de caracterizar linhagens de *E. coli* em nível nacional, que possibilitem comparações entre diferentes populações bacterianas de regiões avícolas geograficamente distintas. Além disso, informações importantes, como a sorotipagem e suas aplicações, não estão sendo considerados nas pesquisas brasileiras dos últimos 10 anos, diferentemente do que vem ocorrendo em outros países, onde é possível notar que a relação direta entre sorotipagem e patogenidade se tornou cada vez mais questionável.

Esta metodologia vem sendo substituída, desde os anos 2000, pelo diagnóstico molecular, por Multiplex PCR, de genes associados à virulência (GAV). Uma das primeiras ferramentas propostas é relacionada à presença de no mínimo quatro a até oito genes, de diferentes mecanismos de patogenidade (Skyberg *et al.*, 2003; Ewers *et al.*, 2004). No entanto, estes protocolos foram desenvolvidos com poucas linhagens e apenas de casos descritos como colisepticemia, ignorando as demais origens como celulite aviária, onfalite e de doenças relacionadas ao trato respiratório. Após isto, uma extensa pesquisa feita por Johnson *et al.* (2008c), com 794 linhagens de APEC, de diferentes formas de apresentação da colibacilose, frente a 200 linhagens de *E. coli* de origem fecal de aves saudáveis (AFEC), demonstrou que as APEC poderiam ser distinguidas de seus pares não patogênicos pela presença dos genes *iutA*, *iss*, *iroN*, *hlyF* e *ompT*.

Mais recentemente, outra metodologia de identificação molecular de linhagens patogênicas foi proposta por Schouler *et al.* (2012). Esta metodologia envolve a detecção, por PCR, de diferentes GAV, incluindo *aec26* o qual está vinculado ao SST6, e assim é possível classificar as linhagens em um dos quatro perfis gênicos propostos (A, B, C e D),

similarmente ao método de Clermont *et al.* (2000). Este método mostrou uma margem de erro de apenas 4,3% na diferenciação de linhagens patogênicas e não patogênicas, ao passo que a metodologia proposta por Johnson *et al.* (2008c), demonstrou erro de 14,6%.

Desta forma, todos os dados disponíveis indicam que a patogenicidade de APEC pode ser resultante da expressão de poucos, ou muitos genes, os quais podem ser diferentes em linhagens bacterianas provenientes de diversas regiões, não existindo, portanto, até o presente momento, um padrão gênico que caracterize de maneira definitiva APEC.

Assim, neste trabalho, com o objetivo de se conhecer o perfil genético de uma população heterogênea de APEC e se verificar se existe um padrão que caracterize este tipo de linhagens, foram estudados 120 linhagens de *E. coli* (91 APEC e 29 comensais) de aves de corte e postura comercial, de quatro Estados brasileiros (Rio Grande do Sul, Paraná, São Paulo e Pernambuco). Para esta finalidade, a ocorrência de 34 genes relacionados à patogenicidade, quatro genes relacionados ao SST6 e tipificação filogenética foram pesquisados. Também foi realizada a sorotipagem, baseada na presença dos antígenos O e H, assim como testes de patogenicidade *in vivo* com pintainhos de 1 dia de idade, objetivando classificar as linhagens como possuindo alta, média ou baixa patogenicidade. Com estas três ferramentas, espera-se traçar distinções gênicas entre linhagens patogênicas das não patogênicas independentemente da origem (se comensal ou não), verificar diferenças entre populações de origens geográficas diferentes e aprofundar o estudo relacionado à existência de subpatotipos.

2. Objetivo Geral

Caracterização de linhagens *E. coli* aviária de quatro Estados brasileiros, por PCR, sorotipagem e patogenicidade *in vivo*, para determinar se estas duas populações bacterianas são similares, ou não, quanto à sua composição de genes relacionados à patogenicidade, tipificação filogenética e sorotípica.

2.1 Objetivos Específicos

Diferenciação de linhagens de APEC e *E. coli* comensais quanto à presença de 34 genes relacionados à patogenicidade e tipificação filogenética;

Verificar a possível existência de diferentes perfis de genes de virulência entre linhagens de APEC de quatro regiões brasileiras e de lesões distintas;

Observar a existência de subpatotipos através de diferentes perfis gênicos das linhagens conforme a origem de isolamento (doença respiratória, celulite aviária e septicemia);

Avaliação da ocorrência de genes do sistema de secreção tipo 6 (SST6) em APEC brasileiras.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 População estudada

No total, foram utilizadas 120 linhagens de *Escherichia coli* de origem aviária, 91 linhagens isolados de casos clínicos relacionados à colibacilose (APEC) e 29 isolados comensais de aves aparentemente saudáveis. As linhagens são pertencentes à coleção do Laboratório de Biologia Molecular Bacteriana, vinculado ao Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes, do Instituto de Biologia, da UNICAMP, SP, Brasil. A Tabela 1 descreve o local de isolamento e origem de cada linhagens, assim pode-se agrupar as linhagens em quatro grupos (subpatotipos) distintos: Septicemia, Doença do Trato Respiratório, Celulite Aviária e de origem fecal ou comensal.

Do total de linhagens, 43 foram coletadas através de suabes de órgãos como fígado, coração, pulmão, sacos aéreos, pleuras, ovários e ovidutos, de aves necropsiadas e diagnosticadas como acometidas por colibacilose e, então, classificadas em subpatotipo Septicêmico (S). O subpatotipo Respiratório (R) foi composto por 15 linhagens de *E. coli* isoladas de descarga nasal de aves com sinais clínicos de doença do trato respiratório. Além disso, 30 linhagens foram coletadas de lesões de celulite aviária em frangos de corte de um frigorífico do Rio Grande do Sul, compondo o subpatotipo C. Vinte e nove linhagens, coletadas por suabe cloacal de aves clinicamente saudáveis, foram utilizadas para comparação com as linhagens ditas patogênicas e identificadas como grupo N. Três linhagens de São Paulo, coletadas de casos de onfalite, não foram utilizadas no estudo de subpatitpos, apenas para os demais testes.

As linhagens foram gentilmente cedidas por: Elisabete Aparecida Lopes Guastalli do APTA/Bastos (SP); Dra. Marilda Carlos Vidotto da UEL (PR); Dra. Maristela Lovato da UFSM (RS); Dr. Domingos da Silva Leite (UNICAMP) (SP); Dr. Rinaldo Aparecido Mota da UFRPE (PE).

Tabela 1. Local e origem de isolamento das linhagens analisadas.

Estado	Origem	Número
Pernambuco	Doença do Trato Respiratório	6
	Fecal	12
	Septicêmicas	13
São Paulo	Onfalite	3
	Doença do Trato Respiratório	7
	Fecal	17
Paraná	Septicêmicas	23
	Septicêmicas	7
Rio Grande do Sul	Celulite	30
	Doença do Trato Respiratório	2
Total	APEC	91
	AFEC	29

3.2 Isolamento e identificação fenotípica de *Escherichia coli*

Todas as linhagens foram cultivadas em 5 mL de caldo Luria-Bertani (LB) (Sambrook *et al.*, 1989) a 37 °C por 18h, semeadas em ágar MacConkey (HIMEDIA), 37 °C por 18h, para seleção de bactérias lactose positivas. Após a obtenção de cultura pura, as linhagens foram submetidas a testes bioquímicos através dos meios EPM, MILi e Citrato de Simmons, e o resultado catalogado conforme o Quadro 1. As linhagens identificadas foram crescidas novamente em meio LB e, após incubação de 18-24 horas a 37 °C, 400 µL do meio com bactérias foram transferidos para um microtubo de congelamento de 1,5 mL, adicionados mais 400 µL de solução de Hogness e a suspensão armazenada em freezer a -70 °C.

EPM				MILi			Citrato de Simmons
Glicose	H ₂ S	Urease	L-triptofano-desaminase	Motilidade	Lisina descarboxilase	Indol	Citrato
+	+/-	-	-	+/-	+	+	-

Quadro 1. Caracterização bioquímica para *E. coli* pelos meios EPM, MILi e Citrato de Simmons.

3.3 Preparação do extrato de DNA

Cada linhagem foi semeada e incubada a 37 °C, por 18h, em um tubo de ensaio contendo 5 mL de caldo BHI (HiMedia). Em seguida, 1 mL da cultura foi transferida para um microtubo e centrifugado a 10.500 g. As células precipitadas foram suspensas em 1 mL de PBS, pH 8,0, esterilizado e agitadas por 30 segundos. O conteúdo foi, novamente, precipitado e o processo de lavagem repetido. Após a segunda lavagem com PBS, foram adicionados 500 µL de água Milli-Q e o microtubo colocado em água em ponto de ebulição por 10 min. Após esse tempo, as células foram precipitadas através de centrifugação a 10.500 g e o extrato de ácidos nucleicos recuperado do sobrenadante e depositado em outro microtubo. Esse material foi estocado em freezer a -20 °C até o momento de uso.

3.4 Detecção de genes de virulência por PCR

Todas as linhagens foram submetidas a reações em cadeia de polimerase (PCR) para a detecção de 38 genes de virulência (GAV) (Figura 1). A relação dos GAV com seus respectivos iniciadores estão descritos na Tabela 2. Os seguintes parâmetros foram usados na PCR: 50 ng de “DNA template” adicionados a uma mistura contendo 0,4 µL de dNTPs a 10 mM; 2 µL de tampão 10x (100 mM de Tris-HCl – pH 8,8 a 25°C, 500 mM de KCl); 1,6 µL de MgCl₂ a 25 mM; 0,8 µL de cada iniciador a 10 pM e uma unidade de *Taq* DNA polimerase (Fermentas, Europa). Água Milli-Q foi adicionada até atingir o volume final de 25 µL. Os ciclos de amplificação foram realizados em um termociclador gradiente (Applied Biosystems Veriti, EUA) sob as seguintes condições: t1, 5min a 94 °C; t2, 30s a 94 °C; t3, 45s a T_m de cada iniciador (Tabela 2); t4, 1min a 72 °C; 25 ciclos de repetição de t2-t4; e t5, 7min a 72 °C. O produto da reação (10µL) acrescentado de 5 µL de carga de tintura

(0,25% azul de bromofenol em 50% de glicerol) e o marcador molecular de 100 pb (Invitrogen) foram aplicados em um gel de agarose a 1,5% contendo brometo de etídio (1 µg/mL) em tampão Tris-Borato, EDTA e separados por eletroforese (70V/1h). O produto de amplificação foi visualizado por exposição do gel em luz UV e fotografado. O peso molecular dos fragmentos estão representados na Tabela 2. Os controles positivos para cada gene estão descritos na Tabela 2. Uma linhagem *E. coli* K12 foi utilizada como controle negativo em todas as amplificações. A linhagem APECO1 pertence à coleção do Laboratório de Genética Molecular Bacteriana (LBMB) do IB/UNICAMP e gentilmente cedida pela Dra. Lisa K. Nolan Universidade de Iowa, EUA. A linhagem FVL16 foi gentilmente cedida pelo Dr. Domingos da Silva Leite (UNICAMP). As linhagens SEPT362, EIEC1, APECO8, SCI07 pertencem à coleção do Laboratório de Genética Molecular Bacteriana do IB/UNICAMP. Para a detecção dos genes do sistema de secreção do tipo seis (SST6), foi utilizada a linhagem SEPT362, proveniente do LBMB, a qual foi caracterizada como portadora do sistema e com estrutura funcional do sistema segundo de PACE et. al. (2010). Os genes do SST6 pesquisados são idênticos aos encontrados em EHEC O157:H7 cepa Sakai.

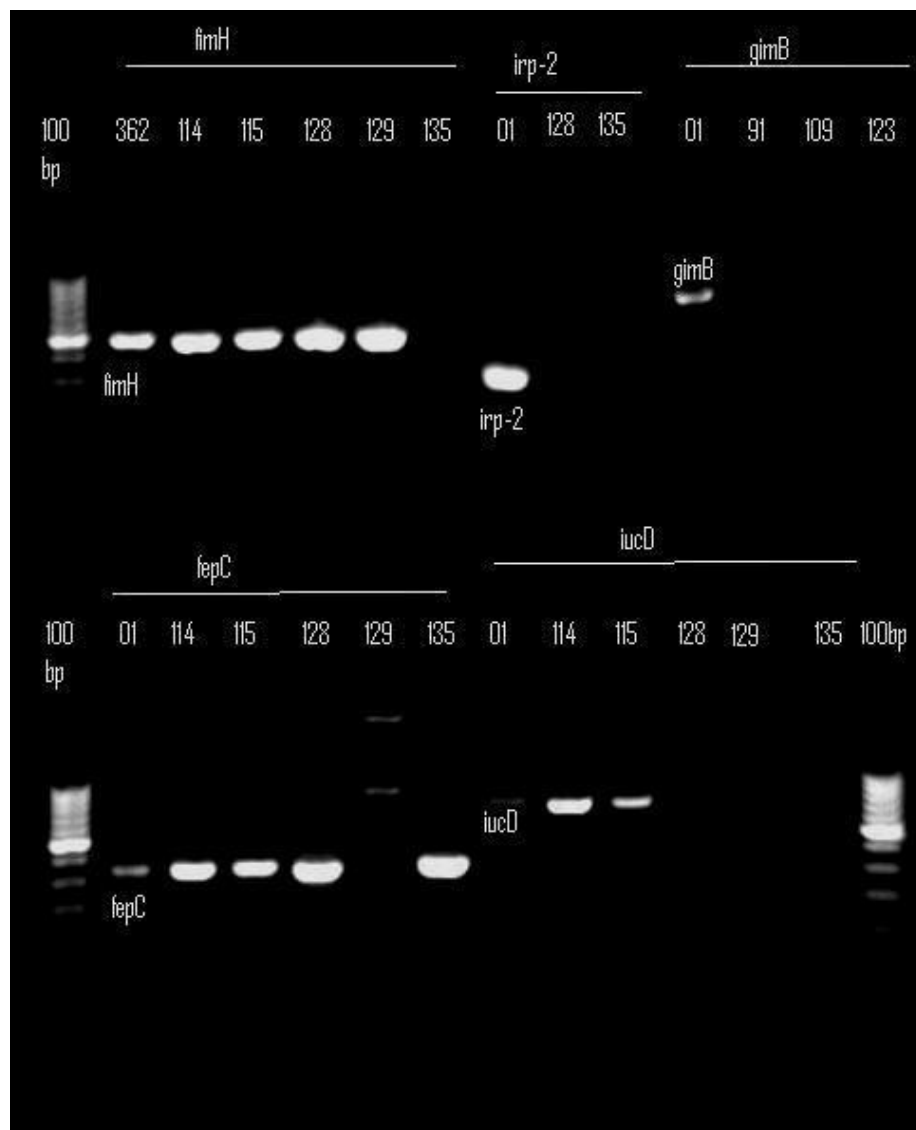


Figura 1. Representação dos produtos de amplificação da PCR, de DNAs padrões e linhagens aleatórias, para os genes *fimH*, *irp-2*, *gimB*, *fepC* e *iucD*. Nas margens, está representado o marcador de peso molecular para 100 pares de base.

Tabela 2. Genes relacionados à virulência, sequências de nucleotídeos iniciadores, tamanho do produto de amplificação, temperatura de anelamento, controles e referências utilizadas para as PCRs.

Gene	Sequência iniciadora (5' → 3')	pb	°C	Controle	Referência
<i>sat</i>	1: AGCCCTGTAGAATGGCGAGTA	779	60	FVL16	(Restieri <i>et al.</i> , 2007)
	2: GGTATTGATATCTCCGGTGAAC				
<i>pic</i>	1: ACTGGATCTTAAGGCTCAGG	410	50	FVL16	(Ewers <i>et al.</i> , 2007)
	2: TGGAATATCAGGGTGCCACT				
<i>vat</i>	1: TCCTGGGACATAATGGTCAG	980	60	APECO1	(Ewers <i>et al.</i> , 2007)
	2: GTGTCAGAACGGAATTGTC				
<i>hlyF</i>	1: GGCCACAGTCGTTTAGGGTGCTTACC	450	60	FVL16	(Johnson <i>et al.</i> , 2008b)
	2:GGCGGTTTAGGCATTCCGATACTCAG				
<i>fimH</i>	1: TGCAGAACGGATAAGCCGTGG	508	63	SEPT362	(Johnson e Stell, 2000)
	2: GCAGTCACCTGCCCTCCGGTA				
<i>sfaD/E</i>	1: CGGAGGAGTAATTACAACCTGGCA	410	55	FVL16	(Johnson e Stell, 2000)
	2:CTCCGGAGAACTGGGTGCATCTTAC				
<i>papC</i>	1:GTGGCAGTATGAGTAATGACCGTTA	200	60	APECO1	(Johnson e Stell, 2000)
	2:ATATCCTTTCTGAGGGATGCAATA				
<i>afa</i>	1:TAAGGAAGTGAAGGAGCGTG	809	60	FVL16	(Ewers <i>et al.</i> , 2007)
	2:CCAGTAACTGTCCGTGACA				
<i>lpfA</i> _{O157} /OI-141	1:CTGCGCATTGCCGTAAC	412	54	EDL933	(Szalo <i>et al.</i> , 2002)
	2:ATTTACAGGCGAGATCGTG				
<i>lpfA</i> _{O157} /OI-154	1:GCAGGTCACCTACAGGCGGC	525	55	EDL933	(Toma <i>et al.</i> , 2004)
	2:CTGCGAGTCGGAGTTAGCTG				
<i>iha</i>	1: TAGTGC GTTGGGTTATCGCTC	608	60	EDL933	(Ewers <i>et al.</i> , 2007)
	2: AAGCCAGAGTGGTTATTCGC				
<i>hra</i>	1: TCACTTGCAGACCAGCGTTTC	540	60	APECO8	(Ewers <i>et al.</i> , 2007)
	2:GTA ACTCACACTGCTGTCACCT				

<i>csaA</i>	1: ACTCTGACTTGACTATTACC 2: AGATGCAGTCTGGTCAAC	200	52	SCI07	(Maurer <i>et al.</i> , 1998)
<i>crl</i>	1: TTTCGATTGTCTGGCTGTTG 2: CTTCAGATTCAGCGTCGTC	250	54	SCI07	(Maurer <i>et al.</i> , 1998)
<i>tsh</i>	1: ACTATTCTCTGCAGGAAGTC 2: CTTCCGATGTTCTGAACGT	823	55	FVL16	(Ewers <i>et al.</i> , 2007)
<i>fepC</i>	1: TACCTGGATAATGCTGTCCG 2: ATGGTGTTGATGGGGCTGGC	350	60	FVL16	(Ye e Xu, 2001)
<i>irp-2</i>	1: AAGGATTCGCTGTTACCGGAC 2: TCGTCGGGCAGCGTTTCTTCT	286	60	APECO1	(Rodriguez-Siek <i>et al.</i> , 2005)
<i>iutA</i>	1: GGCTGGACATCATGGGAAGTGG 2: CGTCGGGAACGGGTAGAATCG	302	62	APECO1	(Johnson e Stell, 2000)
<i>iroN</i>	1: ATCCTCTGGTCGCTAACTG 2: CTGCACTGGCAAGAACTGTTCT	846	60	FVL16	(Ewers <i>et al.</i> , 2007)
<i>sitDep</i>	1: CTATCGAGCAGGTGAGGA 2: TTGAGAACGACAGCGACTTC	1032	60	SEPT362	(Ewers <i>et al.</i> , 2007)
<i>sitDcr</i>	1: ACTCCCATACACAGGATCTG 2: CTGTCTGTGTCCGGAATGA	553	60	FVL16	(Ewers <i>et al.</i> , 2007)
<i>iucD</i>	1: ACAAAAAGTTCTATCGCTTCC 2: CCTGATCCAGATGATGCTC	710	60	APECO1	(Ewers <i>et al.</i> , 2007)
<i>cvi/cva</i>	1: TCCAAGCGGACCCCTTATAG 2: CGCAGCATAGTTCCATGCT	597	60	APECO1	(Ewers <i>et al.</i> , 2007)
<i>iss(e)</i>	1: ATCACATAGGATTCTGCCG 2: CAGCGGAGTATAGATGCCA	309	60	SEPT362	(Ewers <i>et al.</i> , 2005)
<i>traT</i>	1: GTGGTGCGATGAGCACAG 2: TAGTTCACATCTTCCACCATCG	429	60	APECO1	(Ewers <i>et al.</i> , 2007)
<i>ibeA</i>	1: TGGAACCCGCTCGTAATATAC	341	60	SCI07	(Ewers <i>et al.</i> , 2007)

	2:CTGCCTGT CAAGCATTGCA				
<i>ompT</i>	1:TCATCCCGGAAGCCCTCACTACT 2:TAGCGTTTGCTGCACTGGCTTCTGAT	496	60	SEPT362	(Johnson <i>et al.</i> , 2008b)
<i>malX</i>	1: GGACATCCTGTTACAGCGCGCA 2:TCGCCACCAATCACAGCCGAAC	921	60	SEPT362	(Johnson e Stell, 2000)
<i>kpsMTI</i> I	1:GCGCATTTGCTGATACTGTTG 2:CATCCAGACGATAAGCATGAGCA	269	60	APECO1	(Johnson e Stell, 2000)
<i>kpsMTI</i> II	1:TCCTCTTGCTACTATTCCCCCT 2:AGGCGTATCCATCCCTCCTAAC	392	60	APECO1	(Johnson e Stell, 2000)
<i>neuC</i>	1:GGTGGTACATTCCGGGATGTC 2:AGGTGAAAAGCCTGGTAGTGTG	675	60	FVL16	(Watt <i>et al.</i> , 2003)
<i>gimB</i>	1:TCCAGATTGAGCATATCCC 2: CCTGTAACATGTTGGCTTCA	736	60	FVL16	(Ewers <i>et al.</i> , 2007)
<i>fyuA</i>	1: GCGACGGGAAGCGATGACTTA 2: CGCAGTAGGCACGATGTTGTA	774	60	APECO1	(Ewers <i>et al.</i> , 2007)
<i>icmF</i>	1:TGAATATATCATCCATCTGC 2:ATTATTCTGACACTCGATTTAC	502	50	SEPT362	(De Pace <i>et al.</i> , 2010)
<i>hcp</i>	1:ATG GCGAATTTAATTTATTTAACAC 2:ACTTAAAAAAGACGATCTTCCCATAAA	500	50	SEPT362	(De Pace <i>et al.</i> , 2010)
<i>clpV</i>	1: CTGCATAAGCATCTACTGAC 2: CGATGTTTTTACAGTCAATC	400	50	SEPT362	(De Pace <i>et al.</i> , 2010)
<i>vgrG</i>	1: GTATCTTCCAGAATGAGGAC 2: CATGTTTCATCACAGAAGATT	831	50	SEPT362	(De Pace <i>et al.</i> , 2010)

3.5 Determinação de grupo filogenético por PCR

A identificação dos genes *chuA*, *yjaA* e do fragmento de DNA TspE4.C2 foi realizada para as linhagens com os oligonucleotídeos iniciadores descritos anteriormente

(Clermont *et al.*, 2000), seguindo árvore dicotômica (Figura 2). A PCR foi feita como descrita anteriormente, com iniciadores e temperatura de anelamento descritos na Tabela 3. A linhagem APECO1 foi usada como controle positivo. Foi utilizada uma linhagem selvagem de *Proteus* sp. como controle negativo, pois é esperado que qualquer linhagem de *E. coli* amplifique ao menos um alvo nessa PCR. Não foi utilizado um gênero mais próximo de *Escherichia* como por exemplo, *Salmonella* pois embora esse gênero não apresente os genes *chuA* e *yjaA* pode amplificar um fragmento semelhante, o TspE4.C2 (Gordon *et al.*, 2008). Em cada PCR foi realizada também uma reação sem o “DNA template” para a verificação de possível contaminação (Figura 3).

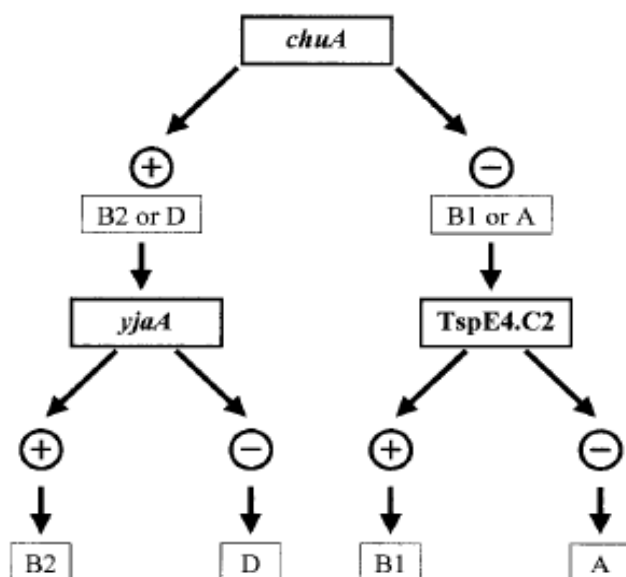


Figura 2. Árvore dicotômica para determinar o grupo filogenético de linhagens de *E. coli*, utilizando os resultados da PCR dos genes *chuA*, *yjaA* e o fragmento de DNA TspE4.C2.

Tabela 3. Sequência de nucleotídeos iniciadores para os genes *chuA*, *yjaA* e para o fragmento de DNA TspE4C2, tamanho do produto de amplificação e suas respectivas temperatura de anelamento.

Gene	Sequência iniciadora (5' → 3')	pb	°C
<i>chuA</i>	1: GACGAACCAACGGTCAGGAT	279	55
	2: TGCCGCCAGTACCAAAGACA		
<i>yjaA</i>	1: TGAAGTGTCTCAGGAGACGCTG	211	55
	2: ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC		
TspE4.C2	1: GAGTAATGTCGGGGCATTCA	152	55
	2: CGCGCCAACAAAGTATTACG		

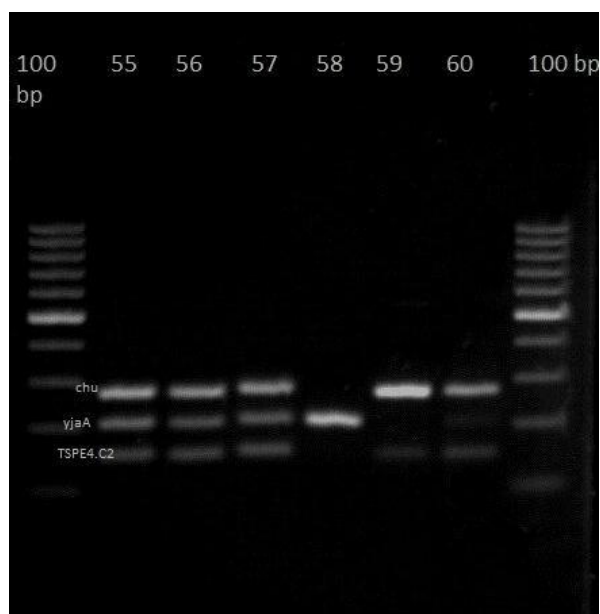


Figura 3. Produtos da amplificação da PCR, de amostras aleatórias, para os genes *chuA*, *yjaA* e TspE4.C2. Nas margens, está representado o marcador de peso molecular de 100 pares de base.

3.6 Determinação dos sorotipos

Para determinação do sorotipo as linhagens foram enviadas ao Centro de Referência em *E. coli*, da Universidade Estadual da Pensilvânia – EUA, onde foi realizada a sorotipagem para o antígeno O empregando todos os antissoros (O1-O181), com exceção dos antígenos O31, O47, O72, O93, O94, O122.

Para a determinação do sorotipo H, também na Universidade Estadual da Pensilvânia – EUA, foi utilizada a técnica de “Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism” (PCR-RFLP), para sorotipagem baseada no polimorfismo do gene *fliC*, relacionado à flagelina bacteriana, segundo método descrito por Fields *et al.* (1997).

3.7 Teste de patogenicidade *in vivo*

Foram utilizados 720 pintainhos de corte da linhagem Cobb, com 1 dia de idade, provenientes de um incubatório comercial localizado no Estado de São Paulo, para classificação das linhagens de *Escherichia coli* em alta, média ou baixa patogenicidade. As linhagens foram cultivadas em 4 mL de caldo LB, a 37 °C por 18h, em seguida, transferiram-se 40 uL deste para um segundo tubo contendo 4 mL de LB, o qual foi incubado a 37 °C por 18h, sob agitação de 150 rpm. Em seguida, o cultivo passou por uma lavagem em tampão fosfato-salino (PBS pH 7,4) a 1.200 g por 10 minutos a 4 °C. As células foram, então, ressuspensas em 4 mL de PBS e 100 uL do inóculo, contendo de 1×10^8 a 2×10^9 UFC/mL, foram inoculadas no saco aéreo torácico direito de cada pintainho, totalizando seis aves por linhagem. As aves foram alocadas em caixas com aquecimento, contendo ração e água *ad libitum* e observadas diariamente, por um período de sete dias, quanto à mortalidade e lesões.

A classificação entre alta, média e baixa patogenicidade foi realizada conforme o método proposto por Rosenberger *et al.* (1985) no qual, a linhagem cujo grupo desafiado apresentar mais de 50% de mortalidade ou lesões severas na necropsia é considerado como de alta patogenicidade. As linhagens que demonstrarem-se não letais e com lesões severas

em menos de 50% das aves, são considerados de média patogenicidade e os que não apresentarem mortalidade ou apenas lesões referentes à inoculação são classificados como de baixa patogenicidade.

3.8 Análise de Agrupamento dos Genes de Virulência

A análise de agrupamento foi baseada na presença e ausência de todos os GAV conforme a origem das linhagens. Uma matriz binária foi usada para determinar similaridades usando a função de correlação, não centralizada e “complete linkage”, e as linhagens foram agrupadas usando o software Gene Cluster 3.0 (De Hoon *et al.*, 2004). As árvores de distâncias foram elaboradas usando o software Java TreeView 1.1.6r2.

3.9 Análise Estatística

Os resultados foram analisados pelo teste exato de Fisher que determina diferenças entre presença e ausência dos GAV entre APEC e comensais os quais foram considerados estatisticamente significativos se $p < 0,05$.

3.10 Meios de cultura e soluções

Soluções utilizadas na identificação das linhagens:

Meio Luria-Bertani (LB) (Sambrook *et al.*, 1989)

Triptona	10 g
NaCl	10 g
Extrato de Levedura	5 g
Água destilada/deionizada q.s.p.	1000 mL

Após o preparo, o meio de cultura foi esterilizado em autoclave a 121, 6°C, durante 20 minutos.

Meio ágar MacConkey

O meio de cultura utilizado foi o da formulação fornecida pela Himedia[®].

Meio “Brain Heart Infusion” (BHI) - Ágar

O meio de cultura utilizado foi o da formulação fornecida pela Himedia[®], com a adição de 2% de ágar bacteriológico.

Solução de Hogness (Sambrook *et al.*, 1989)

K ₂ HPO ₄	6,30 g
Na ₃ C ₆ H ₅ O.2H ₂ O	0,45 g
MgSO ₄ .7 H ₂ O	0,09 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,90 g
KH ₂ PO ₄	1,80 g
Glicerol	44,00 mL
Água destilada/deionizada q.s.p.	100,00 mL

Após o preparo, a solução foi esterilizada, sob vapor fluente, durante 30 minutos. Para estocagem das linhagens bacterianas (-80 °C), foram adicionados 400µl de solução de Hogness a 400µl de meio LB contendo a linhagem.

Soluções utilizadas na eletroforese e visualização em gel de agarose:

Tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) 5X

Tris-base	54,0 g
Ácido bórico	27,5 g
Solução de EDTA 0,5 M	20,00 mL
Água destilada/deionizada q.s.p.	1000,00 mL

Após o preparo a solução foi armazenada a 4 °C.

Solução corante de brometo de etídio (0,5 mg/mL)

Brometo de etídio 1%	0,05mL
Água destilada/deionizada q.s.p.	100,00mL

Esta solução foi mantida sob refrigeração

Tampão de Ressuspensão de DNA

Os corantes azul de bromofenol e xileno cianol foram adicionados à concentração final de 0,25%, para cada um dos corantes, a uma solução de sacarose 50%. Após o preparo, a solução foi armazenada a 4 °C. Esta solução foi concentrada 6X e utilizada no preparo de linhagens eletroforéticas para uma concentração final de 1X.

Soluções utilizadas no teste de patogenicidade *in vivo*:**Tampão Salina Fosfatada (PBS) 0,01 M**

Cloreto de sódio	8,00 g
KCl	0,20 g
KH ₂ PO ₄	0,20 g
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	2,89 g
Água destilada/deionizada q.s.p.	1000,00 mL

Os sais foram diluídos em 10% a menos do volume final, com exceção do KH₂PO₄, o qual foi diluído separadamente e utilizado no ajuste do pH da solução para 7,4. Em seguida, a solução final foi esterilizada, em autoclave, a 121°C, durante 20 minutos, e armazenada a 4 °C até a sua utilização.

4 RESULTADOS

4.1 Teste de patogenicidade *in vivo*

A Figura 4 mostra a porcentagem de linhagens classificadas conforme a patogenicidade. Do total das linhagens APEC, 46 (50,5%) foram classificadas como de alta patogenicidade, 13 (14,3%) de média patogenicidade e 32 (35,2%) de baixa patogenicidade. Entre as linhagens AFEC, 7 (24,1%) apresentaram alta patogenicidade, 8 (27,5%) média patogenicidade e 14 (48,2%) baixa patogenicidade. No teste exato de Fisher, as linhagens APEC e AFEC de alta patogenicidade, demonstraram-se diferentes estatisticamente ($p=0,05$).

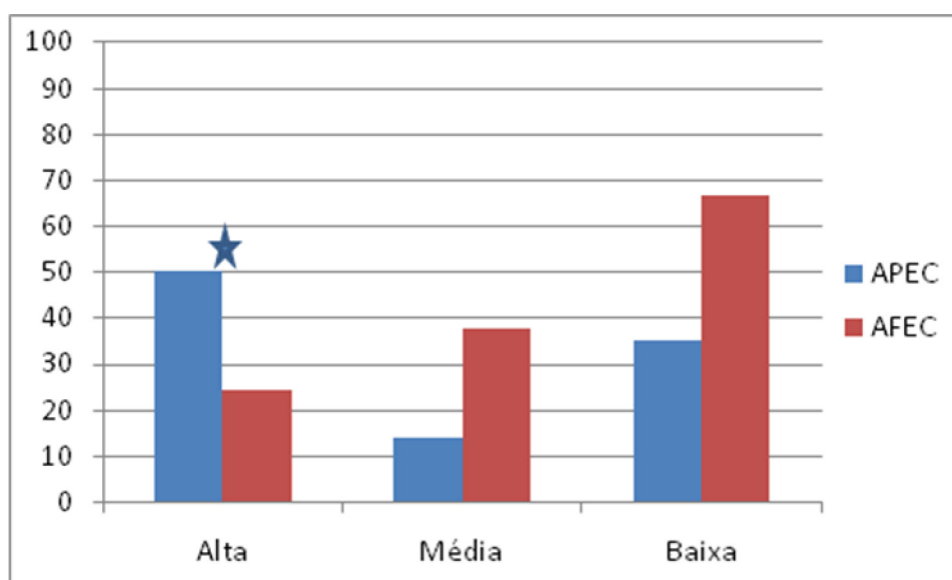


Figura 4. Frequência de linhagens de *E. coli* de origem aviária como alta, média e baixa patogenicidade em teste com pintos de um dia de idade.

A Figura 5 representa uma ave inoculada com uma linhagem de baixa patogenicidade (A), onde foram observadas alterações no saco pericárdico (C) ou fígado (D). Já em outra ave inoculada (B), porém com uma linhagem de alta patogenicidade, pode-se observar lesões como pericardite (E) e perihepatite (F).

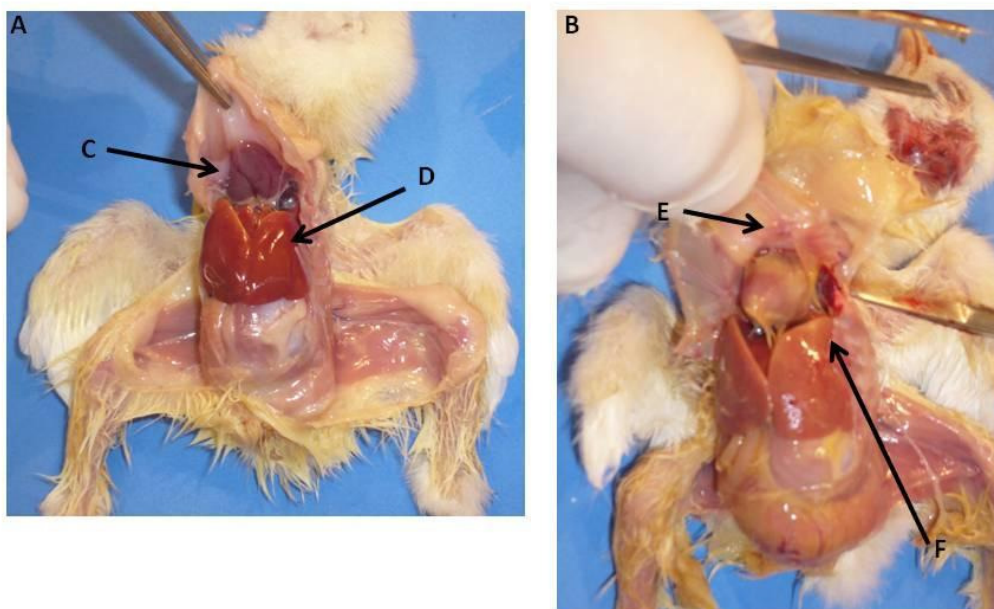


Figura 5. Tipos de lesões de colibacilose encontradas nas necropsias realizadas. A) Ave inoculada com linhagem não virulenta DH5α; B) Ave inoculada com linhagem RS44c; C) saco pericárdico sem alterações, D) Fígado sem alterações, E) Pericadite, F) Peri-hepatite.

4.2 Frequência de detecção dos genes relacionados à virulência

Trinta e oito GAV foram pesquisados em duas categorias de *Escherichia coli* aviária (APEC e AFEC) (Tabela 3). Os genes que apresentaram uma frequência maior ou igual a 50%, nas duas populações, foram *fimH* (81,7%), *hlyF* (64,2%), *crl* (60,8%), *csg* (50,8%) e *ompT* (50%). Para a população de APEC, os genes de maior frequência foram *fimH* (83,5%), *hlyF* (71,4%), *crl* (64,8%), *csg* e *iucD* (57,1%), *iutA* (54,9) e *ompT* (52,7%). O gene *iha* foi encontrado em menor frequência, estando presente em apenas uma linhagem de Pernambuco. Nenhuma das linhagens apresentou os genes *sat*, *gimB* e *afa*. Nas linhagens AFEC, os genes com frequência igual ou superior a 50% foram *fimH* (75,9%), *vgrG* (69%) e *traT* (55,2%). Nenhuma linhagem apresentou os genes, *lpfA*_{O157/O1-154}, *kpsMT3*, *sfa*, *iha*, *gimB*, *sat* e *afa*.

A Tabela 4 demonstra, também, as frequências de GAV observadas entre as linhagens isoladas nos diferentes Estados. Em todos os Estados, *fimH* esteve presente em mais de 50% nas linhagens APEC. Para o Estado de Pernambuco (PE), além de *fimH* (100%), os GAV mais frequentes foram *hlyF*, *ompT*, *traT*, *iss* (100%), *iucD* (83,3%), *crl*, *iutA* (66,7%), *fepC*, *iroN* e *fyuA* (50%). É importante notar que nesta população foi encontrada uma única linhagem *iha*⁺ (PE21). Da mesma forma, os GAV mais frequentes nas linhagens de São Paulo (SP) foram *traT* (56,5%), *sitDe*, *csg* (52,2%) e *iroN* (52,1%). Para as linhagens provenientes do Paraná (PR) foram encontrados os genes *iss* (78,3%), *sitDe* (73,9%), *hlyF*, *traT* (69,6%), *tsh* (60,9%) e *crl* (56,5%). Nestas linhagens, foi observado que o gene *lpfA*_{O157/O1-154} foi detectado em uma frequência superior aos demais Estados (47,8%). Já para as linhagens do Rio Grande do Sul (RS) os GAV mais frequentes foram *crl* (92,3%), *hlyF* (82,1%), *iutA* (79,5%), *iucD* (76,9%), *csg* (74,4%), *ompT* (64,1%), *iroN* (59%) e *fepC* (56,4%). Duas linhagens *sfa*⁺ (RS45 e RS34) foram encontradas nesta população.

Em relação às linhagens AFEC, os GAV mais encontrados para SP foram *vgrG* (70,6%), *fimH* (64,7%) e *csg* (52,9%). Já para as linhagens de PE, foram observados os genes *fimH* (91,7%), *vgrG*, *traT* (66%) e *crl* (58,3%) como GAV de frequência igual ou superior a 50%. Considerando as duas populações, os GAV com maiores frequências foram *fimH* (75,9%), *vgrG* (69%) e *traT* (55,2%).

Tabela 4. Frequência (%) dos genes relacionados à virulência em linhagens APEC e AFEC.

Gene	Total (n=120)	APEC (n=91)	APEC				AFEC (n=29)	AFEC	
			PE (n=6)	SP (n=23)	PR (n=23)	RS (n= 39)		PE (n=12)	SP (n=17)
Adesinas									
<i>afa</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>crl</i>	73 (60,8)	59 (64,8)	4 (66,7)	6 (26,1)	13 (56,5)	36 (92,3)	14 (48,3)	7 (58,3)	7 (41,2)
<i>csg</i>	61 (50,8)	52 (57,1)	0 (0)	12 (52,2)	11 (47,8)	29 (74,4)	9 (31)	0 (0)	9 (52,9)
<i>fimH</i>	98 (81,7)	76 (83,5)	6 (100)	17 (73,9)	18 (78,3)	35 (89,7)	22 (75,9)	11 (91,7)	11 (64,7)
<i>hra</i>	13 (10,8)	8 (8,8)	0 (0)	1 (4,3)	4 (17,4)	3 (7,7)	5 (17,2)	1 (8,3)	4 (23,5)
<i>iha</i>	1 (0,8)	1 (1,1)	1 (16,7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>lpf-O1141</i>	7 (5,8)	5 (5,5)	0 (0)	4 (17,4)	1 (4,3)	0 (0)	2 (6,9)	0 (0)	2 (11,8)
<i>lpf-O1154</i>	16 (13,3)	16 (17,6)	1 (16,7)	3 (13)	11 (47,8)	1 (2,6)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>papC</i>	20 (16,7)	19 (20,9)	0 (0)	1 (4,3)	8 (34,8)	10 (25,6)	1 (3,4)	0 (0)	1 (5,9)
<i>sfa</i>	2 (1,7)	2 (2,2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (5,1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>tsh</i>	40 (33,3)	35 (38,5)	1 (16,7)	7 (30,4)	14 (60,9)	13 (33,3)	5 (17,2)	0 (0)	5 (29,4)
Sistemas de captação de ferro									
<i>fepC</i>	43 (35,8)	37 (40,7)	3 (50)	3 (13)	9 (39,1)	22 (56,4)	6 (20,7)	3 (25)	3 (17,6)
<i>fyuA</i>	33 (27,5)	28 (30,8)	3 (50)	5 (21,7)	8 (34,8)	12 (30,8)	5 (17,2)	5 (41,7)	0 (0)
<i>iroN</i>	54 (45)	43 (47,3)	3 (50)	12 (52,1)	5 (21,7)	23 (59)	11 (37,9)	3 (25)	8 (47,1)
<i>irp-2</i>	34 (28,3)	30 (33)	2 (33,3)	2 (8,7)	8 (34,8)	18 (46,2)	4 (13,8)	4 (33)	0 (0)
<i>iucD</i>	59 (49,2)	52 (57,1)	5 (83,3)	9 (39,1)	8 (34,8)	30 (76,9)	7 (24,1)	2 (16,7)	5 (29,4)
<i>iutA</i>	58 (48,3)	50 (54,9)	4 (66,7)	11 (47,8)	4 (17,4)	31 (79,5)	8 (27,6)	2 (16,7)	6 (35,3)
<i>sitDc</i>	11 (9,2)	10 (11)	0 (0)	1 (4,3)	6 (26,1)	3 (7,7)	1 (3,4)	1 (8,3)	0 (0)
<i>sitDe</i>	50 (41,7)	42 (46,2)	2 (33,3)	12 (52,2)	17 (73,9)	11 (28,2)	8 (27,6)	2 (16,7)	6 (35,3)
Resistência ao soro									
<i>cvi</i>	36 (30)	31 (34,1)	2 (33,3)	8 (34,8)	6 (26,1)	15 (38,5)	5 (17,2)	0 (0)	5 (29,4)
<i>iss</i>	56 (46,7)	45 (49,5)	6 (100)	9 (39,1)	18 (78,3)	12 (30,8)	11 (37,9)	4 (33,3)	7 (41,2)
<i>kpsMT2</i>	15 (12,5)	13 (14,3)	0 (0)	0 (0)	2 (8,7)	11 (28,2)	2 (6,9)	0 (0)	2 (11,8)
<i>kpsMT3</i>	6 (5)	6 (6,6)	0 (0)	5 (2,1)	0 (0)	1 (2,6)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>ompT</i>	60 (50)	48 (52,7)	6 (100)	7 (30,4)	10 (43,5)	25 (64,1)	12 (41,4)	5 (41,7)	7 (41,2)
<i>neuc</i>	16 (13,3)	7 (7,7)	0 (0)	1 (4,3)	2 (8,7)	4 (10,3)	9 (31)	1 (8,3)	8 (47,1)
<i>traT</i>	61 (50,8)	45 (49,5)	6 (100)	13 (56,5)	16 (69,6)	10 (25,6)	16 (55,2)	8 (66)	8 (47,1)
Toxinas									
<i>ast</i>	19 (15,8)	12 (13,2)	1 (16,7)	3 (13)	3 (13)	5 (12,8)	7 (24,1)	2 (16,7)	5 (29,4)
<i>hlyF</i>	77 (64,2)	65 (71,4)	6 (100)	11 (47,8)	16 (69,6)	32 (82,1)	12 (41,4)	4 (33,3)	8 (47,1)
<i>sat</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>vat</i>	16 (13,3)	12 (13,2)	1 (16,7)	2 (8,7)	5 (21,7)	4 (10,3)	4 (13,8)	1 (8,3)	3 (17,6)
Invasinas									
<i>gimB</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>ibea</i>	11 (9,2)	9 (9,9)	0 (0)	1 (4,3)	1 (4,3)	7 (17,9)	2 (6,9)	1 (8,3)	1 (5,9)
Outros									
<i>malx</i>	16 (13,3)	15 (16,5)	1 (16,7)	6 (26,1)	1 (4,3)	7 (17,9)	1 (3,4)	1 (8,3)	0 (0)
<i>pic</i>	10 (8,3)	6 (6,6)	1 (16,7)	0 (0)	2 (8,7)	3 (7,7)	4 (13,8)	1 (8,3)	3 (17,6)

A Tabela 5 mostra a frequência dos GAV nas linhagens de alta e média patogenicidade frente às linhagens de baixa patogenicidade. As linhagens que continham genes em uma frequência maior, ou igual, a 50%, em linhagens de alta e média patogenicidade, continham os genes *fimH* (90,5%), *hlyF* (82,4%), *iucD* (71,6%), *ompT*, *iutA* (64,6%), *crl* (66,2%), *iroN* (60,8%), *iss* (59,5%), *vgrG* (58,1%), *traT* (55,4%), *csg*, *fepC* (51,4%). Já para as linhagens de baixa patogenicidade estão *fimH* (67,4%), *crl* (52,2%) e *csg* (50%), apenas. As linhagens de alta e média patogenicidade, em geral, apresentaram pelo menos um GAV relacionado à adesão, sistema captação de ferro e resistência ao soro do hospedeiro enquanto as linhagens de baixa patogenicidade apresentaram em média pelo menos um gene relacionado à adesão.

É importante notar que, pelo teste exato de Fisher, os GAV que diferenciam linhagens de alta e média patogenicidade das de baixa patogenicidade são *hlyF*, *iucD*, *ompT*, *iutA*, *iroN*, *fepC*, *cvi* todos com $p < 0,001$, *fimH*, *iss*, *tsh*, *irp-2*, *fyuA*, *papC*, *malx* todos com $p < 0,05$.

Tabela 5. Frequência (%) dos genes relacionados à virulência em linhagens de Alta/Média e Baixa patogenicidade.

Gene	Alta/Média	Baixa	Gene	Alta/Média	Baixa	Gene	Alta/Média	Baixa
Adesinas			Captação de ferro			Resistência ao soro		
<i>afa</i>	0	0	<i>**fepC</i>	38 (51,4)	5 (10,9)	<i>**cvi</i>	32 (43,2)	4 (8,7)
<i>crl</i>	49 (66,2)	24 (52,2)	<i>*fyuA</i>	27 (36,5)	6 (13)	<i>*iss</i>	44 (59,5)	12 (26,1)
<i>csg</i>	38 (51,4)	23 (50)	<i>**iroN</i>	45 (60,8)	9 (19,6)	<i>kpsMT2</i>	11 (14,9)	4 (8,7)
<i>*fimH</i>	67 (90,5)	31 (67,4)	<i>*irp-2</i>	29 (39,2)	5 (10,9)	<i>kpsMT3</i>	5 (6,8)	1 (2,2)
<i>hra</i>	9 (12,2)	4 (8,7)	<i>**iucD</i>	53 (71,6)	6 (13)	<i>neuC</i>	11 (14,9)	5 (10,9)
<i>iha</i>	1 (1,4)	0	<i>**iutA</i>	50 (67,6)	8 (17,4)	<i>**ompT</i>	50 (67,6)	10 (21,7)
<i>lpfO141</i>	6 (8,1)	1 (2,2)	<i>sitDc</i>	9 (12,2)	2 (4,3)	<i>traT</i>	41 (55,4)	20 (43,5)
<i>lfpO154</i>	11 (14,9)	5 (10,9)	<i>sitDe</i>	36 (48,6)	14 (30,4)			
<i>*papC</i>	18 (24,3)	2 (4,3)						
<i>sfa</i>	2 (2,7)	0						
<i>*tsh</i>	34 (45,9)	6 (13)						
Toxinas			Invasinas			Outros		
<i>ast</i>	11 (14,9)	8 (17,4)	<i>gimB</i>	0	0	<i>clpV</i>	15 (20,3)	3 (6,5)
<i>**hlyF</i>	61 (82,4)	16 (34,8)	<i>ibea</i>	10 (13,5)	1 (2,2)	<i>hcp</i>	6 (8,1)	0
<i>sat</i>	0	0				<i>icmF</i>	14 (18,9)	8 (17,4)
<i>vat</i>	11 (14,9)	5 (10,9)				<i>vgrG</i>	43 (58,1)	21 (45,7)
						<i>*malx</i>	15 (20,3)	1 (2,2)
						<i>pic</i>	6 (8,1)	4 (8,7)

* $p < 0,05$, ** $p < 0,001$

A Tabela 6 mostra a frequência de detecção dos genes do sistema de secreção tipo 6 (SST6), entre as linhagens APEC e AFEC, assim como com nas linhagens de alta/ média e baixa patogenicidade. Os genes pesquisados são idênticos aos encontrados em EHEC O157:H7 cepa Sakai (De Pace *et al.*, 2010; De Pace *et al.*, 2011). Nenhum gene foi detectado em 41 (45,1%) linhagens APEC. O gene mais frequente nesta população foi o *vgrG*, estando presente, individualmente, em 27 (29,7%) das linhagens das quais 23 (59%) eram do RS. Em relação às linhagens AFEC, 10 (21,7%) também apresentaram o gene *vgrG* como o mais frequente, sendo nove linhagens (19,6%) negativas para todos os genes. Da mesma forma, o grupo de alta/média patogenicidade apresentou 29 (39,2%) linhagens negativas para todos os genes. Vinte e três (31,1%) apresentaram o gene *vgrG* como mais frequente. Aquelas de baixa patogenicidade também apresentaram dados semelhantes, onde 21 (45,7%) das linhagens foram negativas para todos os genes e 14 (30,4%) positivas apenas para *vgrG*. Cinco (5,5%) linhagens APEC apresentaram a combinação dos genes *vgrG*, *clpV* e *icmF*. Entre as AFEC, a combinação mais frequente foi a dos genes *vgrG* e *icmF*, presente em 5 (10,9%) das linhagens. Resultado semelhante também para o grupo de linhagens de alta/média patogenicidade, onde seis (8,1%) das linhagens apresentaram a combinação *vgrG*, *clpV* e *icmF* e cinco (10,9%) das linhagens de baixa patogenicidade apresentando a combinação de *vgrG* e *icmF*. Apenas uma linhagem (PR14), de média patogenicidade, apresentou os quatro genes do SST6 pesquisados.

Tabela 6. Frequência (%) de detecção dos genes e genótipos do sistema de secreção tipo 6 (SST6) em Linhagens de *E. coli* aviária.

	<i>vgrG</i>	<i>clpV</i>	<i>icmF</i>	<i>hcp</i>	<i>vgrG, clpV, icmF</i>	<i>vgrG, clpV, hcp</i>	<i>vgrG, icmF, hcp</i>	<i>vgrG, clpV</i>	<i>vgrG, icmF</i>	Todos	Nenhum
APEC (n=91)	27 (29,7)	2 (2,2)	4 (4,4)	0	5 (5,5)	2 (2,2)	1 (1,1)	4 (4,4)	4 (4,4)	1 (1,1)	41 (45,1)
PE (n=6)	2 (33,3)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4 (66,6)
SP (n=23)	0	0	1 (4,3)	0	2 (8,7)	0	1 (4,3)	0	2 (8,7)	0	17 (73,9)
PR (n=23)	2 (8,7)	1 (4,3)	2 (8,7)	0	2 (8,7)	0	0	2 (8,7)	0	1 (4,3)	13 (56,5)
RS (n=39)	23 (59)	1 (2,6)	1 (2,6)	0	1 (2,6)	2 (5,1)	0	2 (5,1)	2 (5,1)	0	7 (17,9)
AFEC (n=46)	10 (21,7)	0	0	0	1 (2,2)	1 (2,2)	1 (2,2)	2 (4,3)	5 (10,9)	0	9 (19,6)
PE (n=12)	6 (50)	0	0	0	0	0	0	2 (16,7)	0	0	4 (33,3)
SP (n=17)	4 (23,5)	0	0	0	1 (5,9)	1 (5,9)	1 (5,9)	0	5 (29,4)	0	5 (29,4)
Alta/média (n=74)	23 (31,1)	1 (1,4)	1 (1,4)	0	6 (8,1)	3 (4,1)	2 (2,7)	4 (5,4)	4 (5,4)	1 (1,4)	29 (39,2)
Baixa (n=46)	14 (30,4)	1 (2,2)	3 (6,5)	0	0	0	0	2 (4,3)	5 (10,9)	0	21 (45,7)

4.3 Determinação do Grupo Filogenético

A Figura 6 apresenta a determinação do grupo filogenético (GF) das linhagens estudadas. Dezesesseis (55,2%) linhagens AFEC foram classificadas como pertencentes ao GF A, enquanto que 11 (37,9%) foram classificadas como B1. Tanto o GF B2 quanto o D apresentaram duas (6,8%) linhagens cada (Figura 2). Já para as linhagens APEC, 36 (40,2%) foram classificadas como B1, 26 (28,3%) como D, 15 (16,3%) como B2 e 14 (15,2%) como A.

Esta figura também apresenta a frequência das APEC por Estado. Quatro linhagens do Estado de PE, 66,7%, pertencem ao GF B1 e duas (33,3%) ao GF A. Nenhuma linhagem de Pernambuco foi classificada nos grupos B2 ou D. Já para as linhagens provenientes do Paraná, 17 (73,9%) pertencem ao GF B1, cinco (21,7%) ao B2 e uma (4,3%) ao D. Nenhuma foi classificada como A. Para as linhagens provenientes do RS, 19 (48,7%) pertencem ao grupo D, seguidas de oito (20,5%) no GF B1 e seis (15,4%) para cada grupo A e B2. As linhagens de SP apresentaram distribuição mais homogênea quanto à classificação dos GFs, onde oito (33,3%) pertencem ao grupo B1, seis (25%) ao grupo A e a mesma frequência para o grupo D e apenas quatro (16,7%) para o grupo B2.

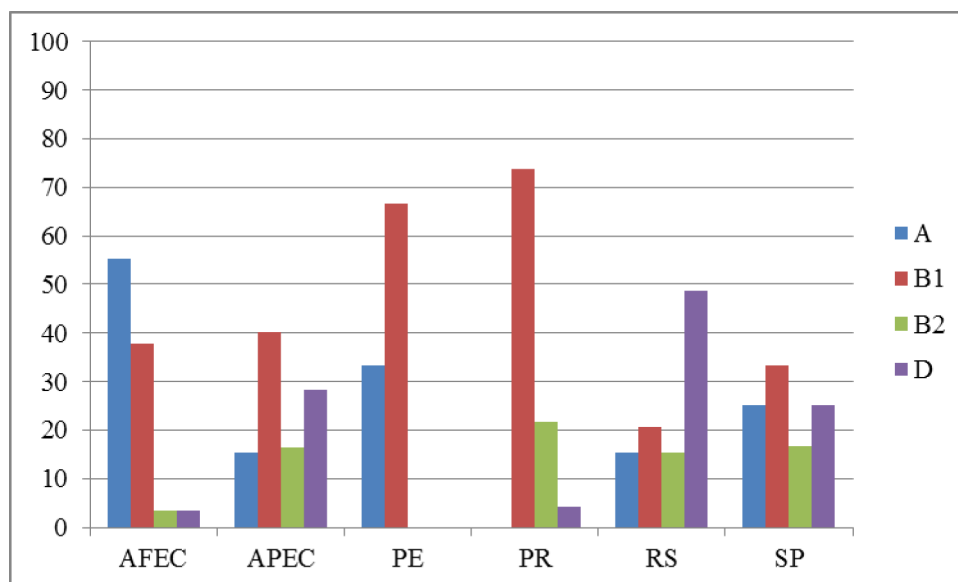


Figura 6. Frequência de linhagens de *E. coli* consideradas AFEC, APEC e APEC por Estado, alocadas dentro de cada grupo filogenético de *E. coli*.

A Figura 7 representa a frequência de linhagens de *E. coli* de origem aviária de baixa patogenicidade versus alta e média patogenicidade, alocadas dentro de cada grupo filogenético de *E. coli*.

Entre as linhagens de alta e média patogenicidade, 24 (32,4%) foram classificadas como B1 e outras 24 (32,4%) como D, enquanto que 13 (17,6%) linhagens foram pertencentes ao grupo A e 13 (17,6%) ao grupo B2. Ao passo que nas linhagens de baixa patogenicidade, 23 (50%) foram classificadas como B1, 17 (37%) como A, três (6,5%) no grupo B2 e três como D (Figura 4). É importante notar que, pelo teste exato de Fisher, as linhagens de baixa patogenicidade se distinguiram significativamente das linhagens alta e média patogenicidade em relação ao GF A, apresentando um valor de $p=0,029$. Enquanto que o GF D demonstrou uma diferença extremamente significativa ($p=0,0007$) entre as linhagens de alta e média patogenicidade frente às de baixa patogenicidade.

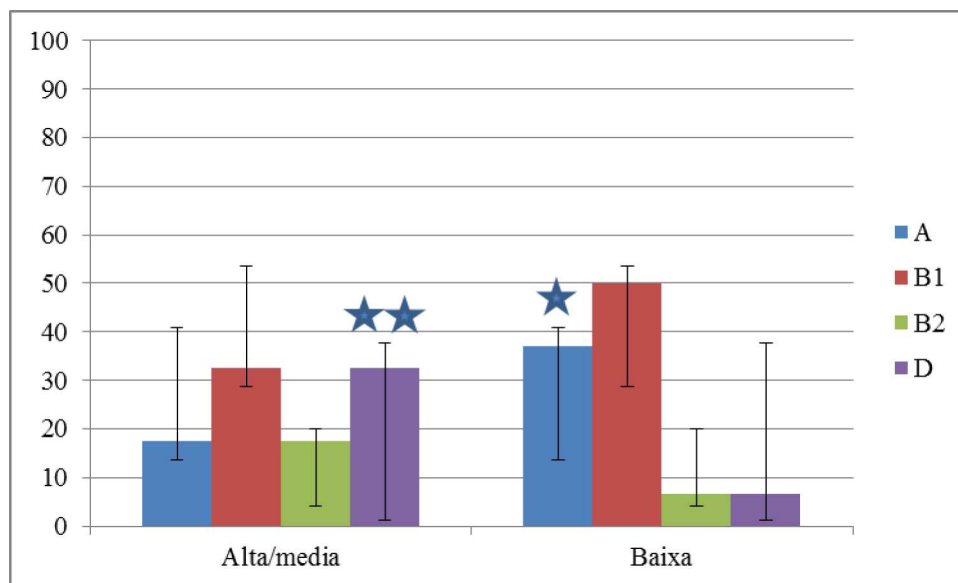


Figura 7. Frequência de linhagens de *E. coli* de origem aviária de Baixa patogenicidade versus Alta e Média patogenicidade, alocadas dentro de cada grupo filogenético de *E. coli*.

*($p<0,05$) **($p<0,001$).

4.4 Determinação dos sorogrupos

A Tabela 7 apresenta a frequência de linhagens de alta, média e baixa patogenicidade por sorotipo. Trinta e duas linhagens (26,7%) não foram tipáveis através da análise do antígeno somático (O). O antígeno flagelar (H) mais comumente detectado foi o H21, presente em 10 linhagens O não tipáveis. Nove (7,5%) linhagens são rugosas, porém sem possibilidade de definição de seu sorogrupo. O sorogrupo O8 foi o de maior frequência entre todos os outros, classificando 14 (11,7%) linhagens, onde cinco (6,8%) são de alta patogenicidade e nove (19,6%) são de baixa patogenicidade.

As Tabelas 8 e 9 trazem as frequências dos sorotipos em APEC e AFEC, respectivamente. Dentre as APEC, 49 sorotipos foram identificados. As linhagens O não tipáveis foram as mais frequentes, 25 (27,5%), onde o antígeno H21 apresentou-se associado em dez (11%) das linhagens, sendo uma do Estado de PE e nove do RS. Quatorze (14,3%) linhagens apresentaram-se rugosas pertencentes ao Estado de SP. Dentre os sorogrupos identificados, o antígeno O8 foi o mais frequente, estando presente em 12 (13,2%) das linhagens APEC onde H9 e H21 foram descritos em três (3,3%) linhagens para cada antígeno H. Por fim, seis (6,6%) foram descritas como O150:HM, provenientes do Estado do PR.

Com relação às AFEC, praticamente não houve um sorotipo frequente em destaque. Três (10,3%) linhagens foram descritas como O não tipável, duas (6,9%) como O5 e duas (6,9%) como O8. As outras 22 linhagens apresentaram-se distribuídas entre outros 23 sorotipos distintos.

Tabela 7. Sorotipagem O e H para as linhagens de E. coli de alta, média e baixa patogenicidade.

O	H	Alta/Media n (%)	Baixa n (%)	Total n (%)	O	H	Alta/Media n (%)	Baixa n (%)	Total n (%)	O	H	Alta/Media n (%)	Baixa n (%)	Total n (%)
Neg		23 (31,1)	9 (19,6)	32 (26,7)		51	-	1	1		19	1	-	1
	4	5	-	5	Rug		5 (6,8)	4 (8,7)	9 (7,5)		21	2	-	2
	7	-	2	2		4	-	1	1	O9		2 (2,7)	1 (2,2)	3 (2,5)
	9	1	-	1		25	-	1	1		45	-	1	1
	10	1	1	2		53	-	1	1		51	1	-	1
	12	2	-	2		neg	5	-	5		34	1	-	1
	19	1	-	1	O150		6 (8,1)	-	6 (5)	O153		2 (2,7)	1 (2,2)	3 (2,5)
	21	9	1	10	O5		2 (2,7)	4 (8,7)	6 (5)		05	1	-	1
	28	1	1	2		10	-	2	2		12	-	1	1
	38	-	1	1		11	2	-	2		34	1	-	1
	neg	2	1	3		110	-	2	2	O19		2 (2,7)	1 (2,2)	3 (2,5)
O8		5 (6,8)	9 (19,6)	14 (11,7)	O7		4 (5,4)	1 (2,2)	5 (4,2)		19	-	1	1
	9	2	1	3		M	4	1	5		25	1	-	1
	10	1	-	1	O2		5 (6,8)	-	5 (4,2)		Neg	1	-	1
	11	-	1	1		5	2	-	2	O36		2 (2,7)	-	2 (1,7)
	20	-	2	2		9	1	-	1		4	1	-	1
	21	1	2	3		Neg	2	-	2		5	1	-	1
	48	-	1	1	O100		4 (5,4)	-	4 (3,3)	O73		-	2 (4,3)	2 (1,7)
	49	1	1	2		08	1	-	1		12	-	1	1

O	H	Alta/Media <i>n</i> (%)	Baixa <i>n</i> (%)	Total <i>n</i> (%)	O	H	Alta/Media <i>n</i> (%)	Baixa <i>n</i> (%)	Total <i>n</i> (%)
	Neg	-	1	1	O118	29	-	1 (2,2)	1 (0,8)
O15		2 (2,7)	-	2 (1,7)	O119	110	-	1 (2,2)	1 (0,8)
	01	1	-	1	O136	25	-	1 (2,2)	1 (0,8)
	11	1	-	1	O120	04	1 (1,4)	-	1 (0,8)
O113		1 (1,4)	1 (2,2)	2 (1,7)	O126	27	1 (1,4)	-	1 (0,8)
	04	1	-	1	O137	Neg	1 (1,4)	-	1 (0,8)
	13	-	1	1	O153	12	-	1 (2,2)	1 (0,8)
O12	10	1 (1,4)	-	1 (0,8)	O156	Neg	1 (1,4)	-	1 (0,8)
O18	16	-	1 (2,2)	1 (0,8)	O158	09	-	1 (2,2)	1 (0,8)
O25	04	1 (1,4)	-	1 (0,8)	O176	10	-	1 (2,2)	1 (0,8)
O68	21	-	1 (2,2)	1 (0,8)					
O80	25	-	1 (2,2)	1 (0,8)					
O82	19	1 (1,4)	-	1 (0,8)					
O83	01	-	1 (2,2)	1 (0,8)					
O85	31	1 (1,4)	-	1 (0,8)					
O91	Neg	-	1 (2,2)	1 (0,8)					
O103	43	-	1 (2,2)	1 (0,8)					
O109	45	-	1 (2,2)	1 (0,8)					
O117	26	-	1 (2,2)	1 (0,8)					

Tabela 8. Sorotipagem O e H para as linhagens APEC.

O	H	Estado	Total n (%)	O	H	Estado	Total n (%)	O	H	Estado	Total n (%)
Neg			25 (27,5)		9	SP (2), RS (1)	3 (3,3)	19	21	PR	1 (1,1)
	4	PE (2), RS (3)	5 (5,5)		21	SP	3 (3,3)	25	4	RS	1 (1,1)
	21	PE (1), RS (9)	10 (11)		10	RS	2 (2,2)	36			2 (2,2)
	7	PR	2 (2,2)		20	SP	2 (2,2)		4	RS	1 (1,1)
	28	PR	2 (2,2)		11	PR	1 (1,1)		5	PR	1 (1,1)
	9	PE	1 (1,1)		48	PR	1 (1,1)	68	21	RS	1 (1,1)
	10	RS	1 (1,1)	150	Neg	PR	6 (6,6)	73	Neg	SP	1 (1,1)
	12	RS	1 (1,1)	2			5 (5,5)	83	1	SP	1 (1,1)
	19	PR	1 (1,1)		5	PR	2 (2,2)	85	31	RS	1 (1,1)
	M	RS	1 (1,1)		9	PR	1 (1,1)	100	21	RS	2 (2,2)
	Neg	RS	1 (1,1)		Neg	RS	2 (2,2)	109	45	SP	1 (1,1)
Rug			14 (14,3)	5	10	PR (2), RS (2)	4 (4,4)	119	10	RS	1 (1,1)
	Neg	SP	7 (5,5)	7	Neg	RS (4)	4 (4,4)	103	43	PE	1 (1,1)
	4	SP, PR	2 (2,2)	9			2 (2,2)	153	5	SP	1 (1,1)
	25	SP	2 (2,2)		34	SP	1 (1,1)	156	8	PR	1 (1,1)
	5	PR	1 (1,1)		45	SP	1 (1,1)	176	49	RS	1 (1,1)
	9	RS	1 (1,1)	11	25	PE	1 (1,1)				
	53	PR	1 (1,1)	15	1	RS	1 (1,1)				
8			12 (13,2)	18	16	RS	1 (1,1)				

Tabela 9. Sorotipagem O e H para as linhagens AFEC.

O	H	Estado	Total n (%)	O	H	Estado	Total n (%)
/Neg			3 (10,3%)	15	51	SP	1 (3,4%)
	10	SP	1 (3,4%)	73	12	SP	1 (3,4%)
	38	PE	1 (3,4%)	80	25	PE	1 (3,4%)
	Neg	SP	1 (3,4%)	82	19	SP	1 (3,4%)
5	11	SP e PE	2 (6,9%)	91	Neg	SP	1 (3,4%)
8			2 (6,9%)	100	19	SP	1 (3,4%)
	49	SP	1 (3,4%)	117	21	PE	1 (3,4%)
	51	SP	1 (3,4%)	118	29	PE	1 (3,4%)
19			2 (6,9%)	120	9	PE	1 (3,4%)
	25	SP	1 (3,4%)	126	27	PE	1 (3,4%)
	Neg	PE	1 (3,4%)	136	26	PE	1 (3,4%)
153			2 (6,9%)	137	Neg	SP	1 (3,4%)
	12	PE	1 (3,4%)	158	9	PE	1 (3,4%)
	34	SP	1 (3,4%)	178	11	SP	1 (3,4%)
113			2 (6,9%)				
	4	PE	1 (3,4%)				
	11	PE	1 (3,4%)				
7	Neg	SP	1 (3,4%)				
9	51	SP	1 (3,4%)				
12	10	SP	1 (3,4%)				

4.5 Caracterização geral das linhagens de *Escherichia coli* de origem aviária

A caracterização geral das 91 linhagens APEC e das 29 linhagens AFEC está apresentada nas Tabelas 10 e 11, respectivamente. É importante ressaltar que nessas tabelas, as linhagens foram previamente denominadas APEC ou AFEC, se isoladas respectivamente de lesões de aves com colibacilose ou por suabe cloacal, de aves clinicamente saudáveis ainda em seu local de isolamento, por Médicos Veterinários ou pesquisadores, baseados apenas no diagnóstico clínico das aves, não representando assim sua patogenicidade. Desta forma, as linhagens estão apresentadas como “APEC ou AFEC” e, após a classificação de patogenicidade, foram denominados de linhagens de alta, média ou baixa patogenicidade, para enfatizar essas diferenças que são significativas para a compreensão do trabalho.

Nas Tabelas, as linhagens estão, inicialmente, identificadas pelo Estado onde foram isoladas, com os GAV (plasmidiais entre parênteses), classificação filogenética segundo Clermont *et al.* (2000), patogenicidade e a sorotipagem dos antígenos O e H. Nota-se que, para cada linhagem, houve um perfil genético distinto devido ao grande número de fatores de virulência pesquisados. Apenas uma linhagem, PR89, apresentou um único GAV (*csg*). Esta linhagem pertence ao GF B1, sorogrupo O não tipável e H7. A mesma quando encaminhada ao LBMB, foi categorizada como APEC, porém no teste de patogenicidade *in vivo* foi classificada como possuindo baixa patogenicidade. A linhagem PR9, sorotipo O2:H9, apesar de apresentar média patogenicidade, foi o que apresentou a maior positividade para GAV (19): *crl*, *fimH*, *hra*, *lpfA*_{O1157-0154}, *papC*, (*tsh*, *fepC*, *fyuA*, *iucD*), *sitDc*, (*cvi*, *iss*), *kpsMT2*, *neuc*, (*ompT*, *traT*, *hlyF*), *clpV*, *vgrG*.

Tabela 10. Caracterização molecular, filogenética, patogênica e sorológica das linhagens ditas APEC encaminhadas ao LBMB. Os fatores de virulência (FV) plasmidiais estão entre parênteses e na cor vermelha para melhor observação.

ID	Genótipo	GF	¹ Pato	² O:H	ID	Genótipo	GF	¹ Pato	² O:H
PE14	<i>crl, fimH, (iroN, sitDe, ompT, hlyF)</i>	B1	Baixa	103:43	PR19	<i>crl, fimH, (fepC), ast, vat, pic</i>	D	Baixa	Rug:53
PE17	<i>crl, fimH, (fyuA, irp-2, iucD, cvi, iss, ompT, traT, hlyF), vgrG</i>	A	Alta	Neg:9	PR28	<i>crl, csg, fimH, (tsh, iucD, sitDe, ompT, iss, traT, hlyF)</i>	B1	Alta	Neg:28
PE21	<i>fimH, iha, (iroN, iucD, iutA, iss, ompT, traT, hlyF), vgrG</i>	A	Alta	Neg:21	PR32	<i>crl, csg, lpf₀₁₅₄, (irp-2, sitDe, ompT, hlyF)</i>	B1	Baixa	O5:10
PE23	<i>crl, fimH, (fepC, fyuA, iroN, irp-2, iucD, iutA, sitDe, iss, ompT, traT, hlyF), vat, pic</i>	B1	Alta	Neg:4	PR57	<i>csg, fimH, (iss, hlyF), clpV, vgrG</i>	B1	Baixa	O8:11
PE25	<i>crl, fimH, (tsh, fepC, iucD, iutA, iss, ompT, traT, hlyF), malx</i>	B1	Alta	11:25	PR27	<i>crl, csg, fimH, (tsh, iutA, sitDe, iss, traT), clpV, icmF, vgrG</i>	B1	Alta	36:5
PE27	<i>crl, fimH, (tsh, fepC, fyuA, iucD, iutA, iss, ompT, traT, hlyF), ast</i>	B1	Alta	Neg:4	PR71	<i>crl, csg, (fepC, sitDe, iss, ompT, traT, hlyF)</i>	B1	Baixa	O8:48
PR1	<i>crl, csg, fimH, hra, sitDe, clpV, icmF, vgrG, ast</i>	B1	Alta	02:5	PR83	<i>fimH, papC, (tsh, fyuA, fepC, iucD, iutA, sitDe), sitDe, (iss, ompT, traT, hlyF), vat</i>	B2	Média	150:neg
PR9	<i>crl, fimH, hra, lpf₀₁₅₄, papC, (tsh, fepC, fyuA, iucD), sitDe, (cvi, iss), kpsMT2, neuc, (ompT, traT, hlyF), clpV, vgrG</i>	B1	Média	02:9	PR89	<i>csg</i>	B1	Baixa	Neg:7
PR10	<i>csg, (iucD, sitDe, iss, ompT, traT, hlyF), vgrG</i>	B1	Baixa	Pos:5	PR100	<i>crl, fimH, lpf₀₁₅₄, papC, (tsh, fepC, fyuA, iroN, sitDe), sitDe, (cvi, iss, traT, hlyF)</i>	B2	Alta	150:neg
PR13	<i>crl, fimH, hra, lpf₀₁₅₄, (tsh, fyuA, irp-2, sitDe, iss), neuc, (ompT, traT, hlyF), vat, ibea, clpV, malx,</i>	B2	Alta	02:5	PR107	<i>crl, fimH, lpf₀₁₅₄, papC, (tsh, fepC, fyuA, iroN, sitDe, cvi, iss, ompT, traT, hlyF)</i>	B2	Alta	150:neg
PR14	<i>crl, csg, fimH, papC, lpf₀₁₄₁, lpf₀₁₅₄, (tsh, fepC, iucD, sitDe, iss), kpsMT2, (ompT, traT, hlyF), clpV, hcp, icmF, vgrG,</i>	B1	Média	Neg:19	PR126	<i>fimH, (tsh, iucD, sitDe, iss, traT)</i>	B1	Baixa	Neg:7
PR17	<i>crl, fimH, lpf₀₁₅₄, (tsh, irp-2, sitDe, iss, ompT, traT, hlyF), icmF</i>	B1	Baixa	Neg:28	PR134	<i>fimH, lpf₀₁₅₄, (tsh, irp-2, sitDe, iss, hlyF), icmF</i>	B1	Alta	156:8

Teste de patogenicidade *in vivo*, onde alta representa linhagem cujo grupo de pintinhos desafiados apresentou 50% de mortalidade ou lesões severas; média refere-se a linhagens não-letais, porém com até 50% de lesões apresentadas na necropsia e baixa patogenicidade diz respeito as linhagens que não apresentaram nenhuma mortalidade e lesões ocasionais devido à inoculação.

Sorologia realizada pela *E. coli* Reference Ceter, Pennsylvania State University, Neg= Não tipável, Rug= Linhagem rugosa.

PR138	<i>fimH, lpf₀₁₅₄, papC, (tsh, fepC, fyuA, iroN, irp-2, iucD, sitDe), sitDe, (cvi, iss, traT, hlyF), vat</i>	B2	Alta	150:neg	RS57	<i>crl, csg, fimH, papC, (tsh, iroN, iutA, iucD, ompT, hlyF), vgrG</i>	B1	Baixa	Neg:21
PR147	<i>fimH, lpf₀₁₅₄, papC, (tsh, fyuA, iroN, irp-2, iucD, sitDe, cvi, iss, traT) vat</i>	B1	Alta	150: neg	RS60	<i>csg, (fepC, iroN, irp-2, iucD, iutA, sitDe, cvi, traT, hlyF), clpV, vgrG</i>	D	Média	100:21
PR150	<i>crl, fimH, hra, papC, (tsh, fyuA, fepC, irp-2, iroN, sitDe, cvi, iss, traT, hlyF)</i>	B1	Media	150: neg	RS63	<i>crl, csg, fimH, papC, (fyuA, fepC, iroN, iucD, iutA, hlyF), vgrG</i>	D	Alta	Neg:21
PR181	<i>csg, fimH, (iutA, sitDe, iss, traT, hlyF), ast, pic</i>	B1	Baixa	Rug:4	RS65	<i>crl, csg, fimH, papC, (fyuA, fepC, iroN, iucD, iutA, hlyF), vgrG</i>	D	Alta	Neg:21
PR199	<i>csg, lpf₀₁₅₄, (iutA), sitDe, (hlyF), vgrG</i>	B1	Baixa	O5:10	RS68	<i>crl, fimH, (fyuA, fepC, iucD, iroN, iutA, sitDe, traT, hlyF), vgrG</i>	D	Alta	100:21
RS26	<i>crl, csg, fimH, (fepC, irp-2), kpsMT2, neuc, ibea, malx</i>	B2	Alta	25:4	RS69	<i>crl, csg, fimH, (fyuA, fepC, iroN, iutA, cvi, hlyF), vgrG</i>	D	Alta	Neg:21
RS45	<i>crl, csg, fimH, sfu, (tsh, fepC, irp-2, iucD, iutA), sitDe, (cvi, iss), kpsMT2, (ompT), ast, (hlyF), ibea, malx,</i>	B2	Alta	O2:M	RS70	<i>crl, fimH, (iroN, iucD, iutA, sitDe, cvi), kpsMT2, (hlyF), vgrG,</i>	A	Alta	O7: neg
RS45b	<i>crl, csg, fimH, lpf₀₁₅₄, (fepC, irp-2, iucD, iutA, cvi, iss), kpsMT2, neuc, (ompT, traT, hlyF), vgrG, malx, sitDe, ibea,</i>	B2	Alta	Neg: neg	RS71	<i>crl, csg, fimH, (fyuA, fepC, irp-2, iroN, iucD, iutA), kpsMT2, (ompT, hlyF), ibea, vgrG</i>	D	Alta	7: neg
RS46	<i>crl, csg, papC, (tsh, iroN, iucD, iutA, iss, ompT, traT, hlyF), vgrG</i>	B1	Média	Neg:21	RS72	<i>crl, csg, fimH, (fyuA, fepC, iucD, iutA, irp-2, ompT, iroN, hlyF), vgrG, malx</i>	D	Alta	7: neg
RS51	<i>crl, csg, fimH, papC, (tsh, fepC, irp-2, iroN, iucD, iutA, iss, ompT, traT), ast, (hlyF), vgrG</i>	D	Alta	Neg:21	RS74	<i>crl, fimH, (fyuA, fepC, irp-2, iroN, iucD, iutA, ompT), kpsMT2, (hlyF) vgrG,</i>	D	Alta	Neg:10
RS53	<i>crl, csg, fimH, papC, (tsh, fepC, irp-2, iroN, iutA, sitDe, cvi, ompT, traT, hlyF), vgrG</i>	D	Alta	Neg:21	RS75	<i>crl, fimH, (fyuA, fepC, irp-2, iroN, iucD, iutA, ompT), kpsMT2, (hlyF), vgrG</i>	D	Alta	Neg: neg
RS54	<i>crl, csg, fimH, papC, (tsh, fepC, irp-2, iucD, cvi, ompT, hlyF), vgrG</i>	D	Alta	Neg:21	RS76	<i>crl, csg, fimH, (iroN, iucD, iutA, ompT, hlyF), kpsMT2, vgrG</i>	A	Média	O7: neg
RS55	<i>crl, csg, fimH, papC, (tsh, irp-2, iroN, iucD, iutA, sitDe, ompT, traT, hlyF)</i>	D	Alta	Neg:21	RS80	<i>crl, fimH, (iroN, irp-2, iucD, iutA, cvi, ompT), ast, (hlyF), vgrG, pic,</i>	A	Média	100:8

Teste de patogenicidade *in vivo*, onde alta representa linhagem cujo grupo de pintinhos desafiados apresentou 50% de mortalidade ou lesões severas; média refere-se a linhagens não-letais, porém com até 50% de lesões apresentadas na necropsia e baixa patogenicidade diz respeito as linhagens que não apresentaram nenhuma mortalidade e lesões ocasionais devido à inoculação.

Sorologia realizada pela *E. coli* Reference Ceter, Pennsylvania State University, Neg= Não tipável, Rug= Linhagem rugosa.

RS81	<i>crl, csg, kpsMT2, vgrG</i>	A	Baixo	O5:110	RS24	<i>crl, csg, fimH, vgrG</i>	D	Baixa	176:10
RS84	<i>crl, fimH, clpV, vgrG</i>	B1	Baixo	68:21	RS27	<i>crl, csg, lpf₀₁₄₁, papC, (fyuA, irp-2, iucD, iutA, sitDe), sitDc, (iss), kpsMT2, neuc, (ompT, traT, hlyF), icmF, vgrG</i>	D	Alta	Neg:4
RS86	<i>crl, csg, kpsMT2</i>	A	Baixo	O5:110	RS29	<i>fimH, (tsh, iucD, fyuA, irp-2, iroN, iutA, sitDe, cvi, iss, ompT, traT, hlyF), vat, ibea, malx</i>	B2	Alta	85:31
RS87	<i>crl, fimH, (hlyF), kpsMT2, clpV</i>	A	Baixo	119:110	RS31	<i>crl, csg, fimH, (iucD, iutA, sitDe), icmF</i>	B1	Baixa	18:16
RS88	<i>crl, csg, fimH, papC, (fepC, irp-2, iroN, iucD, iutA, cvi, iss, ompT, hlyF), ibea, clpV, hcp, vgrG, malx</i>	B2	Médio	Neg:4	RS33	<i>csg, fimH, (tsh, fepC, fyuA, irp-2, iucD, iutA, cvi, iss), neuc, (traT, hlyF), vat</i>	D	Alta	36:4
RS89	<i>crl, fimH, hra, (fepC, iucD, iutA, iss, ompT, hlyF), clpV, hcp, vgrG</i>	D	Médio	Neg:4	RS34	<i>sfa, (tsh, fepC, fyuA, irp-2, iroN, iucD, iutA, sitDe), sitDc, (cvi), neuc, (ompT, iss, hlyF), vat, ibea, malx</i>	B2	Alta	O2:neg
RS5	<i>crl, csg, fimH, hra, (tsh, iucD, iutA, iss, ompT, hlyF), vgrG</i>	B1	Alta	O8:10					
RS6	<i>crl, csg, fimH, (iucD, iutA, sitDe, ompT, hlyF), vgrG</i>	D	Média	neg:9					
RS8	<i>crl, csg, fimH, (iroN, iucD, iutA, ompT, iss, hlyF)</i>	D	Alta	O8:9					
RS3	<i>crl, csg, fimH, (tsh, fepC, iucD, iutA, cvi, ompT), kpsMT3, ast, (hlyF), icmF, vgrG,</i>	D	Alta	15:1					
RS4	<i>crl, csg, fimH, (tsh, iroN, iucD, iutA, sitDe, cvi, iss, ompT, hlyF), clpV, icmF, vgrG</i>	B1	Alta	Neg:12					
RS23	<i>crl, csg, fimH, hra, icmF, vgrG, pic</i>	D	Baixa	O8:49					

Teste de patogenicidade *in vivo*, onde alta representalinagem cujo grupo de pintinhos desafiados apresentou 50% de mortalidade ou lesões severas; média refere-se a linhagens não-letais, porém com até 50% de lesões apresentadas na necropsia e baixa patogenicidade diz respeito as linhagens que não apresentaram nenhuma mortalidade e lesões ocasionais devido à inoculação.

Sorologia realizada pela *E. coli* Reference Ceter, Pennsylvania State University, Neg= Não tipável, Rug= Linhagem rugosa.

Tabela 11. Caracterização molecular, filogenética, patogênica e sorológica das linhagens ditas AFEC encaminhadas ao LBMB. Os genes plasmidiais associados à virulência estão entre parênteses e na cor vermelha para melhor observação.

ID	Genótipo	GF	¹ Pato	² O:H	ID	Genótipo	GF	¹ Pato	² O:H
PE3-F	<i>crl, fimH, (traT), pic</i>	B1	Baixa	118:29	SP69	<i>lpf₀₁₅₄, (fepC), ast</i>	D	Baixa	O9:45
PE4-F	<i>crl, fimH, vgrG</i>	A	Baixa	Neg:38	SP71	<i>csg, lpf₀₁₄₁, (iroN, iucD, iutA, sitDe, iss), kpsMT3, (ompT, traT, hlyF), clpV icmF, vgrG, malx</i>	B2	Alta	153:5
PE5-F	<i>fimH, vgrG</i>	A	Baixa	113:4	SP125	<i>csg, fimH, (tsh, iroN, iucD, iutA, sitDe, cvi, iss, ompT, hlyF), hcp, icmF, vgrG, ast, malx</i>	D	Alta	Rug:neg
PE7-F	<i>fimH, hra, (ompT)</i>	A	Baixa	158:9	SP126	<i>csg, fimH, (iroN, sitDe, cvi, iss, ompT, hlyF)</i>	B1	Alta	O9:34
PE15-F	<i>crl, fimH, (iroN, iss, ompT, traT, hlyF), clpV, vgrG</i>	B1	Média	5:11	SP155	<i>crl, csg, fimH, (tsh, fyuA, iroN, iucD, iutA, cvi, ompT, traT, hlyF), icmF, vgrG, malx</i>	D	Alta	Rug:neg
PE18-F	<i>fimH, (fyuA, traT), vgrG</i>	A	Baixa	80:25	SP156	<i>fimH, lpf₀₁₄₁, lpf₀₁₅₄, (tsh, iroN, iucD, iutA, sitDe, cvi, iss), kpsMT3, (traT, hlyF), malx</i>	D	Alta	Rug:neg
PE19-F	<i>crl, fimH, (traT), vgrG,</i>	A	Baixa	153:12	SP164	<i>fimH, lpf₀₁₅₄, (iroN, iutA, ompT)</i>	A	Média	Rug:neg
PE22-F	<i>fimH, (fepC, iroN, iucD, iutA, sitDe, iss, ompT, traT, hlyF), ibeA</i>	B1	Alta	19: neg	SP165	<i>fimH, (tsh, iroN, iucD, iutA, sitDe, cvi, iss), kpsMT3, (hlyF), malx</i>	D	Alta	Rug:neg
PE24-F	<i>fimH, (fepC, fyuA, irp-2, iss, ompT, traT, hlyF), clpV, vgrG</i>	B1	Alta	126:27	SP113	<i>fimH, lpf₀₁₄₁, (iroN, sitDe, cvi, iss, hlyF)</i>	A	Baixa	Rug:25
PE26-F	<i>crl, fimH, (fepC, fyuA, iroN, irp-2, iucD, iutA), sitDe, (sitDe, iss), neuC, (ompT, traT, hlyF), vat, malx</i>	B1	Alta	120:4	SP114	<i>fimH, (fepC, iroN, sitDe, cvi, iss, traT, hlyF)</i>	B1	Alta	Neg:2
PE28-F	<i>crl, (fyuA, irp-2), ast, vgrG</i>	A	Baixa	117:26	SP117	<i>csg, fimH, (iucD, iutA, sitDe, traT)</i>	B1	Baixa	O8:21
PE29-F	<i>crl, fimH, (fyuA, irp-2, traT), ast, vgrG</i>	A	Baixa	136:26	SP118	<i>csg, fimH, (fepC, iucD, iutA, sitDe, cvi, traT)</i>	B1	Alta	O8:21
SP57	<i>crl, csg, fimH, papC, (tsh, fyuA, irp-2, hlyF), ast, vat,</i>	D	Baixa	Neg:4	SP146	<i>csg, kpsMT3</i>	B2	Baixa	Rug:neg
SP61	<i>crl, fimH, lpf₀₁₄₁, icmF</i>	A	Baixa	109:45	SP147	<i>crl, fimH, kpsMT3,</i>	B2	Baixa	73:neg
SP65	<i>(traT), icmF, vgrG</i>	B1	Baixa	O8:21	SP183	<i>fimH, (iroN, traT)</i>	B1	Baixa	O8:20

Teste de patogenicidade *in vivo*, onde alta representalinagem cujo grupo de pintinhos desafiados apresentou 50% de mortalidade ou lesões severas; média refere-se a linhagens não-letais, porém com até 50% de lesões apresentadas na necropsia e baixa patogenicidade diz respeito as linhagens que não apresentaram nenhuma mortalidade e lesões ocasionais devido à inoculação.

Sorologia realizada pela *E. coli* Reference Ceter, Pennsylvania State University, Neg= Não tipável, Rug= Linhagem rugosa.

SP184	<i>csg, (tsh, iutA, sitDe, ompT, iroN, traT)</i>	A	Baixa	O8:20	SP46a	<i>crl, csg, fimH, (iroN, sitDe), neuc, (iss, ompT, traT, hlyF), pic</i>	A	Média	O9:51
SP191	<i>crl, csg, fimH, (iss)</i>	A	Média	O8:9	SP46b	<i>crl, fimH, lpf₀₁₄₁, (tsh, fepC, iroN, iucD, iutA, sitDe), neuc, (ompT, iss, traT, hlyF), clpV, hcp, vgrG, ast</i>	D	Média	19:25
SP200	<i>csg, fimH, hra, (tsh, fyuA, irp-2, iucD, iutA, sitDe, ompT, traT, hlyF), clpV, icmF, vgrG</i>	A	Baixa	O8:9	SP46c	<i>crl, neuc, (traT), icmF, vgrG⁺,</i>	B1	Média	82:19
SP216	<i>crl, csg, fimH, (fyuA, iroN, sitDe, traT, hlyF)</i>	B1	Baixa	19:21	SP46d	<i>csg, fimH, icmF, vgrG</i>	B1	Alta	15:11
SP37	<i>fimH, (fyuA, iroN, iucD, iutA), sitDe, (sitDe, cvi, iss), neuc, (ompT, traT, hlyF), vat, ibea, malx</i>	B2	Baixa	83:1	SP47a	<i>csg, kpsMT2</i>	A	Baixa	O7:neg
SP43a	<i>fimH, lpf₀₁₄₁, (fepC), hcp, icmF, vgrG</i>	B2	Média	137:neg	SP47b	<i>fimH, csg, hra, papC, (tsh), vat, vgrG</i>	B1	Baixa	178:11
SP43c	<i>crl, fimH, (tsh, iroN, iucD, iutA, sitDe, cvi, iss, ompT, traT, hlyF)</i>	A	Alta	O8:49	SP47c	<i>(iroN, iucD, iutA, cvi, iss, ompT, hlyF), clpV, icmF, vgrG, ast</i>	A	Média	100:19
SP43f	<i>crl, fimH, (iroN), neuc, vgrG</i>	A	Baixa	Neg:10	SP47d	<i>crl, csg, hra, (sitDe), neuc, (ompT, hlyF), icmF, vgrG</i>	B1	Baixa	Neg:neg
SP43g	<i>csg, (tsh, iroN, iucD, iutA, cvi, iss, hlyF), ast, vat, vgrG, pic</i>	B1	Alta	12:10					
SP44a	<i>neuc, (traT), icmF, vgrG</i>	A	Baixa	O8:51					
SP44b	<i>csg, fimH, hra, neuc, (traT), ast, vat, vgrG,</i>	B1	Baixa	73:12					
SP44c	<i>csg, fimH, hra, (iroN, iucD, iutA, sitDe, cvi), neuc, (iss), kpsMT2, (ompT, traT, hlyF, fepC), ibea, pic</i>	A	Alta	153:34					
SP44d	<i>crl, csg, fimH, (traT)</i>	A	Media	O5:11					
SP45	<i>fimH, (iroN, iutA, sitDe, cvi, ompT, iss, hlyF), ast, icmF, vgrG</i>	A	Baixa	91:neg					

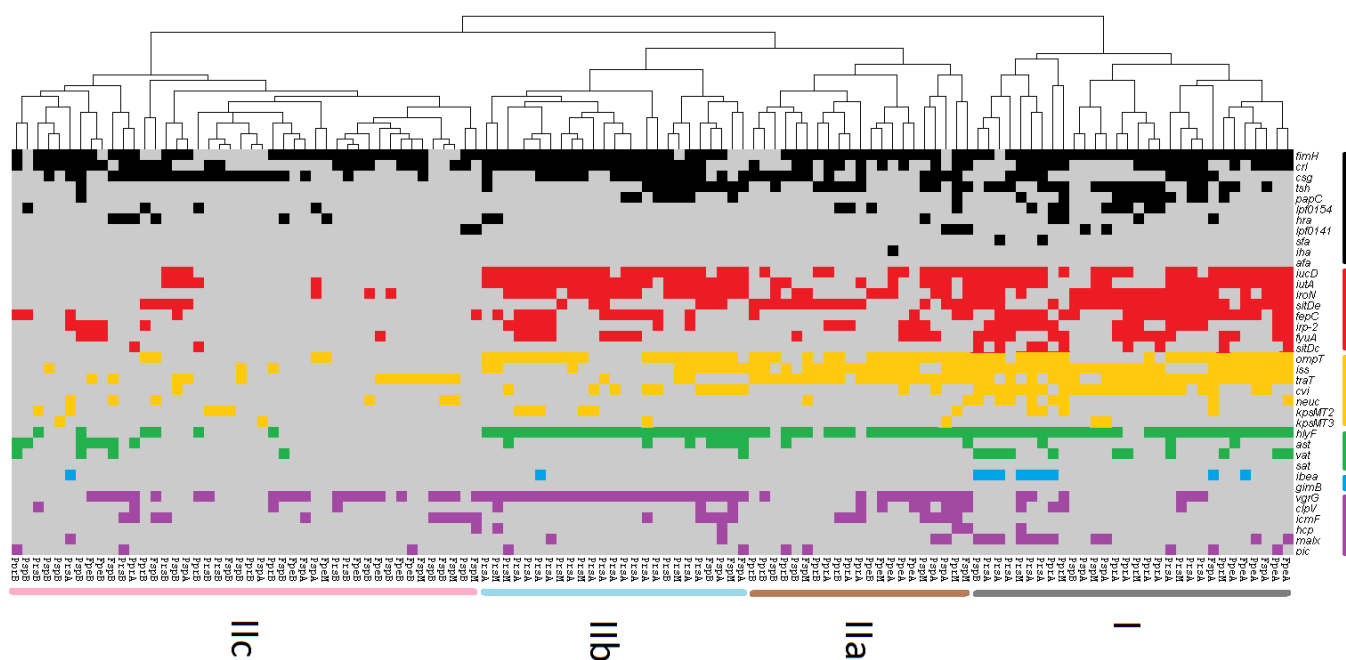
Teste de patogenicidade *in vivo*, onde alta representalinagem cujo grupo de pintinhos desafiados apresentou 50% de mortalidade ou lesões severas; média refere-se a linhagens não-letais, porém com até 50% de lesões apresentadas na necropsia e baixa patogenicidade diz respeito as linhagens que não apresentaram nenhuma mortalidade e lesões ocasionais devido à inoculação.

Sorologia realizada pela *E. coli* Reference Ceter, Pennsylvania State University, Neg= Não tipável, Rug= Linhagem rugosa.

4.6 Análise de agrupamento

A análise de agrupamento (Figura 8) mostra que as linhagens ficaram aglutinadas em quatro grupos (I, IIa, IIb e IIc). As linhagens do agrupamento I tem uma origem de isolamento bem diversificada e não caracteriza qualquer Estado em particular. Constitui-se quase que, exclusivamente, de linhagens de alta patogenicidade, com alta presença de genes plasmidiais. No total, 30 linhagens pertencem a este agrupamento, onde 22 (73,3%) são de alta, seis (20%) são de média e apenas duas (6,6%) são de baixa patogenicidade.

O grupo IIa também demonstra linhagens de diferentes origens de isolamento e de alta e média patogenicidade, porém com uma quantidade menor de genes relacionados à captação de ferro e com combinações maiores dos genes do SST6 em comparação com os grupos I e IIb. Neste agrupamento, composto por 21 linhagens, oito (38%) são de alta, cinco (23,8%) são de média e oito (38%) são de baixa patogenicidade. Linhagens do agrupamento IIb são basicamente originadas do RS, de casos de celulite aviária, e também com um maior perfil de alta e média patogenicidade, porém com uma presença menor de genes relacionados à resistência ao soro. No total, 25 linhagens foram separadas neste grupo, onde 17 (68%) são linhagens de alta, seis (24%) são de média e duas (8%) são de baixa patogenicidade. Já o agrupamento IIc é composto, quase que exclusivamente, por linhagens de baixa patogenicidade, apresentando linhagens com menor número de GAV, especialmente os plasmidiais. No total pertencem a este grupo 44 linhagens, onde apenas seis (13,6%) são de alta, quatro (9%) são de média e 34 (77,2%) são de baixa patogenicidade.



A Figura 9 demonstra a árvore de agrupamento das linhagens conforme o perfil de genes que apresentaram diferenças significativa ($p < 0,05$) e extremamente significativa ($p < 0,001$) no teste exato de Fisher. Foram observados dois grupos (III e IV). O grupo III apresenta linhagens predominantemente de alta e média patogenicidade. No total foram agrupadas 58 linhagens, onde 40 (68,9%) são de alta, 15 (25,8%) são de média e apenas três (5,1%) são de baixa patogenicidade. Ao passo que o grupo IV, apresenta predominância das linhagens de baixa patogenicidade, onde no total foram agrupadas 62 linhagens, sendo 13 (20%) de alta, seis (9,6%) de média e 43 (69,3%) de baixa patogenicidade.

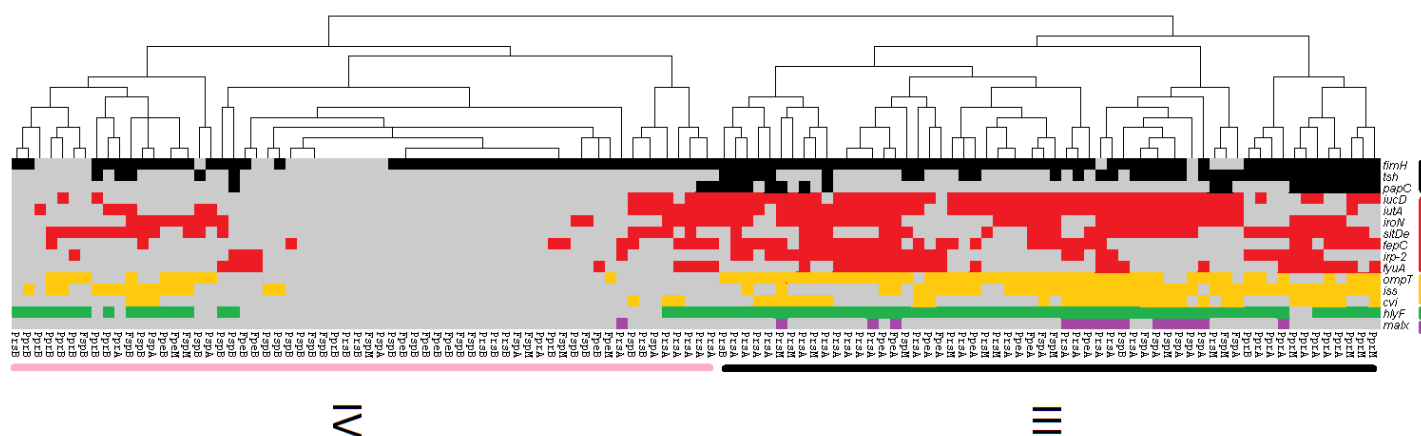


Figura 9. Árvore de agrupamento das linhagens de *E. coli* de origem aviária conforme o perfil de genes que apresentaram diferença estatística ($p < 0,05$ e $p < 0,001$) entre as linhagens de alta e média patogenicidade frente as de baixa patogenicidade. A identificação dos genes segue uma classificação em cores onde em preto estão os genes relacionados à fímbrias e adesinas (*fimH*, *tsh* e *papC*); vermelho estão os genes relacionados a captação de ferro (*iucD*, *iutA*, *iroN*, *sitDe*, *fepC*, *irp-2* e *fyuA*); amarelo são os genes associados a resistência ao soro (*ompT*, *iss* e *cvf*); verde está o gene relacionado a hemolisina (*hlyF*); e em lilás o gene relacionado a ilha de patogenicidade de EHEC (*malX*). Abaixo está a classificação das linhagens conforme a identificação como APEC (P), AFEC (F), Estado de origem (PE, SP, PR e RS), Patogenicidade (A=alta, M=média, B=baixa). III e IV e as respectivas linhas preta e roza representam os agrupamentos encontrados.

A Figura 10 agrupa as linhagens apenas com os genes de virulência que demonstraram diferença estatística extremamente significativa ($p < 0,001$). Através desta análise, é possível ver três grandes agrupamentos, nomeados V, VI e VII. O grupo V compreende a maior parte das linhagens de alta e média patogenicidade. Quarenta e nove linhagens foram agrupadas neste conjunto. Deste total, 31 (63,2%) são linhagens de alta, 13 (26,5%) de média e apenas 5 (10,2%) são de baixa patogenicidade. No agrupamento VI, houve um total de 24 linhagens onde 17 (70,8%) são de alta, quatro (16,6%) são de média e apenas três (12,5%) são de baixa patogenicidade. Nos agrupamentos V e VI, existe uma variância de no mínimo três a no máximo sete genes. O agrupamento VII compreende 47 linhagens, dentre as quais apenas cinco (10,6%) são de alta, quatro (8,5%) são de média patogenicidade. As demais linhagens são de baixa patogenicidade, 38 (80,5%) no total, e apenas três linhagens contêm até dois GAV. A origem de isolamento das linhagens APEC, em todos os agrupamentos, são diversas, não caracterizando um Estado em específico. Já as linhagens AFEC enquadram-se majoritariamente no grupo VII, com exceção das linhagens AFEC de alta ou média patogenicidade as quais se encaixaram nos agrupamentos V e VI.

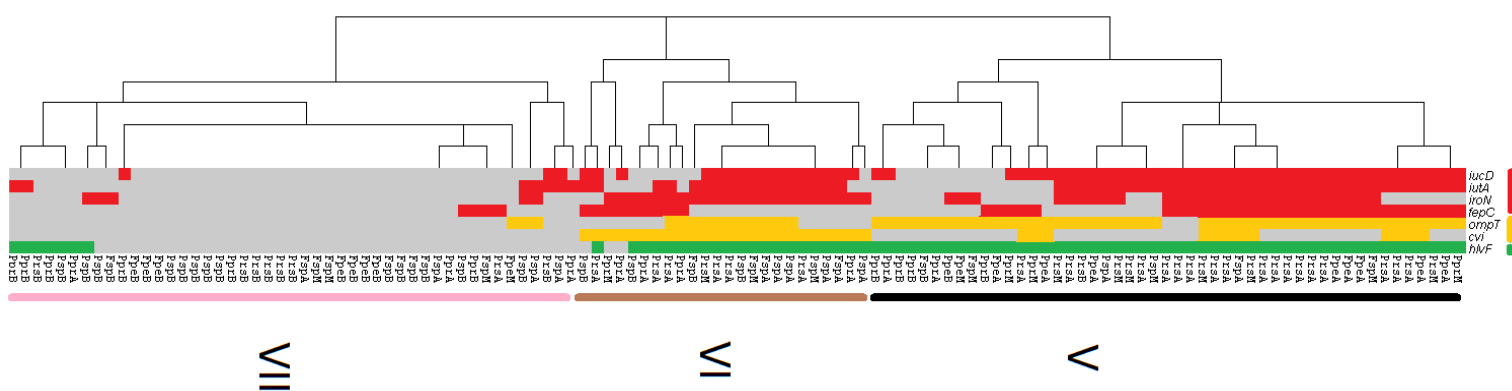


Figura 10. Árvore de agrupamento das linhagens de *E. coli* de origem aviária conforme o perfil de genes que apresentaram diferença estatística extremamente significativa ($p < 0,001$) entre as linhagens de alta e média patogenicidade frente as de baixa patogenicidade. A identificação dos genes segue uma classificação em cores onde em vermelho estão os genes relacionados a captação de ferro (*iucD*, *iutA*, *iroN* e *fepC*); amarelo são os genes associados a resistência ao soro (*ompT* e *cvi*) e em verde está o gene relacionado a hemolisina (*hlyF*). Abaixo está a classificação das linhagens conforme a identificação como APEC (P), AFEC (F), Estado de origem (PE, SP, PR e RS), Patogenicidade (A=alta, M=média, B=baixa). V, VI e VII e as respectivas linhas preta, marrom e rosa representam os agrupamentos encontrados.

5 DISCUSSÃO

Para se realizar o diagnóstico diferencial da colibacilose aviária frente outras patologias aviárias de sintomatologia semelhante, pode-se utilizar de diversas metodologias, não apenas fenotípicas, como isolamento em meios de cultura, identificação bioquímica e sorotipificação, mas também genotípicas, através da detecção molecular de fatores relacionados à virulência (Ferreira e Knöbl, 2000). Embora a capacidade de causar doença em modelos *in vivo* seja necessária e, talvez, fundamental, esta não é uma metodologia correntemente empregada. Embora, muitos fatores associados à virulência (FV) de *Escherichia coli* patogênica aviária (APEC) já tenham sido descritos, ainda não é possível definir, quais são os FVs essenciais na caracterização deste patotipo, diferenciando-o de uma *E. coli* aviária não patogênica (Barnes *et al.*, 2003).

O simples isolamento de *E. coli* de órgãos internos da ave já indica que a linhagem possa ser virulento para a espécie aviária no entanto, alguns estudos têm demonstrado que a determinação dos genes associados à virulência (GAV), presentes nas linhagens, associada à inoculação *in vivo* em pintainhos de 1 dia de idade, é fundamental para se estabelecer uma classificação da virulência destas bactérias, pois sabe-se que muitas linhagens podem ser de origem fecal (AFEC) e não estar, necessariamente, associadas à doença em aves (Johnson *et al.*, 2008c; Schouler *et al.*, 2012). Isto, geralmente, ocorre quando as aves são submetidas ao desafio por agentes imunossupressores como doença de Gumboro, micotoxicose, leucose aviária, doença de Marek dentre outras, pois muitas destas AFEC que invadem o organismo das aves são linhagens oportunistas, não possuindo mecanismo que permitam a sua sobrevivência na corrente sanguínea e em outros órgãos (Ferreira e Knöbl, 2000).

Neste trabalho, verificou-se a frequência de GAV em duas populações de origens distintas de *E. coli* aviária. Uma população denominada APEC, contendo linhagens de aves com lesões de colibacilose (septicemia, celulite aviária e doença do trato respiratório), e outra denominada AFEC, contendo linhagens isoladas por meio de suabes cloacais de aves aparentemente saudáveis ao exame clínico veterinário. Devido ao exposto anteriormente, foram realizados testes de patogenicidade *in vivo*, em pintainhos de 1 dia de idade, para classificação das linhagens em uma das três categorias propostas por (Rosenberger *et al.*, 1985), alta, média e baixa patogenicidade. Desta forma, foi possível relacionar a presença,

nas linhagens, de determinados fatores associados à virulência e à patogenicidade em pintainhos de 1 dia de idade, tornando possível inferir sobre a importância da presença destes fatores na patogênese da colibacilose aviária.

5.1 Patogenicidade *in vivo*

Os resultados em relação à patogenicidade *in vivo* demonstram que do total das linhagens APEC, 46 (50,5%) foram classificadas como de alta patogenicidade, 13 (14,3%) de média patogenicidade e 32 (35,2%) de baixa patogenicidade. Isto reforça, mais uma vez, que nem todas as *E. coli* isoladas de casos de colibacilose podem ser os agentes primários da doença, podendo ser apenas agentes oportunistas devido a fatores imunossupressores, com a presença de micotoxinas na ração, ou infecção prévia por agentes virais, como é comumente relatado nos casos de doença do trato respiratório (Dho-Moulin e Fairbrother, 1999; Ferreira e Knöbl, 2000).

Entre as linhagens AFEC, sete (24,1%) apresentaram alta patogenicidade, oito (27,6%) média patogenicidade e 14 (48,3%) baixa patogenicidade. O reservatório mais importante de *E. coli* é, justamente, o intestino dos animais, incluindo aves. Estima-se que cerca de 10^9 unidades formadoras de colônia (UFC) de *E. coli* podem ser encontradas por grama de fezes. As linhagens podem ser tanto patogênicas como não patogênicas (Harry, 1965a). Cerca de 10 a 15% das linhagens de *E. coli* habitantes da microbiota fecal de aves saudáveis, pertencem a um sorogrupo O que também pode ser isolado de lesões de colibacilose (Harry, 1965b). Desta forma, justifica-se a presença de linhagens patogênicas entre a população de AFEC encontradas neste trabalho.

É importante ressaltar que, através do teste exato de Fisher, a distribuição das linhagens APEC e AFEC de alta patogenicidade demonstrou-se estatisticamente significativa ($p < 0,05$), ou seja, mesmo encontrando-se linhagens patogênicas entre a população de AFEC, é possível utilizá-las em comparação com linhagens APEC para a determinação de GAV. Porém, deve-se ter cautela quanto à presença de linhagens potencialmente patogênicas neste tipo de população (AFEC), as quais possam dificultar a interpretação de resultados de buscas por novos marcadores biológicos. Para tanto, a

realização de testes de patogenicidade com pintainhos de 1 dia de vida ou galinhas de 16 semanas é essencial.

5.2 Detecção dos genes associados à virulência (GAV)

Os resultados obtidos neste trabalho mostram que as linhagens de alta e média patogenicidade apresentaram, em geral, pelo menos um GAV relacionado à adesão, um relacionado ao sistema de aquisição de ferro e um fator de resistência ao soro do hospedeiro. Apenas duas linhagens de alta e duas de média patogenicidade não apresentaram genes relacionados a fatores de captação de ferro. Dentre as de alta patogenicidade, a linhagem SP46d apresentou dois GAV relacionados a adesão e dois GAV relacionados ao SST6 (Tabela 11) e outra linhagem SP146 apresentou apenas o GAV *csg* e *kpsMT3* (Tabela 10). Entre as de média patogenicidade, a linhagem 44d (Tabela 11) apresentou três GAV relacionado à adesão, mais o gene *traT*. A linhagem SP46c apresentou um GAV de adesão, dois de resistência ao soro e dois do SST6 (Tabela 11) e a linhagem PE7 apresentou apenas *fimH* e *hra*, de adesão, e *ompT*, relacionado à resistência ao soro (Tabela 11). Quatro linhagens de alta e uma de média patogenicidade não apresentaram genes associados à resistência à ação bactericida do soro do hospedeiro. Entre as de alta patogenicidade, uma é a linhagem SP46d, já descrita acima, outra linhagem (PR1), apresentou quatro GAV relacionado à adesão, um relacionado à captação de ferro, um a toxinas e três do SST6 (Tabela 10). As linhagens de alta patogenicidade RS63 e RS65, apresentaram quatro GAV relacionado à adesão, cinco relacionado à captação de ferro, um relacionado à toxinas e um relacionado ao SST6 (Tabela 10). A única linhagem de média patogenicidade que não apresentou GAV de resistência ao soro (SP43a), apresentou dois GAV de adesão, um de captação de ferro e um do SST6 (Tabela 11).

As linhagens de baixa patogenicidade, em geral, apresentaram pelo menos um gene relacionado à adesão. Apenas duas linhagens não apresentaram qualquer gene relacionado à adesão, 21 não apresentaram genes associados à captação de ferro e 14 não apresentaram genes relacionados à resistência à toxicidade do soro do hospedeiro. Os dados aqui apresentados concordam, parcialmente, com estudos prévios (Janßen *et al.*, 2001; Ngeleka *et al.*, 2002; De Brito *et al.*, 2003; Delicato *et al.*, 2003; Rodriguez-Siek *et al.*, 2005; Ewers

et al., 2007), que sugerem que linhagens APEC devem apresentar pelo menos um fator de cada grupo para serem consideradas capazes de causar colibacilose aviária pois, quatro linhagens de alta e média patogenicidade não apresentaram genes de captação de ferro e cinco não apresentaram genes para resistência ao soro do hospedeiro, o que sugere que genes adicionais relacionados à patogenicidade, ainda não descritos, possam estar presentes nestas linhagens.

Os GAV que, significativamente, diferenciam linhagens de alta e média patogenicidade das de baixa patogenicidade são *hlyF*, *iucD*, *ompT*, *iutA*, *iroN*, *fepC*, *cvi* todos com $p < 0,001$ e *fimH*, *iss*, *tsh*, *irp-2*, *fyuA*, *papC*, *malx* todos com $p < 0,05$. Ao passo que, sem considerar a classificação das linhagens pelo teste de patogenicidade *in vivo* e apenas as duas populações APEC e AFEC, verificam-se que os genes que, significativamente, distinguem os dois patótipos são *iucD*, *csg*, *hlyF*, *iutA*, *papC*, *tsh*, *sitDe*, *irp-2*, *cvi* e *neuC* todos com $p < 0,05$. Com base nestes resultados, é possível inferir que os genes *iucD*, *hlyF*, *iutA*, *papC*, *tsh*, *irp-2* e *cvi*, possam estar mais relacionados à patogenicidade das linhagens, enquanto que *ompT*, *iroN*, *fepC*, *fimH*, *iss*, *fyuA*, *malx* possam estar relacionados à virulência das mesmas. Além disso, esta diferença entre GAV, mais uma vez, reforça a necessidade de se verificar sempre a patogenicidade das linhagens, para que não haja falsa interpretação dos resultados.

Não foi possível visualizar diferenças significativas entre as linhagens de diferentes Estados através da frequência dos genes associados aos GAV. De maneira geral, todos os Estados apresentaram o mesmo padrão de presença de pelo menos um gene associado a fator de aderência, sideróforos e resistência ao soro. Uma consideração importante deve ser feita em relação às linhagens do Paraná, onde, nestas linhagens, foi observado que o gene *lpf_{O157/O1-154}* apresentou uma frequência superior aos demais estados (47,8%).

Em geral, as linhagens de alta e média patogenicidade apresentaram uma média de 3,1 e 3,2 genes relacionados a fatores de aderência, respectivamente. Enquanto que as linhagens de baixa patogenicidade apresentaram uma média de 2,0 GAV (tabelas 9 e 10). A aderência ao hospedeiro é o primeiro passo para o estabelecimento da colonização bacteriana. *E. coli* possui diversos fatores de adesão específicos, o que lhe permite colonizar sítios em seu hospedeiro que normalmente não habitariam (Kaper *et al.*, 2004). As estruturas que permitem a adesão ao hospedeiro podem ser de natureza fimbrial ou

afimbrial. As adesinas fimbriadas são filamentos proteínáceos expressos na superfície bacteriana que medeiam adesão às células do hospedeiro. Uma bactéria pode apresentar mais de 400 estruturas fimbriadas na sua superfície (Dziva e Stevens, 2008b; Antao *et al.*, 2009b).

A fimbria tipo 1 (F1) é codificada pelo operon fim (*Type1 fimbriae D-mannose adhesin*), que codifica um filamento de 1 a 2 µm de comprimento presente na superfície bacteriana, composto por várias subunidades. Na extremidade mais externa da fimbria é encontrada uma lectina (FimH) que reconhece a manose e promove a adesão e colonização bacteriana às superfícies da mucosa (Orndorff e Falkow, 1984). Neste estudo, o gene *fimH* foi o mais frequente entre os genes pesquisados, presente em 81,7% das linhagens pesquisadas, 90,5% das linhagens de alta e média patogenicidade e 67,4% das linhagens de baixa patogenicidade. Esse resultado está de acordo com o encontrado na literatura, onde F1 é encontrado entre 70-100% das linhagens de *E. coli* aviária (Dho-Moulin e Fairbrother, 1999; Rodriguez-Siek *et al.*, 2005; Ewers *et al.*, 2007; Antao *et al.*, 2009a).

A fimbria F1 na colonização é tida como fundamental para a virulência de linhagens APEC, tendo sido demonstrado que, com a deleção do gene *fimH*, *in vitro*, a virulência da linhagem foi atenuada, reduzindo o poder de adesão e colonização da bactéria (Arné *et al.*, 2000; Mellata *et al.*, 2003). Em aves, foi observado que a fimbria F1 atua na adesão da bactéria aos pulmões, intestinos, baço e fígado. Neste trabalho, a presença de *fimH* foi estatisticamente maior ($p < 0,05$) em linhagens de alta e média patogenicidade do que nas linhagens de baixa patogenicidade, indicando mais uma vez a importante contribuição da F1 na virulência de linhagens APEC.

Ainda em relação aos fatores de aderência, foi observado neste trabalho, que o gene cromossomal *papC*, relacionado à fimbria P ou F11 (*Pyelonephritis-associated pilus* ou *P blood antigen*) e descrito pela primeira vez em *E. coli* uropatogênica (UPEC) como uma adesina associada à pielonefrite (Sauer *et al.*, 2000), foi detectado em 20 (16,7%) de todas as linhagens testadas (Tabela 4), estando presente em 18 (24,3%) das linhagens de alta e média patogenicidade, sendo estatisticamente distinto das linhagens de baixa patogenicidade que apresentaram apenas 2 (4,3%) linhagens *papC*⁺ ($p < 0,001$). Na colibacilose aviária, acredita-se que a fimbria P esteja associada à colonização dos órgãos internos, além da fimbria F1, a fim de causar infecções sistêmicas, não sendo expressa nos

momentos iniciais da infecção (Pourbakhsh *et al.*, 1997; La Ragione e Woodward, 2002). Estes resultados corroboram dados anteriores (Knöbl *et al.*, 2006) de que no Brasil a prevalência da fímbria P, em APEC, seja em torno de 6 a 26% das linhagens.

Os genes associados à expressão da fímbria “curli” (*crl* e *csgA*) apresentaram frequências moderadas entre as linhagens de alta, média e baixa patogenicidade, não sendo observada diferença estatística. No entanto, através do mesmo teste, foi observada diferença estatística ($p < 0,05$) entre APEC e AFEC para a presença de *csg*. Estes dados contrariam observações realizadas por Maurer *et al.* (1998) e por Mcpeake *et al.* (2005) que detectaram os genes *crl* e *csgA* em todas as linhagens analisadas, incluindo linhagens de aves saudáveis considerados comensais. O papel da fímbria “curli” ainda é controverso na literatura. La Ragione *et al.* (1999) mostraram que linhagens mutantes APEC “não-curliadas” não apresentaram diferenças estatísticas de redução de adesão quando comparadas às linhagens selvagens, contudo, estudos realizados por La Ragione *et al.* (2000) demonstraram que estas fímbrias são importantes também na colonização, invasão e persistência em aves livres de patógenos específicos (SPF). Além disso, Gophna *et al.* (2001) demonstraram que as fímbrias “curli” expressas por uma APEC O78 medeiam a colonização da bactéria em células eucarióticas, o que sugere que a fímbria “curli” pode constituir um possível determinante de virulência em linhagens APEC. Outro aspecto que deve ser notado é que o gene *crl*, por ser um gene regulador da expressão da fímbria “curli”, é mais conservado, ou seja, apresenta pouca variabilidade em sua sequência de nucleotídeos (Arnqvist *et al.*, 1992). O contrário é observado para as sequências dos genes *csg*, especialmente para o gene *csgA*, também utilizado neste estudo (Dueholm *et al.*, 2012). Isto poderia justificar a diferente ocorrência dos genes relacionados à produção da fímbria “curli” entre este trabalho e a literatura.

Outro fator importante, e também relacionado à adesão, é a adesina Tsh (*Temperature sensitive hemagglutinin*) descrita por Provence e Curtiss (1994). A adesina Tsh, codificada pelo gene *tsh*, contribui para os estágios iniciais da infecção, incluindo a colonização dos sacos aéreos e pulmões, porém não contribui para a colonização generalizada (Dozois *et al.*, 2000). O gene *tsh* vem sendo associado à patogenicidade de APEC, sendo detectado em alta frequência entre linhagens patogênicas por diferentes grupos de pesquisa (Maurer *et al.*, 1998; Dho-Moulin e Fairbrother, 1999; Janßen *et al.*,

2001; Ewers *et al.*, 2004). Por esta razão, Skyberg *et al.* (2003) propõem sua utilização como marcador molecular para a identificação de APEC. Neste estudo, verificou-se que a detecção do gene *tsh* foi estatisticamente maior em linhagens de alta e média patogenicidade (45,9%) do que nas linhagens de baixa patogenicidade (13%) ($p < 0,05$), corroborando o proposto por esses autores de que o gene *tsh* possa ser utilizado como marcador molecular de APEC, caso se considere a frequência encontrada em todas as linhagens patogênicas. Frequências diferentes foram encontradas por Mcpeake *et al.* (2005) que verificaram a presença do gene em 93,3% das linhagens comensais analisadas na Irlanda. Delicato *et al.* (2003), trabalhando com linhagens brasileiras, observaram que 39,5% das linhagens de *E. coli* de aves com colisepticemia apresentaram este gene, enquanto que em apenas 3,8% dos linhagens fecais de aves saudáveis foi possível detectar o mesmo gene. É importante ressaltar que este gene tem origem plasmidial, sendo encontrado em plasmídios pCoIV (Dozois *et al.*, 2000) e, dado a isto, se espera que flutuações na ocorrência apareçam, decorrentes da perda plasmidial, ou aquisição via transferência horizontal. Caso ocorra integração de plasmídio contendo este, ou qualquer outro gene, no cromossomo, o mesmo passa a ser cromossômico.

As fimbrias polares longas (*long polar fimbriae* – LPF) são relacionadas geneticamente à fimbria F1 e estão associadas à adesão de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium e à patogenicidade de linhagens *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC) O157:H7 (Doughty *et al.*, 2002). Em STECs, as LPFs são codificadas pelo operon *lpf*, podendo ser encontradas quatro variantes do gene *lpfA*, amplamente detectados entre as linhagens de *E. coli* diarreiogênicas: *lpfA*_{O1113}, *lpfA*_{O126}, *lpfA*_{O1157/154} e *lpfA*_{O1157/141}. A variante *lpfA*_{O1157/154} analisada neste estudo, foi encontrada em frequências bem distintas entre o Estado do Paraná com 16 (47,8%) linhagens *lpfA*_{O1157/154}⁺, e os demais Estados (Tabela 5). Além disso, 11 dessas linhagens foram classificadas como de alta patogenicidade. Isto pode indicar que esta fimbria pode colaborar com o processo de patogênese destas linhagens, em específico. Por outro lado, a variante *lpfA*_{O1157/141} foi um dos genes menos encontrados entre todas as linhagens estudadas. Mais estudos seriam necessários para verificar uma possível clonalidade destas linhagens e verificar o porquê desta diferença nas linhagens do Estado do Paraná.

Os genes *sfa* (adesina S) e *iha* (*iron-regulated-gene-homologue adhesin*) foram as sequências encontradas em menor frequência no presente estudo, estando presente em apenas duas linhagens APEC do RS e uma linhagem APEC de PE. Ambas foram classificadas como de alta patogenicidade. A adesina S é frequentemente encontrada em linhagens UPEC, causadoras de cistite e de pielonefrite aguda, mas geralmente são encontradas em baixas frequências entre linhagens APEC (Blanco *et al.*, 1997). Os resultados obtidos neste estudo, onde apenas duas (2,7%) linhagens apresentaram-se *sfa*⁺, ambas de alta patogenicidade, estão muito próximos ao encontrado por Stordeur *et al.* (2002) que detectaram o gene *sfa* em 4,4% das linhagens de *E. coli* de origem aviária e observaram que este gene era mais frequente em linhagens de origem extraintestinal do que em linhagens provenientes da microbiota intestinal das aves.

O gene *iha* apresenta atividade proteolítica, frequentemente encontrado em linhagens STEC *eae*-negativa (Schmidt *et al.*, 2001). Este gene codifica uma adesina comum em todos os sorotipos de STEC de diferentes origens (animal, humana e alimentar), sendo considerada uma adesina necessária ao estabelecimento de STEC em humanos, mas não suficiente para o desenvolvimento de infecção (Tarr *et al.*, 2000). A baixa frequência do gene *iha* entre as linhagens de *E. coli* aviárias analisadas neste estudo indica que esta adesina pode não ser necessária para a colonização dos tecidos das aves por APEC.

O gene *afa* (*afimbrial adhesin*), que codifica uma adesina afimbrial de estrutura fina e de difícil visualização, foi o único a não ser encontrado nas linhagens estudadas. Embora esse gene esteja comumente associado a linhagens de *E. coli* patogênica para mamíferos, ele foi detectado entre linhagens APEC que não possuem o gene *pap* (Stordeur *et al.*, 2002). Também foi demonstrado que *afaD* promove a invasão de células uroepiteliais, também estando associado às *E. coli* enteropatogênicas e uropatogênicas humanas (Keller, 2002; Kaper *et al.*, 2004; Antao *et al.*, 2009b). Os resultados deste estudo demonstram que o gene *afa* parece não estar relacionado à patogenicidade das linhagens pesquisadas.

Os genes envolvidos na captação de ferro, detectados de maneira significativa entre as linhagens de alta e média patogenicidade, com média de 4,1 e 3,1 genes, respectivamente, ao passo que 21 linhagens de baixa patogenicidade apresentaram, em média, apenas 1,1 genes relacionados à captação de ferro. Estes resultados demonstram a

importância dos sideróforos para a virulência das linhagens. Apenas duas linhagens de alta e duas de média patogenicidade não apresentaram os genes relacionados a sistemas de captação de ferro pesquisados, indicando duas possibilidades: ou estas linhagens existem algum outro sistema de captação de ferro ainda não descrito, ou nas mesmas linhagens a presença deste tipo de gene não se faz necessária à patogenicidade. .

A baixa concentração de ferro livre nos meios fisiológicos dos animais não é suficiente para permitir o crescimento bacteriano, que requer concentrações mínimas de 10^{-6} mol.L⁻¹ de ferro (Norton *et al.*, 1999). Grande parte das bactérias patogênicas extra-intestinais desenvolveu sistemas de alta afinidade para aquisição de ferro, que competem com as glicoproteínas de ligação de ferro dos hospedeiros, tais como as transferrinas, e que permitem o crescimento bacteriano em locais de baixas concentrações de ferro (Dho-Moulin e Fairbrother, 1999).

Neste estudo, os genes *iucD*, *iutA*, *iroN* e *fepC* (*Ferric enterobactin transport ATP-binding protein*) como constituintes de sistemas de captação de ferro, apresentaram uma diferença extremamente significativa ($p < 0,001$) entre as linhagens de alta e média patogenicidade frente às de baixa patogenicidade. A aerobactina é o sideróforo mais amplamente caracterizado até hoje. Foi descrito como parte de uma ilha de patogenicidade de *Shigella* por Vokes *et al.* (1999). A aerobactina é codificada pelo operon composto pelos genes *iucABCD* e *iut*, que podem ser plasmidiais ou cromossômicos, sendo que *iucD* codifica o sideróforo hidroxamato que capta o ferro, e *iutA* codifica o receptor da aerobactina (Okeke *et al.*, 2004). Este sistema está altamente correlacionado à colissepticemia em frangos (Vidotto *et al.*, 1990; Janßen *et al.*, 2001; La Ragione e Woodward, 2002). A inserção do conjunto desses genes em uma bactéria comensal aumenta a letalidade em embriões de pinto e a habilidade de colonizar fígado de camundongo (Skyberg *et al.*, 2006).

A salmoquelina é outro sideróforo localizado em uma ilha de patogenicidade encontrado no plasmídio pColV, codificada pelos genes *iroBCDEN* (*Catecholate siderophore salmochelin receptor*). Foi demonstrado que a expressão da proteína IroN é regulada de acordo com a concentração de ferro presente no meio e aumentada na presença de urina humana, fluido ascítico ou sangue, de acordo com a origem das respectivas linhagens de *E. coli* utilizadas (Sorsa *et al.*, 2003).

O gene *fepC* codifica uma possível proteína de transporte de enterobactina ATP – ligante envolvida na biossíntese de enterobactina (Ratledge e Dover, 2000).

Os genes *irp-2* (*Iron repressible protein yersinia bactin synthesis*) e *fyuA* (*Ferric yersinia uptake – yersinia bactin receptor*) também apresentaram diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre linhagens de alta e média patogenicidade frente às de baixa patogenicidade. Esse fato é mais um indicativo de que os sideróforos são essenciais para a patogênese da colibacilose aviária. Os genes *fyuA* e *irp-2*, descritos pela primeira vez em *Yersinia enterocolitica*, também já foram descritos em *E. coli* enterohemorrágica patogênica para humanos e em linhagens APEC (Gophna *et al.*, 2001). O gene *fyuA* codifica uma proteína que atua na captação de ferro enquanto que o *irp-2* codifica uma proteína repressora à presença de ferro (La Ragione e Woodward, 2002; Schubert *et al.*, 2002).

Os genes *sitDe* e *sitDc*, plasmidial e cromossômico, respectivamente, fazem parte do sistema de transporte de ferro codificado pelo operon *sitABCD* (*Salmonella iron transport system*). O operon *sitABCD* codifica permeases (proteínas integrais de membrana) que conferem às APEC que o possuem um aumento na multiplicação celular devido ao aumento da captura de ferro e manganês (Sabri *et al.*, 2006). Também atua contra o estresse oxidativo, sendo possivelmente requerido durante a interação com fagócitos (Sabri *et al.*, 2008). Neste trabalho, este operon não foi observado em uma frequência significativa entre as linhagens estudadas, assim como não foi observada diferença estatística entre as linhagens conforme a classificação de patogenicidade. Este resultado está de acordo com as observações feitas por Sabri *et al.* (2006), que demonstraram que um sistema homólogo ao SitABCD encontrado em uma linhagem APEC não forneceu uma contribuição substancial para a virulência da linhagem. Os autores propuseram que a contribuição deste sistema à virulência de APEC pode diferir em cada linhagem e em cada sorogrupo.

Em relação aos genes de resistência ao soro do hospedeiro, *cvi* (*Structural genes of colicin V operon*), *iss* (*Increased serum survival*), *kpsMT2* (*Group 2 capsule antigen*), *kpsMT3* (*Group 3 capsule antigen*), *ompT* (*Outer membrane protein*), *neuc* (*K1 capsular polysaccharide*) e *traT* (*Transfer protein T*), foi possível notar outra distinção importante entre linhagens de alta e média patogenicidade, que apresentaram em média 2,6 genes

associados a esse fenômeno, com apenas quatro linhagens de alta e uma de média patogenicidade não apresentando genes relacionados à resistência ao soro, ao passo que 46 linhagens de baixa patogenicidade apresentaram uma média de apenas 1,6 genes e dentre estas, 14 linhagens não apresentaram qualquer um desses genes.

Quando comparadas as linhagens de alta/média patogenicidade contra a linhagens de baixa patogenicidade, os genes *ompT* e *cvi* ($p<0,001$) e *iss* ($p<0,05$) apresentaram diferença estatística significativa. A resistência ao soro do hospedeiro pela bactéria está bem descrita e tem sido relacionada à patogênese, sendo conferida por uma conjunção de fatores, combinando efeitos do LPS (lipopolissacarídeo), produção de aerobactina, cápsula, antígeno O e proteínas de membrana (Wooley *et al.*, 1992; La Ragione e Woodward, 2002). O gene cromossômico *ompT* (*outer membrane protein T*) codifica uma proteína da membrana externa de *E. coli* e outras enterobactérias. O gene *ompT*, presente na maioria das linhagens APEC, possui funções proteolíticas, adesivas e invasivas, participando da formação de biofilmes. Este gene também age como marcador imunológico e serve de receptor para vários bacteriófagos (Nolan *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2007).

O gene *cvi* está presente nos plasmídios que codificam a Colicina V (pColV), estando também relacionado à resistência ao soro do hospedeiro. A presença de plasmídios de alto peso molecular está fortemente associada à virulência de linhagens associados à colibacilose, sendo um fator importante para o desenvolvimento da infecção em aves. Outros estudos já demonstraram o mesmo fato observado neste trabalho, de que plasmídios pColV são mais frequentes em linhagens APEC do que em linhagens comensais (Rodriguez-Siek *et al.*, 2005). Além de *cvi*, estão presentes nos plasmídios pColV os genes *iroN*, *iss*, *iucD*, *sitD*, *traT* e *tsh*. Neste estudo, já foi relatada a presença marcante dos genes *iroN*, *iucD*, *cvi* e *tsh*, especialmente nas linhagens de alta e média patogenicidade, indicando que os plasmídios pColV estão fortemente associados à virulência de linhagens APEC, como já descrito em outros trabalhos (Nolan *et al.*, 2003; Rodriguez-Siek *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 2007; Johnson *et al.*, 2008b).

O gene *iss* é outro fator relacionado aos plasmídios pColV. A proteína Iss, uma lipoproteína da membrana externa que apresenta propriedade contra o efeito do soro, foi descrita por Binns *et al.* (1979). Acredita-se que Iss previna a deposição do complexo de ataque do complemento à membrana por um mecanismo ainda desconhecido. Há trabalhos

que sugerem que o *Iss* é mais importante na patogenicidade de *E. coli* aviárias do que na de *E. coli* humanas (Nolan *et al.*, 2003; Dziva e Stevens, 2008a).

Em relação aos genes relacionados a toxinas, apenas o gene *hlyF* (*Putative hemolysin F*) apresentou diferença estatística ($p < 0,001$) entre linhagens de alta e média patogenicidade com as de baixa patogenicidade. Este resultado está de acordo com o observado em diversos estudos que mencionam que HlyF, uma possível hemolisina, está altamente relacionada às linhagens APEC (Finlay e Falkow, 1997; La Ragione e Woodward, 2002; Johnson *et al.*, 2008b). Os demais genes *ast*, codificador da toxina EAST1 (*heat stable cytotoxin associated with enteroaggregative E. coli*), e *vat* (*Vacuolating autotransporter toxin*) codificadora de uma toxina autotransportadora vacuolizante, não apresentaram frequências maiores do que 15% (11) em linhagens de alta e média patogenicidade. O gene *sat* (*secreted autotransporter toxin*) não esteve presente em qualquer das linhagens aqui estudadas.

O gene *ibea* (*invasion of brain endothelium protein a*) relacionado a uma invasina capaz de atravessar a barreira hemato-encefálica foi detectado em apenas dez (13,5%) das linhagens de alta e média patogenicidade e em uma (2,2%) linhagem de baixa patogenicidade.

O gene *gimB* (*Genetic island associated with newborn meningitis*), associado à invasão em linhagens de *E. coli* causadoras de meningite em recém-nascidos (NMEC) e envolvido na manutenção dos altos níveis de bacteremia característicos da doença (Bonacorsi *et al.*, 2003) também foi pesquisado. Mais recentemente, foi relatado que um mutante APEC (DE205B), com deleção do gene *ibeB*, apresentou diminuição de sua patogenicidade *in vivo* e capacidade de invasão de células DF-1 em comparação com uma linhagem APEC selvagem, indicando que este gene desempenha um importante papel na patogenicidade e invasão de linhagens APEC (Wang *et al.*, 2012). Entretanto, Geyrid *et al.* (1994) propuseram que a ausência ou baixa frequência de genes típicos de invasão não indica que linhagens de APEC não sejam capazes de invadir tecidos do hospedeiro. Esses autores sugerem que as linhagens portadoras de vários sistemas de captação de ferro no genoma provavelmente possuem capacidade de invasão não mediada pelos genes analisados neste estudo. Portanto, como parte das linhagens deste trabalho apresentou vários

genes relacionados a captação de ferro, é possível que elas tenham potencial de invasão, apesar da baixa prevalência de invasinas (*gimB* e *ibeA*).

Entre os genes relacionados ao SST6 (sistema de secreção tipo 6), destaca-se apenas a frequência de *vgrG*, encontrado em 43 (58,1%) das linhagens de alta e média patogenicidade. Os demais genes *hcp*, *clpV* e *icmF* apresentaram frequências abaixo de 20% nessas mesmas linhagens. Apenas uma linhagem de média patogenicidade (PR14) apresentou todos os genes pesquisados do SST6. Recentemente, foram publicados trabalhos demonstrando que a presença do SST6 pode contribuir para a patogenicidade de uma linhagem APEC (De Pace *et al.*, 2010; De Pace *et al.*, 2011). O operon do SST6 contém de 12 a 20 genes, mas sua composição e organização variam entre as espécies. As proteínas derivadas desses genes atuam na montagem de uma estrutura tubular, formadas pelas proteínas Hcp e VgrG, a qual é energizada por um sistema ATPase desempenhado por proteínas da família ClpV (Filloux, 2009). As proteínas Hcp e VgrG desempenham o duplo papel de formação da nano maquinaria tubular e de produtos de secreção (Dudley *et al.*, 2006; Pukatzki *et al.*, 2007; Zheng e Leung, 2007). Com esta grande variedade de componentes do SST6, não é possível afirmar que este sistema não esteja amplamente distribuído em linhagens APEC, porém a média frequência do gene *vgrG* nas linhagens testadas neste trabalho, possa ser um indicativo da presença deste sistema entre *E. coli* aviárias. Além disso, é importante lembrar que os iniciadores utilizados para a pesquisa dos genes do SST6 são idênticos aos encontrados em EHEC O157:H7 cepa Sakai, podendo haver diferenças significativas em alguns genes do SST6 presente em APEC que possam não ter sido evidenciados neste trabalho devido a uma possível baixa homologia entre genes (Rojas, comunicação pessoal).

A presença de um SST6 idêntico àquele encontrado em uma linhagem EHEC O157:H7 em apenas uma das linhagens pode indicar uma possível transferência horizontal via sistemas genéticos clássicos (conjugação, transformação, transdução) bacterianos. Por outro lado, a maior presença do gene *VgrG* e ausência dos demais pode indicar um sistema de recombinação altamente ativo e instável dentro dos genomas de APEC. Neste caso específico, uma ou mais ilhas de patogenicidade (PAI) contendo estes e outros genes, cuja deleção poderia levar à flutuação dos diferentes perfis GAV observados. Este tipo de sistema

de recombinação instável poderá ser verificado, em trabalhos futuros, através do sequenciamento e comparação de genomas de diferentes linhagens APEC.

Por último, outro gene importante verificado neste estudo, *malx* (*Pathogenicity-associated island marker*), também apresentou diferença estatística ($p<0,05$) entre linhagens de alta e média patogenicidade frente às linhagens de baixa patogenicidade. No entanto, sua frequência, no total das linhagens, é considerada baixa, pois apenas 15 (20,3%) e uma (2,2%) das linhagens de alta e média e baixa patogenicidade, respectivamente, apresentaram o gene *malx*. Esta baixa frequência em nossos resultados, indicam que a utilização deste gene como marcador de patogenicidade em APEC brasileiras não é apropriada e que a ilha de patogenicidade (PAI) da linhagem UPEC CFT073 não foi prevalente em APEC.

De uma maneira geral, estes resultados, assim como os obtidos por outros estudos no Brasil (De Brito *et al.*, 2003; Delicato *et al.*, 2003), mostram um panorama da frequência de fatores de virulência associados a APEC, indicando que as linhagens aqui estudadas, com particularidades para um ou mais GAV, apresentam perfil associados a GAV semelhante às linhagens encontradas na Alemanha (Janßen *et al.*, 2001; Ewers *et al.*, 2007), no Canadá (Ngeleka *et al.*, 2002), na China (Zhao *et al.*, 2009) no Japão (Yaguchi *et al.*, 2007) e nos Estados Unidos (Rodriguez-Siek *et al.*, 2005; Johnson *et al.*, 2008b).

5.3 Tipagem filogenética

Análises filogenéticas com linhagens de *E. coli* humanas mostraram que é possível dividi-las em quatro grupos principais (A, B1, B2 e D). No grupo B2 e, menos frequentemente no grupo D, encontram-se linhagens que causam infecções extra-intestinais em humanos. No grupo B1, predominam as linhagens patogênicas intestinais animais, enquanto que no grupo A, predominam as linhagens comensais (Herzer *et al.*, 1990; Clermont *et al.*, 2000).

Os resultados da tipagem filogenética para as linhagens utilizadas neste estudo demonstram que 24 (32,4%) das linhagens de alta e média patogenicidade foram classificadas como pertencentes ao grupo B1 e outras 24 (32,4%) como pertencentes ao grupo D. Destas mesmas linhagens, 13 (17,6%) foram pertencentes ao grupo A e 13

(17,6%) foram pertencentes ao grupo B2. Ao passo que nas linhagens de baixa patogenicidade, 23 (50%) foram classificadas como B1, 17 (37%) como A, três (6,5%) no grupo B2 e três (6,5%) como D (Figura 4). As linhagens de alta e média patogenicidade estão mais correlacionadas ao grupo D ($p<0,001$) e as linhagens de baixa patogenicidade estão associadas ao grupo A ($p<0,05$), o que se aproxima ao observado por Clermont *et al.* (2000) porém, estes autores observaram uma predominância menos frequente de *E. coli* patogênicas extra-intestinais (ExPEC) no grupo D, o que contrasta com as linhagens APEC e linhagens de alta/média patogenicidade encontradas nesse trabalho. Além disso, esses resultados diferem de estudos anteriores sobre APEC nos Estados Unidos (Rodriguez-Siek *et al.*, 2005; Johnson *et al.*, 2006; Johnson *et al.*, 2008b), na China (Zhao *et al.*, 2009) e na Alemanha (Ewers *et al.*, 2007), segundo os quais as linhagens APEC foram mais associados ao grupo A e na França (Moulin-Schouleur *et al.*, 2006) em que a maioria das linhagens foi classificada como pertencente ao grupo B2.

Herzer *et al.* (1990) propuseram que o grupo B1 seja composto primordialmente por linhagens patogênicas de animais. Porém, em todos os estudos sobre APEC (Johnson *et al.*, 2003; Ewers *et al.*, 2007; Moulin-Schouleur *et al.*, 2007; Johnson *et al.*, 2008b; Zhao *et al.*, 2009), observou-se que menos de 10% das linhagens pertenciam a este grupo. Neste estudo, observa-se que 24 (32,4%) das linhagens de alta e média patogenicidade foram classificadas como B1. Ao passo que 23 (50%) das linhagens de baixa patogenicidade também pertencem a este grupo. Este dado contrariando a hipótese de que linhagens patogênicas de animais, pelo menos de origem aviária, estejam fortemente relacionadas ao grupo B1. Além disso, quando analisadas as diferenças regionais, através desta tipagem, é possível perceber uma distinção clonal entre as linhagens, indicando uma possível evolução diferente entre as linhagens de cada Estado. Porém análises filogenéticas mais acuradas, como PFGE (eletroforese em campo pulsado) ou MLST (*Multi Locus Sequence Typing*) seriam necessárias para comprovar essa inferência.

Com base nesses resultados, é possível inferir que não existe um grupo filogenético que compreenda exclusivamente linhagens patogênicas animais e humanos, justificando a hipótese de que APEC é heterogênea e deve ser considerada um agente zoonótico em potencial.

5.4 Determinação dos antígenos O e H

Dos 22 sorogrupos identificados neste trabalho, apenas quatro estão relacionados a linhagens que já foram identificadas como APEC. Dentre todos os sorogrupos citados por Gross (1994) como relacionados a linhagens patogênicas em aves, apenas os sorogrupos O8, presente em apenas duas linhagens, uma de alta e outra de baixa patogenicidade, e O15, presente em apenas uma linhagem de alta patogenicidade, foram encontradas neste estudo. As três linhagens foram descritas como AFEC. Outros sorogrupos como O1, O2 e O72, frequentemente associados com enfermidades aviárias septicêmicas e respiratórias (Sojka e Carnaghan, 1961; Harry, 1965a; Barnes *et al.*, 2003) não foram identificados neste trabalho.

No Brasil, levantamentos realizados por Farias (1980), Ferreira (1989) e Vidotto *et al.* (1990) caracterizando os principais sorogrupos envolvidos nas patologias respiratórias das aves. Apenas o sorogrupo O8 foi observado neste estudo. Dentre os sorogrupos indicados por Monroy (1992) por estarem relacionados a quadros de salpingite de galinhas, apenas o sorogrupo O5, presente em duas linhagens AFEC de média patogenicidade, foram encontradas neste estudo. Além disso, apenas o sorogrupo O158 encontrado por Silva (1993), trabalhando com linhagens de pintainhos de um dia de idade com onfalite, foi detectado, neste estudo, em uma linhagem AFEC de média patogenicidade.

Neste estudo, foi possível observar uma grande diversidade de sorogrupos até então não relacionados com linhagens APEC, pelo menos no Brasil. Neste estudo foram observados 13 sorogrupos (O5, O7, O9, O11, O19, O68, O73, O85, O100, O150, O153, O156 e O176) que não haviam sido relatados. Cada um destes sorogrupos apresentou frequência menor do que 5% entre as linhagens testadas.

Para Silveira *et al.* (2002) a diversidade de sorogrupos envolvidos com colibacilose, podem refletir as diferenças regionais associadas à prevalência de diferentes grupos clonais de linhagens. Em basicamente todos os levantamentos citados anteriormente, são relatados altos índices de linhagens não reagentes, ou não tipáveis, como foi o caso das linhagens deste estudo. O grande número de linhagens não tipáveis dificulta os diagnósticos fundamentados na sorologia (Dho-Moulin e Fairbrother, 1999). No presente estudo, 32 (26,7%) das linhagens foram não tipáveis, acima do observado para os demais sorogrupos,

o que está de acordo com os descritos na literatura que apontam para um percentual entre 14,8 a 60,0% para estas linhagens (Monroy *et al.*, 2005; Johnson *et al.*, 2008a; Zhao *et al.*, 2009). Dentre os antígenos flagelares, destaca-se apenas o H21, presente em 10 linhagens O não tipáveis.

Estes resultados vêm reafirmar a ideia de que a patogenicidade de APEC pode estar mais relacionada com um impacto acumulativo de vários GAV, do que com apenas um fator em específico, como é o caso da presença de determinados antígenos somáticos ou flagelares. A presença de várias linhagens não-tipáveis, através da sorologia, sugere uma possível clonalidade, enquanto a presença de alguns sorogrupos diferentes nas linhagens de alta patogenicidade indica o contrário. A alta prevalência de um único clone poderia indicar que ele tenha se adaptado às condições das aves brasileiras, enquanto a possível variabilidade clonal no grupo das linhagens altamente patogênicas sugeriria uma possível transferência horizontal de genes de patogenicidade. Entretanto, para melhor elucidar essa questão, é necessário usar outras técnicas, como, por exemplo eletroforese em campo pulsado.

5.5 Análise de agrupamento

Estudos da diversidade intra-espécie são importantes para analisar as semelhanças entre linhagens bacterianas, nos dando informações preciosas quanto à origem filogenética, por exemplo. Como não existe um patotipo completamente definido para linhagens APEC, uma das maneiras de correlacionar linhagens é através de análises de agrupamento. Dentre os possíveis métodos, destacam-se a eletroforese de campo pulsado (PFGE) (Kawano *et al.*, 2007), amplificação aleatória do DNA polimórfico (RAPD) (Singer *et al.*, 2000) e, a análise de restrição do DNA ribossômico amplificado (ARDRA) (García-Martínez *et al.*, 1996).

A análise de agrupamento realizada neste estudo, baseia-se na aproximação das linhagens buscando similaridades entre a quantidade e repetições dos mesmos GAV. Nos quatro agrupamentos formados, não foi possível estabelecer diferenças regionais entre as linhagens. Porém é possível observar a marcante divisão entre linhagens de alta e média patogenicidade frente às de baixa patogenicidade (Figura 5). Ao restringir o número de GAV apenas aos que apresentaram diferença estatística extremamente significativa

($p < 0,001$), percebemos que os genes *iucD*, *iutA*, *iroN*, *fepC*, *ompT*, *cvi* e *hlyF* distinguem muito bem as linhagens de alta e média patogenicidade das de baixa patogenicidade. Skyberg *et al.* (2003) foi um dos primeiros a trabalhar em um multiplex PCR para a determinação de preditores mínimos para o patotipo APEC, sugerindo que *iucC*, *iss*, *tsh*, *cvi* serviriam para determinar o patotipo das *E. coli* não patogênicas. Estes autores já demonstravam a importância de um teste de patogenicidade para a comprovação dos resultados, pois as linhagens APEC que apresentaram apenas dois dos genes mencionados, foram as que apresentaram menor letalidade de embriões de galinha. Já as linhagens isoladas de aves saudáveis que possuíam os quatro genes em questão, foram as mais letais do estudo.

Em seguida, Ewers *et al.* (2005) propuseram outro protocolo de multiplex PCR, para a diferenciação do patotipo APEC, baseado na presença de no mínimo quatro genes, dentre oito marcadores, os quais seriam, *papC*, *irp-2*, *iss*, *tsh*, *vat*, *astA*, *iucD* e *cva/cvi*. Os dois trabalhos mencionados estudaram poucas linhagens e uma pequena diversidade de genes que já foram relatados como relacionados a FVs.

Johnson *et al.* (2008b), trabalhando com 124 linhagens caracterizadas pelo seu perfil de patogenicidade e 46 GAV, propuseram que os genes *iutA*, *iroN*, *iucD*, *ompT* e *hlyF* seriam os cinco preditores mínimos para o patotipo APEC. Este último protocolo foi aplicado em uma coleção de 994 *E. coli* aviária e demonstrou uma margem de erro de 14,6%. O mesmo autor não havia trabalhado com os genes *fepC* e *cvi*, genes que foram apresentados com marcante diferença estatística entre as linhagens de alta e média patogenicidade frente às de baixa patogenicidade neste estudo. Portanto, é possível dizer que o pentaplex PCR proposto por Johnson *et al.* (2008b) pode ser seguramente utilizado para as linhagens brasileiras. Talvez a incorporação dos genes *fepC* e *cvi* possam diminuir a margem de erro deste protocolo em questão.

6 CONCLUSÃO

De uma maneira geral, apesar de as *E. coli* aviárias serem consideradas um grupo muito diversificado em relação à presença de GAV, sorotipos, perfil de patogenicidade e grupos filogenéticos, é possível observar diferenças marcantes entre linhagens pertencentes ao patotipo APEC das linhagens isoladas de aves aparentemente saudáveis, especialmente através da composição de genes relacionados à fatores de virulência. Dentre as características estudadas, a presença de determinados GAV, em especial *iucD*, *iutA*, *iroN*, *fepC*, *ompT*, *cvi* e *hlyF*, apresentam potencial de servir como marcadores moleculares para o patotipo APEC de linhagens brasileiras.

Em relação à patogenicidade, é possível estabelecer a seguinte relação: quanto maior a presença de fatores de virulência, de ações diversas, maior a patogenicidade das linhagens. Sendo que as linhagens que mais possuíam genes relacionados à captação de ferro do hospedeiro, foram as mais virulentas.

Os genes relacionados ao sistema de secreção tipo 6 (SST6), idênticos aos encontrados em EHEC O157:H7 cepa Sakai, demonstram-se bem distribuídos entre as linhagens pesquisadas, o que indica que o SST6 possa representar um importante papel na patogenicidade de linhagens APEC, porém apenas uma linhagem apresentou a combinação dos quatro genes. É provável que, embora as linhagens APEC apresentem parte dos componentes do SST6, semelhante aos da cepa Sakai, estas também apresentem outros componentes com constituição genética única e que não foram detectados nesse trabalho.

A sorotipagem demonstrou-se com pouca utilidade em separar linhagens patogênicas das não patogênicas, por apresentarem grande quantidade de linhagens não tipáveis. Porém foi demonstrada uma diversidade maior de sorogrupos não antes observados em APEC brasileiras.

Não foi possível observar, através da detecção de GAV, diferenças regionais marcantes entre as linhagens de diferentes Estados brasileiros, porém através da análise filogenética, foi possível verificar que as linhagens têm origens evolutivas distintas entre os Estados pesquisados, indicando a presença de clonalidade por regiões. Além disso, as linhagens de alta e média patogenicidade pertenceram, em sua maioria, ao grupo filogenético D, diferentemente do que já foi descrito na literatura.

7 REFERÊNCIAS

ANTAO, E.; EWERS, C.; GURLEBECK, D.; PREISINGER, R.; HOMEIER, T.; LI, G.; WIELER, L. Signature-tagged mutagenesis in a chicken infection model leads to the identification of a novel avian pathogenic *Escherichia coli* fimbrial adhesin. **PLoS One**, v. 4, n. 11, p. e7796, 2009a.

ANTAO, E. M.; WIELER, L. H.; EWERS, C. Adhesive threads of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. **Gut Pathog**, v. 1, n. 1, p. 22, 2009b.

ARNÉ, P.; MARC, D.; BRÉE, A.; SCHOULER, C.; DHO-MOULIN, M. Increased Tracheal Colonization in Chickens without Impairing Pathogenic Properties of Avian Pathogenic *Escherichia coli* MT78 with a fimH Deletion. **Avian Diseases**, v. 44, n. 2, p. 343-355, 2000.

ARNQVIST, A.; OLSÉN, A.; PFEIFER, J.; RUSSELL, D. G.; NORMARK, S. The Crl protein activates cryptic genes for curli formation and fibronectin binding in *Escherichia coli* HB101. **Molecular Microbiology**, v. 6, n. 17, p. 2443-2452, 1992.

ARP, L. H.; JENSEN, A. E. Piliation, Hemagglutination, Motility, and Generation Time of *Escherichia coli* That Are Virulent or Avirulent for Turkeys. **Avian Diseases**, v. 24, n. 1, p. 153-161, 1980.

BALLISTER, E. R.; LAI, A. H.; ZUCKERMANN, R. N.; CHENG, Y.; MOUGOUS, J. D. In vitro self-assembly of tailorable nanotubes from a simple protein building block. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 10, p. 3733-3738, 2008.

BARNES, H. J.; VAILLANCOURT, J. P.; GROSS, W. Colibacillosis. In: SAIF, Y. (Ed.). **Diseases of poultry**. 11. Ames: Iowa State University Press, 2003. p.631-656.

BAUCHART, P.; GERMON, P.; BRÉE, A.; OSWALD, E.; HACKER, J.; DOBRINDT, U. Pathogenomic comparison of human extraintestinal and avian pathogenic *Escherichia coli* – Search for factors involved in host specificity or zoonotic potential. **Microbial Pathogenesis**, v. 49, n. 3, p. 105-115, 2010.

BINNS, M. M.; DAVIES, D. L.; HARDY, K. G. Cloned fragments of the plasmid ColV, I-K94 specifying virulence and serum resistance. **Nature**, v. 279, n. 5716, p. 778-781, 1979.

BLANCO, J. E.; BLANCO, M.; MORA, A.; BLANCO, J. Prevalence of bacterial resistance to quinolones and other antimicrobials among avian *Escherichia coli* strains isolated from septicemic and healthy chickens in Spain. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 8, p. 2184-5, 1997.

BONACORSI, S.; CLERMONT, O.; HOUDOUIN, V.; CORDEVANT, C.; BRAHIMI, N.; MARECAT, A.; TINSLEY, C.; NASSIF, X.; LANGE, M.; BINGEN, E. Molecular Analysis and Experimental Virulence of French and North American *Escherichia coli*

Neonatal Meningitis Isolates: Identification of a New Virulent Clone. **Journal of Infectious Diseases**, v. 187, n. 12, p. 1895-1906, 2003.

BROCCHI, M.; FERREIRA, A.; LANCELLOTTI, M.; STEHLING, E. G.; CAMPOS, T. A.; NAKAZATO, G.; CASTRO, A. F. P. D.; SILVEIRA, W. D. Typing of avian pathogenic *Escherichia coli* strains by REP-PCR. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 26, p. 69-73, 2006.

CAMPOS, T. A. D.; NAKAZATO, G.; STEHLING, E. G.; BROCCHI, M.; SILVEIRA, W. D. D. Clonal study of avian *Escherichia coli* strains by *fliC* conserved-DNA-sequence regions analysis. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 28, p. 508-514, 2008.

CAMPOS, T. A. D.; STEHLING, E. G.; FERREIRA, A.; PESTANA DE CASTRO, A. F.; BROCCHI, M.; DIAS DA SILVEIRA, W. Adhesion properties, fimbrial expression and PCR detection of adhesin-related genes of avian *Escherichia coli* strains. **Veterinary Microbiology**, v. 106, n. 3-4, p. 275-285, 2005.

CLERMONT, O.; BONACORSI, S.; BINGEN, E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. **Appl Environ Microbiol**, v. 66, n. 10, p. 4555 - 4558, 2000.

COLLINSON, S. K.; DOIG, P. C.; DORAN, J. L.; CLOUTHIER, S.; TRUST, T. J.; KAY, W. W. Thin, aggregative fimbriae mediate binding of *Salmonella enteritidis* to fibronectin. **Journal of Bacteriology**, v. 175, n. 1, p. 12-18, 1993.

DE BRITO, B. G.; GAZIRI, L. C. J.; VIDOTTO, M. C. Virulence Factors and Clonal Relationships among *Escherichia coli* Strains Isolated from Broiler Chickens with Cellulitis. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 7, p. 4175-4177, 2003.

DE HOON, M. J. L.; IMOTO, S.; NOLAN, J.; MIYANO, S. Open source clustering software. **Bioinformatics**, v. 20, n. 9, p. 1453-1454, 2004.

DE PACE, F.; BOLDRIN DE PAIVA, J.; NAKAZATO, G.; LANCELLOTTI, M.; SIRCILI, M. P.; GUEDES STEHLING, E.; DIAS DA SILVEIRA, W.; SPERANDIO, V. Characterization of IcmF of the type VI secretion system in an avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) strain. **Microbiology**, v. 157, n. 10, p. 2954-2962, 2011.

DE PACE, F.; NAKAZATO, G.; PACHECO, A.; BOLDRIN DE PAIVA, J.; SPERANDIO, V.; DIAS DA SILVEIRA, W. The Type VI Secretion System Plays a Role in Type 1 Fimbria Expression and Pathogenesis of an Avian Pathogenic *Escherichia coli* Strain. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 12, p. 4990-4998, 2010.

DELICATO, E. R.; DE BRITO, B. G.; GAZIRI, L. C. J.; VIDOTTO, M. C. Virulence-associated genes in *Escherichia coli* isolates from poultry with colibacillosis. **Veterinary Microbiology**, v. 94, n. 2, p. 97-103, 2003.

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

DHO, M.; LAFONT, J. P. Adhesive Properties and Iron Uptake Ability in Escherichia coli Lethal and Nonlethal for Chicks. **Avian Diseases**, v. 28, n. 4, p. 1016-1025, 1984.

DOUGHTY, S.; SLOAN, J.; BENNETT-WOOD, V.; ROBERTSON, M.; ROBINS-BROWNE, R. M.; HARTLAND, E. L. Identification of a Novel Fimbrial Gene Cluster Related to Long Polar Fimbriae in Locus of Enterocyte Effacement-Negative Strains of Enterohemorrhagic Escherichia coli. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 12, p. 6761-6769, 2002.

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

DOZOIS, C. M.; DHO-MOULIN, M.; BRÉE, A.; FAIRBROTHER, J. M.; DESAUTELS, C.; CURTISS, R. Relationship between the Tsh Autotransporter and Pathogenicity of Avian Escherichia coli and Localization and Analysis of the tsh Genetic Region. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 7, p. 4145-4154, 2000.

DOZOIS, C. M.; POURBAKHS, S. A.; FAIRBROTHER, J. M. Expression of P and type 1 (F1) fimbriae in pathogenic Escherichia coli from poultry. **Veterinary Microbiology**, v. 45, n. 4, p. 297-309, 1995.

DUDLEY, E. G.; THOMSON, N. R.; PARKHILL, J.; MORIN, N. P.; NATARO, J. P. Proteomic and microarray characterization of the AggR regulon identifies a pheU pathogenicity island in enteroaggregative Escherichia coli. **Molecular Microbiology**, v. 61, n. 5, p. 1267-1282, 2006.

DUEHOLM, M. S.; ALBERTSEN, M.; OTZEN, D.; NIELSEN, P. H. Curli Functional Amyloid Systems Are Phylogenetically Widespread and Display Large Diversity in Operon and Protein Structure. **PLoS ONE**, v. 7, n. 12, p. e51274, 2012.

DUTTA, P. R.; CAPPELLO, R.; NAVARRO-GARCÍA, F.; NATARO, J. P. Functional Comparison of Serine Protease Autotransporters of Enterobacteriaceae. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 12, p. 7105-7113, 2002.

DZIVA, F.; STEVENS, M. Colibacillosis in poultry: unravelling the molecular basis of virulence of avian pathogenic Escherichia coli in their natural hosts. **Avian Pathology**, v. 37, n. 4, p. 355-366, 2008a.

DZIVA, F.; STEVENS, M. P. Colibacillosis in poultry: unravelling the molecular basis of virulence of avian pathogenic Escherichia coli in their natural hosts. **Avian Pathol**, v. 37, n. 4, p. 355-66, 2008b.

EWERS, C.; JANßEN, T.; KIEßLING, S.; PHILIPP, H.-C.; WIELER, L. H. Rapid Detection of Virulence-Associated Genes in Avian Pathogenic *Escherichia coli* by Multiplex Polymerase Chain Reaction. **Avian Diseases**, v. 49, n. 2, p. 269-273, 2005.

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. **Vet Microbiol**, v. 104, n. 1-2, p. 91-101, 2004.

EWERS, C.; LI, G.; WILKING, H.; KIELING, S.; ALT, K.; ANTÃO, E.-M.; LATURNUS, C.; DIEHL, I.; GLODDE, S.; HOMEIER, T.; BÖHNKE, U.; STEINRÜCK, H.; PHILIPP, H.-C.; WIELER, L. H. Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: How closely related are they? **International Journal of Medical Microbiology**, v. 297, n. 3, p. 163-176, 2007.

FANTINATTI, F.; SILVEIRA, W. D.; CASTRO, A. F. P. Characteristics associated with pathogenicity of avian septicemic *Escherichia coli* strains. **Veterinary Microbiology**, v. 41, n. 1-2, p. 75-86, 1994.

FARIAS, M. T. Tipagens sorológicas de amostras de *Escherichia coli* isoladas de aves em municípios do Rio Grande do Sul. **IPVDF**, v. 6, p. 6, 1980.

FERREIRA, A.; KNÖBL, T. Colibacilose aviária. In: BERCHIERI JUNIOR, A. e MACARI, M. (Ed.). **Doença das aves**. Campinas: Facta, 2000. p.197-207.

FERREIRA, A. J. P. **Fatores de patogenicidade de *Escherichia coli* de origem aviária: estudo comparativo entre amostras patogênicas e apatogênicas**. 1989. 102 (Mestrado). Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade de São Paulo, São Paulo.

FIELDS, P. I.; BLOM, K.; HUGHES, H. J.; HELSEL, L. O.; FENG, P.; SWAMINATHAN, B. Molecular characterization of the gene encoding H antigen in *Escherichia coli* and development of a PCR-restriction fragment length polymorphism test for identification of *E. coli* O157:H7 and O157:NM. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 5, p. 1066-70, 1997.

FILLOUX, A. The type VI secretion system: a tubular story. **EMBO J**, v. 28, n. 4, p. 309-310, 2009.

FILLOUX, A.; HACHANI, A.; BLEVES, S. The bacterial type VI secretion machine: yet another player for protein transport across membranes. **Microbiology**, v. 154, n. 6, p. 1570-1583, 2008.

FINLAY, B. B.; FALKOW, S. Common themes in microbial pathogenicity revisited. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 61, n. 2, p. 136-69, 1997.

GARCÍA-MARTÍNEZ, J.; MARTÍNEZ-MURCIA, A.; ANTÓN, A. I.; RODRÍGUEZ-VALERA, F. Comparison of the small 16S to 23S intergenic spacer region (ISR) of the

rRNA operons of some *Escherichia coli* strains of the ECOR collection and *E. coli* K-12. **Journal of Bacteriology**, v. 178, n. 21, p. 6374-7, 1996.

GOPHNA, U.; BARLEV, M.; SEIJFFERS, R.; OELSCHLAGER, T. A.; HACKER, J.; RON, E. Z. Curli Fibers Mediate Internalization of *Escherichia coli* by Eukaryotic Cells. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 4, p. 2659-2665, 2001.

GORDON, D. M.; CLERMONT, O.; TOLLEY, H.; DENAMUR, E. Assigning *Escherichia coli* strains to phylogenetic groups: multi-locus sequence typing versus the PCR triplex method. **Environmental Microbiology**, v. 10, n. 10, p. 2484-2496, 2008.

GRAHAM, J. E.; CLARK-CURTISS, J. E. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* RNAs synthesized in response to phagocytosis by human macrophages by selective capture of transcribed sequences (SCOTS). **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 20, p. 11554-11559, 1999.

GROSS, W. B. Diseases due to *Escherichia coli* in poultry. in *Escherichia coli* in domestic animals and humans. In: GYLES, C. L. (Ed.). ***Escherichia coli* in domestic animals and humans**. Wallingford: CAB International, 1994. p.237–259.

GYLES, C. L.; FAIRBROTHER, J. M. *Escherichia coli*. In: GYLES, C. L.; PRESCOTT, J. F., *et al* (Ed.). **Pathogenesis of bacterial infections in animals**. 4. New York: Wiley-Blackwell, 2010. p.267-308.

HARRY, E. G. H., L. A. The relationship between environmental contamination with septicaemia strains of *Escherichia coli* and their incidence in chickens. **Veterinary Record**, v. 77, p. 4, 1965a.

_____. The association between the presence of septicaemia strains of *Escherichia coli* in the respiratory and intestinal tracts of chickens and the occurrence of *coli* septicaemia. **Veterinary Record**, v. 77, p. 5, 1965b.

HENSEL, M.; SHEA, J.; GLEESON, C.; JONES, M.; DALTON, E.; HOLDEN, D. Simultaneous identification of bacterial virulence genes by negative selection. **Science**, v. 269, n. 5222, p. 400-403, 1995.

HERZER, P. J.; INOUE, S.; INOUE, M.; WHITTAM, T. S. Phylogenetic distribution of branched RNA-linked multicopy single-stranded DNA among natural isolates of *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 172, n. 11, p. 6175-6181, 1990.

JANßEN, T.; SCHWARZ, C.; PREIKSCHAT, P.; VOSS, M.; PHILIPP, H.-C.; WIELER, L. H. Virulence-associated genes in avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from internal organs of poultry having died from colibacillosis. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 291, n. 5, p. 371-378, 2001.

JOHNSON, J. R.; JOHNSTON, B.; CLABOTS, C. R.; KUSKOWSKI, M. A.; ROBERTS, E.; DEBROY, C. Virulence Genotypes and Phylogenetic Background of *Escherichia coli*

Serogroup O6 Isolates from Humans, Dogs, and Cats. **J. Clin. Microbiol.**, v. 46, n. 2, p. 417-422, 2008a.

JOHNSON, J. R.; MURRAY, A. C.; GAJEWSKI, A.; SULLIVAN, M.; SNIPPES, P.; KUSKOWSKI, M. A.; SMITH, K. E. Isolation and Molecular Characterization of Nalidixic Acid-Resistant Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* from Retail Chicken Products. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 7, p. 2161-2168, 2003.

JOHNSON, J. R.; STELL, A. L. Extended Virulence Genotypes of *Escherichia coli* Strains from Patients with Urosepsis in Relation to Phylogeny and Host Compromise. **Journal of Infectious Diseases**, v. 181, n. 1, p. 261-272, 2000.

JOHNSON, T. J.; GIDDINGS, C. W.; HORNE, S. M.; GIBBS, P. S.; WOOLEY, R. E.; SKYBERG, J.; OLAH, P.; KERCHER, R.; SHERWOOD, J. S.; FOLEY, S. L.; NOLAN, L. K. Location of Increased Serum Survival Gene and Selected Virulence Traits on a Conjugative R Plasmid in an Avian *Escherichia coli* Isolate. **Avian Diseases**, v. 46, n. 2, p. 342-352, 2002.

JOHNSON, T. J.; SIEK, K. E.; JOHNSON, S. J.; NOLAN, L. K. DNA Sequence of a ColV Plasmid and Prevalence of Selected Plasmid-Encoded Virulence Genes among Avian *Escherichia coli* Strains. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 2, p. 745-758, 2006.

JOHNSON, T. J.; WANNEMUEHLER, Y.; DOETKOTT, C.; JOHNSON, S. J.; ROSENBERGER, S. C.; NOLAN, L. K. Identification of Minimal Predictors of Avian Pathogenic *Escherichia coli* Virulence for Use as a Rapid Diagnostic Tool. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 12, p. 3987-3996, 2008b.

JOHNSON, T. J.; WANNEMUEHLER, Y.; DOETKOTT, C.; JOHNSON, S. J.; ROSENBERGER, S. C.; NOLAN, L. K. Identification of minimal predictors of avian pathogenic *Escherichia coli* virulence for use as a rapid diagnostic tool. **J Clin Microbiol**, v. 46, n. 12, p. 3987-96, 2008c.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 123-140, 2004.

KARIYAWASAM, S.; JOHNSON, T. J.; NOLAN, L. K. The pap Operon of Avian Pathogenic *Escherichia coli* Strain O1:K1 Is Located on a Novel Pathogenicity Island. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 1, p. 744-749, 2006.

KAWANO, A.; SHIMODA, S.; KAMIHIRA, T.; ISHIKAWA, F.; NIRO, H.; SOEJIMA, Y.; TAKETOMI, A.; MAEHARA, Y.; NAKAMURA, M.; KOMORI, A.; MIGITA, K.; ISHIBASHI, H.; AZUMA, M.; GERSHWIN, M. E.; HARADA, M. Peripheral Tolerance and the Qualitative Characteristics of Autoreactive T Cell Clones in Primary Biliary Cirrhosis. **The Journal of Immunology**, v. 179, n. 5, p. 3315-3324, 2007.

KELLER, R. Afa, a Diffuse Adherence Fibrillar Adhesin Associated with Enteropathogenic *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 5, p. 2681-2689, 2002.

KNÖBL, T.; BACCARO, M. R.; MORENO, A. M.; GOMES, T. A. T.; VIEIRA, M. A. M.; FERREIRA, C. S. A.; FERREIRA, A. J. P. Virulence properties of *Escherichia coli* isolated from ostriches with respiratory disease. **Veterinary Microbiology**, v. 83, n. 1, p. 71-80, 2001.

KNÖBL, T.; GOMES, T. A. T.; VIEIRA, M. A. M.; BOTTINO, J. A.; FERREIRA, A. J. P. Occurrence of adhesin-encoding operons in *Escherichia coli* isolated from breeders with salpingitis and chicks with omphalitis. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 140-143, 2006.

KOSTAKIOTI, M.; STATHOPOULOS, C. Functional Analysis of the Tsh Autotransporter from an Avian Pathogenic *Escherichia coli* Strain. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 10, p. 5548-5554, 2004.

LA RAGIONE, R. M.; COLLIGHAN, R. J.; WOODWARD, M. J. Non-curlation of *Escherichia coli* O78:K80 isolates associated with IS1 insertion in *csgB* and reduced persistence in poultry infection. **FEMS Microbiology Letters**, v. 175, n. 2, p. 247-253, 1999.

LA RAGIONE, R. M.; COOLEY, W. A.; WOODWARD, M. J. The role of fimbriae and flagella in the adherence of avian strains of *Escherichia coli* O78:K80 to tissue culture cells and tracheal and gut explants. **Journal of Medical Microbiology**, v. 49, n. 4, p. 327-338, 2000.

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

LEIMAN, P. G.; BASLER, M.; RAMAGOPAL, U. A.; BONANNO, J. B.; SAUDER, J. M.; PUKATZKI, S.; BURLEY, S. K.; ALMO, S. C.; MEKALANOS, J. J. Type VI secretion apparatus and phage tail-associated protein complexes share a common evolutionary origin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 11, p. 4154-4159, 2009.

LYNNE, A. M.; SKYBERG, J. A.; LOGUE, C. M.; DOETKOTT, C.; FOLEY, S. L.; NOLAN, L. K. Characterization of a Series of Transconjugant Mutants of an Avian Pathogenic *Escherichia coli* Isolate for Resistance to Serum Complement. **Avian Diseases**, v. 51, n. 3, p. 771-776, 2007.

MAHAN, M.; SLAUCH, J.; MEKALANOS, J. Selection of bacterial virulence genes that are specifically induced in host tissues. **Science**, v. 259, n. 5095, p. 686-8, 1993.

MARC, D.; ARNÉ, P.; BRÉE, A.; DHO-MOULIN, M. Colonization ability and pathogenic properties of a fim⁻ mutant of an avian strain of *Escherichia coli*. **Research in Microbiology**, v. 149, n. 7, p. 473-485, 1998.

MATURANA, V. G.; PACE, F. D.; CARLOS, C.; PIRES, M. M.; CAMPOS, T. A. D.; NAKAZATO, G.; STHELING, E. G.; LOGUE, C. M.; NOLAN, L. K.; SILVEIRA, W. D. D. Subpathotypes of Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC) Exist as Defined by their Syndromes and Virulence Traits. **Open Microbiol Journal**, v. 5, p. 55-64, 2011.

MAURER, J. J.; BROWN, T. P.; STEFFENS, W. L.; THAYER, S. G. The Occurrence of Ambient Temperature-Regulated Adhesins, Curli, and the Temperature-Sensitive Hemagglutinin Tsh among Avian *Escherichia coli*. **Avian Diseases**, v. 42, n. 1, p. 106-118, 1998.

MCPEAKE, S. J. W.; SMYTH, J. A.; BALL, H. J. Characterisation of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) associated with colisepticaemia compared to faecal isolates from healthy birds. **Veterinary Microbiology**, v. 110, n. 3-4, p. 245-253, 2005.

MELLATA, M.; DHO-MOULIN, M.; DOZOIS, C. M.; CURTISS III, R.; BROWN, P. K.; ARNÉ, P.; BRÉE, A.; DESAUTELS, C.; FAIRBROTHER, J. M. Role of Virulence Factors in Resistance of Avian Pathogenic *Escherichia coli* to Serum and in Pathogenicity. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 1, p. 536-540, 2003.

MOL, O.; OUDEGA, B. Molecular and structural aspects of fimbriae biosynthesis and assembly in *Escherichia coli*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 19, n. 1, p. 25-52, 1996.

MONROY, M. A. R. **Fatores de patogenicidade de *Escherichia coli* isolada de *Gallus gallus* (Linnaeus, 1758) com salpingite.** 1992. (Mestrado). Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade de São Paulo, São Paulo.

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

MOUGOUS, J. D.; CUFF, M. E.; RAUNSER, S.; SHEN, A.; ZHOU, M.; GIFFORD, C. A.; GOODMAN, A. L.; JOACHIMIAK, G.; ORDOÑEZ, C. L.; LORY, S.; WALZ, T.; JOACHIMIAK, A.; MEKALANOS, J. J. A Virulence Locus of *Pseudomonas aeruginosa* Encodes a Protein Secretion Apparatus. **Science**, v. 312, n. 5779, p. 1526-1530, 2006.

MOULIN-SCHOULEUR, M.; RÉPÉRANT, M.; LAURENT, S.; BRÉE, A.; MIGNON-GRASTEAU, S.; GERMON, P.; RASSCHAERT, D.; SCHOULER, C. Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* Strains of Avian and Human Origin: Link between Phylogenetic Relationships and Common Virulence Patterns. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 10, p. 3366-3376, 2007.

MOULIN-SCHOULEUR, M.; SCHOULER, C.; TAILLIEZ, P.; KAO, M.; BREE, 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**, v. 44, n. 10, p. 3484 - 3492, 2006.

MOURA, A. C. D.; IRINO, K.; VIDOTTO, M. C. Genetic Variability of Avian *Escherichia coli* Strains Evaluated by Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus and Repetitive Extragenic Palindromic Polymerase Chain Reaction. **Avian Diseases**, v. 45, n. 1, p. 173-181, 2001.

NAKAZATO, G.; DE CAMPOS, T. A.; LAGO, J. C.; BROCCHI, M.; DE CASTRO, A. F. P.; STEHLING, E. G.; SILVEIRA, W. D. Study of the adhesion and invasion capacities of an invasive avian pathogenic *Escherichia coli* strain (APEC) to in vitro cultivated HEp-2 cells. **Braz J Morphol Scs**, v. 24, n. 1, p. 1-10, 2007.

NATARO, J.; KAPER, J. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clin Microbiol Rev**, v. 11, n. 1, p. 142 - 201, 1998.

NGELEKA, M.; BRERETON, L.; BROWN, G.; FAIRBROTHER, J. M. Pathotypes of Avian *Escherichia coli* as Related to tsh-, pap-, pil-, and iuc-DNA Sequences, and Antibiotic Sensitivity of Isolates from Internal Tissues and the Cloacae of Broilers. **Avian Diseases**, v. 46, n. 1, p. 143-152, 2002.

NOLAN, L. K.; HORNE, S. M.; GIDDINGS, C. W.; FOLEY, S. L.; JOHNSON, T. J.; LYNNE, A. M.; SKYBERG, J. Resistance to Serum Complement, iss, and Virulence of Avian *Escherichia coli*. **Veterinary Research Communications**, v. 27, n. 2, p. 101-110, 2003.

NORTON, R. A.; MACKLIN, K. S.; MCMURTREY, B. L. Evaluation of Scratches as an Essential Element in the Development of Avian Cellulitis in Broiler Chickens. **Avian Diseases**, v. 43, n. 2, p. 320-325, 1999.

OKEKE, I. N.; SCALETSKY, I. C. A.; SOARS, E. H.; MACFARLANE, L. R.; TORRES, A. G. Molecular Epidemiology of the Iron Utilization Genes of Enteroaggregative *Escherichia coli*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 1, p. 36-44, 2004.

OLSEN, A.; ARNQVIST, A.; HAMMAR, M.; NORMARK, S. Environmental regulation of curli production in *Escherichia coli*. **Infectious Agents and Disease**, v. 2, n. 4, p. 272-4, 1993.

OLSEN, R. H.; CHRISTENSEN, H.; BISGAARD, M. Comparative genomics of multiple plasmids from APEC associated with clonal outbreaks demonstrates major similarities and identifies several potential vaccine-targets. **Veterinary Microbiology**, v. 158, n. 3-4, p. 384-393, 2012.

ORNDORFF, P.; FALKOW, S. Organization and expression of genes responsible for type 1 piliation in *Escherichia coli*. **J Bacteriol**, v. 159, n. 2, p. 736 - 744, 1984.

PARREIRA, V. R.; GYLES, C. L. Shiga toxin genes in avian Escherichia coli. **Veterinary Microbiology**, v. 87, n. 4, p. 341-352, 2002.

_____. A Novel Pathogenicity Island Integrated Adjacent to the thrW tRNA Gene of Avian Pathogenic Escherichia coli Encodes a Vacuolating Autotransporter Toxin. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 9, p. 5087-5096, 2003.

PARREIRA, V. R.; YANO, T. Cytotoxin produced by Escherichia coli isolated from chickens with swollen head syndrome (SHS). **Veterinary Microbiology**, v. 62, n. 2, p. 111-119, 1998.

PFAFF-MCDONOUGH, S. J.; HORNE, S. M.; GIDDINGS, C. W.; EBERT, J. O.; DOETKOTT, C.; SMITH, M. H.; NOLAN, L. K. Complement Resistance-Related Traits among Escherichia coli Isolates from Apparently Healthy Birds and Birds with Colibacillosis. **Avian Diseases**, v. 44, n. 1, p. 23-33, 2000.

POURBAKHS, S. A.; DHO-MOULIN, M.; BRÉE, A.; DESAUTELS, C.; MARTINEAU-DOIZE, B.; FAIRBROTHER, J. M. Localization of the in vivo expression of P and F1 fimbriae in chickens experimentally inoculated with pathogenic Escherichia coli. **Microbial Pathogenesis**, v. 22, n. 6, p. 331-341, 1997.

PROVENCE, D. L.; CURTISS, R. Isolation and characterization of a gene involved in hemagglutination by an avian pathogenic Escherichia coli strain. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 4, p. 1369-1380, 1994.

PUKATZKI, S.; MA, A. T.; REVEL, A. T.; STURTEVANT, D.; MEKALANOS, J. J. Type VI secretion system translocates a phage tail spike-like protein into target cells where it cross-links actin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 39, p. 15508-15513, 2007.

PUKATZKI, S.; MA, A. T.; STURTEVANT, D.; KRASINS, B.; SARRACINO, D.; NELSON, W. C.; HEIDELBERG, J. F.; MEKALANOS, J. J. Identification of a conserved bacterial protein secretion system in Vibrio cholerae using the Dictyostelium host model system. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 5, p. 1528-1533, 2006.

RATLEDGE, C.; DOVER, L. G. IRON METABOLISM IN PATHOGENIC BACTERIA. **Annual Review of Microbiology**, v. 54, n. 1, p. 881-941, 2000.

RESTIERI, C.; GARRISS, G.; LOCAS, M.-C.; DOZOIS, C. M. Autotransporter-Encoding Sequences Are Phylogenetically Distributed among Escherichia coli Clinical Isolates and Reference Strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 5, p. 1553-1562, 2007.

RODRIGUEZ-SIEK, K. E.; GIDDINGS, C. W.; DOETKOTT, C.; JOHNSON, T. J.; NOLAN, L. K. Characterizing the APEC pathotype. **Veterinary Research**, v. 36, n. 2, p. 241-256, 2005.

ROSENBERGER, J. K.; FRIES, P. A.; CLOUD, S. S.; WILSON, R. A. In vitro and in vivo Characterization of Avian *Escherichia coli*. II. Factors Associated with Pathogenicity. **Avian Diseases**, v. 29, n. 4, p. 1094-1107, 1985.

SABRI, M.; CAZA, M.; PROULX, J.; LYMBEROPOULOS, M. H.; BRÉE, A.; MOULIN-SCHOULEUR, M.; CURTISS, R.; DOZOIS, C. M. Contribution of the SitABCD, MntH, and FeoB Metal Transporters to the Virulence of Avian Pathogenic *Escherichia coli* O78 Strain χ 7122. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 2, p. 601-611, 2008.

SABRI, M.; LÉVEILLÉ, S.; DOZOIS, C. M. A SitABCD homologue from an avian pathogenic *Escherichia coli* strain mediates transport of iron and manganese and resistance to hydrogen peroxide. **Microbiology**, v. 152, n. 3, p. 745-758, 2006.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A laboratory Manual**. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Press, 1989.

SAUER, F. G.; MULVEY, M. A.; SCHILLING, J. D.; MARTINEZ, J. J.; HULTGREN, S. J. Bacterial pili: molecular mechanisms of pathogenesis. **Current Opinion in Microbiology**, v. 3, n. 1, p. 65-72, 2000.

SCHMIDT, H.; ZHANG, W.-L.; HEMMRICH, U.; JELACIC, S.; BRUNDER, W.; TARR, P. I.; DOBRINDT, U.; HACKER, J.; KARCH, H. Identification and characterization of a novel genomic island integrated at *selC* in Locus of Enterocyte Effacement-negative, Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 11, p. 6863-6873, 2001.

SCHOULER, C.; SCHAEFFER, B.; BREE, A.; MORA, A.; DAHBI, G.; BIET, F.; OSWALD, E.; MAINIL, J.; BLANCO, J.; MOULIN-SCHOULEUR, M. Diagnostic strategy for identifying avian pathogenic *Escherichia coli* based on four patterns of virulence genes. **J Clin Microbiol**, v. 50, n. 5, p. 1673-8, 2012.

SCHUBERT, S.; PICARD, B.; GOURIOU, S.; HEESEMANN, J.; DENAMUR, E. Yersinia High-Pathogenicity Island Contributes to Virulence in *Escherichia coli* Causing Extraintestinal Infections. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 9, p. 5335-5337, 2002.

SELANDER, R. K.; CAUGANT, D. A.; WHITTAM, T. S. Genetic structure and variation in natural populations of *Escherichia coli*. In: NEIDGART, F. C.; INGRAHAM, J. L., *et al* (Ed.). ***Escherichia coli* and *Salmonella* Typhimurium: cellular and molecular biology**. Washington: American Society for Microbiology, 1987.

SHRIVASTAVA, S.; MANDE, S. S. Identification and Functional Characterization of Gene Components of Type VI Secretion System in Bacterial Genomes. **PLoS ONE**, v. 3, n. 8, p. e2955, 2008.

SILVA, G. M. **Estudo dos fatores de patogenicidade e origens de amostras de *Escherichia coli* isoladas de pintos com um dia de idade (*Gallus gallus*, LINNAEUS, 1758) apresentando um quadro de onfalite.** 1993. (Doutorado). Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade de São Paulo, São Paulo.

SILVEIRA, W. D.; FERREIRA, A.; LANCELLOTTI, M.; BARBOSA, I. A. G. C. D.; LEITE, D. S.; DE CASTRO, A. F. P.; BROCCHI, M. Clonal relationships among avian *Escherichia coli* isolates determined by enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC)-PCR. **Veterinary Microbiology**, v. 89, n. 4, p. 323-328, 2002.

SILVEIRA, W. D.; REIS, E. R.; ARNS, C. W.; SIRCILI, M. P.; FANTINATTI, F.; BROCCHI, M. Possible involvement of an outer membrane protein in the pathogenicity of a chicken septicemic *Escherichia coli* isolate. **Revista de Microbiologia**, v. 29, p. 113-117, 1998.

SINGER, R. S.; JEFFREY, J. S.; CARPENTER, T. E.; COOKE, C. L.; ATWILL, E. R.; JOHNSON, W. O.; HIRSH, D. C. Persistence of cellulitis-associated *Escherichia coli* DNA fingerprints in successive broiler chicken flocks. **Veterinary Microbiology**, v. 75, n. 1, p. 59-71, 2000.

SKYBERG, J. A.; HORNE, S. M.; GIDDINGS, C. W.; WOOLEY, R. E.; GIBBS, P. S.; NOLAN, L. K. Characterizing Avian *Escherichia coli* Isolates with Multiplex Polymerase Chain Reaction. **Avian Diseases**, v. 47, n. 4, p. 1441-1447, 2003.

SKYBERG, J. A.; JOHNSON, T. J.; JOHNSON, J. R.; CLABOTS, C.; LOGUE, C. M.; NOLAN, L. K. Acquisition of Avian Pathogenic *Escherichia coli* Plasmids by a Commensal *E. coli* Isolate Enhances Its Abilities To Kill Chicken Embryos, Grow in Human Urine, and Colonize the Murine Kidney. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 11, p. 6287-6292, 2006.

SMITH, J. L.; FRATAMICO, P. M.; GUNTHER, N. W. Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 4, n. 2, p. 134-163, 2007.

SOJKA, W. J.; CARNAGHAN, R. B. A. *Escherichia coli* infection in poultry. **Res Vet Sci**, v. 2, p. 340-352, 1961.

SORSA, L. J.; DUFKE, S.; HEESEMANN, J.; SCHUBERT, S. Characterization of an iroBCDEN Gene Cluster on a Transmissible Plasmid of Uropathogenic *Escherichia coli*: Evidence for Horizontal Transfer of a Chromosomal Virulence Factor. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 6, p. 3285-3293, 2003.

STATHOPOULOS, C.; PROVENCE, D. L.; CURTISS, R. Characterization of the Avian Pathogenic *Escherichia coli* Hemagglutinin Tsh, a Member of the Immunoglobulin A Protease-Type Family of Autotransporters. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 2, p. 772-781, 1999.

STEHLLING, E. G.; CAMPOS, T. A.; BROCCCHI, M.; DE CARVALHO AZEVEDO, V. A.; DA SILVEIRA, W. D. The expression of plasmid mediated afimbrial adhesin genes in an avian septicemic *Escherichia coli* strain. **Journal of Veterinary Science**, v. 9, n. 1, p. 75-83, 2008.

STEHLLING, E. G.; CAMPOS, T. A. D.; FERREIRA, A.; SILVEIRA, W. D. D. Adhesion and Invasion Characteristics of a Septicaemic Avian *Escherichia coli* Strain Are Plasmid Mediated. **The International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine**, v. 1, p. 27-36, 2003a.

STEHLLING, E. G.; YANO, T.; BROCCCHI, M.; DA SILVEIRA, W. D. Characterization of a plasmid-encoded adhesin of an avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) strain isolated from a case of swollen head syndrome (SHS). **Veterinary Microbiology**, v. 95, n. 1-2, p. 111-120, 2003b.

STORDEUR, P.; MARLIER, D.; BLANCO, J.; OSWALD, E.; BIET, F.; DHO-MOULIN, M.; MAINIL, J. Examination of *Escherichia coli* from poultry for selected adhesin genes important in disease caused by mammalian pathogenic *E. coli*. **Veterinary Microbiology**, v. 84, n. 3, p. 231-241, 2002.

SUAREZ, G.; SIERRA, J. C.; SHA, J.; WANG, S.; EROVA, T. E.; FADL, A. A.; FOLTZ, S. M.; HORNEMAN, A. J.; CHOPRA, A. K. Molecular characterization of a functional type VI secretion system from a clinical isolate of *Aeromonas hydrophila*. **Microbial Pathogenesis**, v. 44, n. 4, p. 344-361, 2008.

SZALO, I. M.; GOFFAUX, F.; PIRSON, V.; PIÉRARD, D.; BALL, H.; MAINIL, J. Presence in bovine enteropathogenic (EPEC) and enterohaemorrhagic (EHEC) *Escherichia coli* of genes encoding for putative adhesins of human EHEC strains. **Research in Microbiology**, v. 153, n. 10, p. 653-658, 2002.

TARR, P. I.; BILGE, S. S.; VARY, J. C.; JELACIC, S.; HABEEB, R. L.; WARD, T. R.; BAYLOR, M. R.; BESSER, T. E. Iha: a Novel *Escherichia coli* O157:H7 Adherence-Conferring Molecule Encoded on a Recently Acquired Chromosomal Island of Conserved Structure. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 3, p. 1400-1407, 2000.

TOMA, C.; MARTINEZ, E.; SONG, T.; MILIWEBSKY, E.; CHINEN, I.; IYODA, S.; IWANAGA, M.; RIVAS, M. Distribution of putative adhesins in different seropathotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 11, p. 4937 - 4946, 2004.

UBABEF. Relatório anual UBABEF 2012. Campinas, p. 57, 2012. Disponível em: < <http://www.abef.com.br/ubabef/exibenoticiaubabef.php?notcodigo=3293> >. Acesso em: 02/05/2013.

VALDIVIA, R. H.; FALKOW, S. Fluorescence-Based Isolation of Bacterial Genes Expressed Within Host Cells. **Science**, v. 277, n. 5334, p. 2007-2011, 1997.

VIDOTTO, M.; CAÇÃO, J.; GOES, C.; SANTOS, D. Plasmid coding for aerobactin production and drug resistance is involved in virulence of *Escherichia coli* avian strains. **Braz J Med Biol Res**, v. 24, n. 7, p. 677-85, 1991.

VIDOTTO, M. C.; MÜLLER, E. E.; FREITAS, J. C. D.; ALFIERI, A. A.; GUIMARÃES, I. G.; SANTOS, D. S. Virulence Factors of Avian *Escherichia coli*. **Avian Diseases**, v. 34, n. 3, p. 531-538, 1990.

VOKES, S. A.; REEVES, S. A.; TORRES, A. G.; PAYNE, S. M. The aerobactin iron transport system genes in *Shigella flexneri* are present within a pathogenicity island. **Molecular Microbiology**, v. 33, n. 1, p. 63-73, 1999.

WANG, S.; SHI, Z.; XIA, Y.; LI, H.; KOU, Y.; BAO, Y.; DAI, J.; LU, C. IbeB is involved in the invasion and pathogenicity of avian pathogenic *Escherichia coli*. **Veterinary Microbiology**, v. 159, n. 3-4, p. 411-419, 2012.

WATT, S.; LANOTTE, P.; MEREGHETTI, L.; MOULIN-SCHOULEUR, M.; PICARD, B.; QUENTIN, R. *Escherichia coli* Strains from Pregnant Women and Neonates: Intraspecies Genetic Distribution and Prevalence of Virulence Factors. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 5, p. 1929-1935, 2003.

WOOLEY, R. E.; GIBBS, P. S.; BROWN, T. P.; GLISSON, J. R.; STEFFENS, W. L.; MAURER, J. J. Colonization of the Chicken Trachea by an Avirulent Avian *Escherichia coli* Transformed with Plasmid pHK11. **Avian Diseases**, v. 42, n. 1, p. 194-198, 1998.

WOOLEY, R. E.; SPEARS, K. R.; BROWN, J.; NOLAN, L. K.; FLETCHER, O. J. Relationship of Complement Resistance and Selected Virulence Factors in Pathogenic Avian *Escherichia coli*. **Avian Diseases**, v. 36, n. 3, p. 679-684, 1992.

YAGUCHI, K.; OGITANI, T.; OSAWA, R.; KAWANO, M.; KOKUMAI, N.; KANESHIGE, T.; NORO, T.; MASUBUCHI, K.; SHIMIZU, Y. Virulence Factors of Avian Pathogenic *Escherichia coli* Strains Isolated from Chickens with Colisepticemia in Japan. **Avian Diseases**, v. 51, n. 3, p. 656-662, 2007.

YE, C.; XU, J. Prevalence of Iron Transport Gene on Pathogenicity-Associated Island of Uropathogenic *Escherichia coli* in *E. coli* O157:H7 Containing Shiga Toxin Gene. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 6, p. 2300-2305, 2001.

ZHAO, L.; GAO, S.; HUAN, H.; XU, X.; ZHU, X.; YANG, W.; GAO, Q.; LIU, X. Comparison of virulence factors and expression of specific genes between uropathogenic *Escherichia coli* and avian pathogenic *E. coli* in a murine urinary tract infection model and a chicken challenge model. **Microbiology**, v. 155, n. 5, p. 1634-1644, 2009.

ZHENG, J.; LEUNG, K. Y. Dissection of a type VI secretion system in *Edwardsiella tarda*. **Molecular Microbiology**, v. 66, n. 5, p. 1192-1206, 2007.