JULIANA YURI SAVIOLLI

Pesquisa e Caracterização de *Escherichia coli* patogênica (*E.coli* produtora de toxina Shiga – STEC; *E.coli* aviária patogênica – APEC) de fragatas (*Fregata magnificens*) da Costa do Estado de São Paulo

São Paulo
2010

JULIANA YURI SAVIOLLI

Pesquisa e caracterização de *Escherichia coli* patogênica (*E. coli* produtora de toxina Shiga – STEC; *E. coli* aviária patogênica - APEC) de fragatas (*Fregata magnificens*) da Costa do Estado de São Paulo

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Patologia

Área de Concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientador:

Prof. Dr. José Luiz Catão-Dias

São Paulo

2010

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2235
FMVZ

Saviolli, Juliana Yuri
Pesquisa e caracterização de *Escherichia coli* patogênica (*E. coli* produtora de toxina Shiga – STEC; *E. coli* aviária patogênica - APEC) de fragatas (*Fregata magnificens*) da Costa do Estado de São Paulo / Juliana Yuri Saviolli. -- 2010.
83 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2010.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.
Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Prof. Dr. José Luiz Catão-Dias.

1. *Escherichia coli*. 2. *Fregata magnificens*. 3. ExPEC. 4. STEC. 5. APEC. 6. Colibacilose. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Pesquisa e caracterização de *Escherichia coli* patogênica (E. coli produtora de toxina Shiga - STEC; E. coli aviária patogênica - APEC) de fragatas (*Fregata magnificens*) da Costa Sudeste Brasileira", protocolado sob o nº1368/2008, utilizando 45 (quarenta e cinco) fragatas, sob a responsabilidade do Prof. Dr. José Luiz Catão Dias, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendum".

(We certify that the Research "Research and characterization of *Escherichia coli* Pathogenic (E. coli productor of Shiga toxin - STEC; E. coli pathogenic avian - APEC) of Frigatebird (*Fregata magnificens*) of Brazilian Southwest Coat", protocol number 1368/2008, utilizing 45 (forty five) fragatas, under the responsibility Prof. Dr. José Luiz Catão Dias, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendum" meeting).

São Paulo, 27 de maio de 2008

Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Univrsitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fone/Fax: +55 11 3032-2224 / 3091-7757
+ 55 11 3091-7671/7676
E-mail: fmvz@usp.br
http://www.fmvz.usp.br

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: SAVIOLLI, Juliana Yuri

Título: Pesquisa e caracterização de *Escherichia coli* patogênica (*E. coli* produtora de toxina Shiga – STEC; *E. coli* aviária patogênica - APEC) de fragatas (*Fregata magnificens*) da Costa do Estado de São Paulo

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ___/___/____

Banca Examinadora

Prof. Dr._____ Instituição:_____

Julgamento:_____ Assinatura:_____

Prof. Dr._____ Instituição:_____

Julgamento:_____ Assinatura:_____

Prof. Dr._____ Instituição:_____

Julgamento:_____ Assinatura:_____

DEDICATÓRIA

À minha família linda: “PAizinho”, “MAmis JApa”, “Dandan” e RAel”! Sempre me ajudam muito e me apóiam em TUDO! Ao “LAn” que me devolveu vida e felicidade pra poder voltar a “voar”!!! E aos meus companheiros animais que me acompanharam nesta vida de mestrado me dando carinho a FORÇA pra continuar...!!!

AMO VOCÊS !!!!

AGRADECIMENTOS

Preparem-se são muitos!!! Agradeço MUITO a todos que estarão neste capitulo!
Minha família...sempre presente, muito feliz e confortável, nunca deixaram de me apoiar em cada passo...sem palavras por tudo que fazem por mim!
Paizinho que nunca deixou de acreditar nas minhas maluquices, e melhor do que todos podem imaginar, ainda me ajudava nas colheitas, me colocou no mundo marinho....me fez comer pirão e ostra quando era pequena....dai só podia sair a louca aqui!
Mamissss Japonesa!!! Você é uma figura!!! A gente se ama tanto que quase se mata! Mas me ajuda muito viu Japonesa...e sei q não é fácil ser minha mãe!
Irmãos lindos, caramba! Como são lindos meus irmãos! Dan Dan e Rael, vocês são terríveis! Obrigada por existirem em minha vida!
Tios e avós mesmo *in memorian* fazem parte de minha família e dos meus agradecimentos.
Catão e Vânia...são os orientadores mais especiais do mundo. Pessoas lindas, que me ensinaram tanto e que espero poder continuar aprendendo vocês. Cada dia ao lado de vocês dois me fez perceber como tudo é melhor!!!
Faustão...depois do meu pai, você foi o maluco que me fez aprender a amar muito o mar e as aves...e tudo que sei hoje fazer é culpa sua...rs
Não posso me esquecer da Patrícia Faria, que também me ensinou a coletar as amostras das aves.
Faustinho querido, graças a tua habilidade temos a amostragem deste trabalho. “Cabra-macho”! Vai ser difícil ir para o mar sem você. Como você disse uma vez: - Somos parceiros!! Te respeito muito, é meu “brother”, sua segurança é fundamental no nosso trabalho.
Danilo, Joel e a galera da Trindade...obrigada pela assistência de vocês. Os desembarques, a busca pelas fragatas, e a nossa segurança é graças a vocês. Sempre prontos pra próxima, mateiros de primeira e mestres também.
As amigas “força bruta” Maria Carolina (Aleega), Vanessa Simão do Amaral (Vavá ou Vavuchi), Ana Paula Dornellas (Alita), Patrícia Oristanio (Patchú), Claudia Guimarães (Cuquita) – MALACOS Malocas mesmo as que não estiveram presente nas expedições das fragatas, são todas muito importantes pra mim, a vida no mar não ia ser tão divertida se não estivessem na nossa equipe. As que estiveram literalmente OBRIGADA! Ah...e obrigada Luiz Ricardo Simone (LUI) por ajudar na logística mandando suas pupilas ao mar com a gente, e me ensinando sobre as coisas moles que eu amo comer...rs chamadas moluscos! Outro malaco, bacanérrimo...Frank (Funk) pela ajuda na redação.
Cleide (Cleidoca), Suzana (Suzy) e Lika obrigada pela amizade, apoio, e todo o resto, foram imprescindíveis neste trabalho. Assim como todos do labs, Renata Iovine (REzinha), Laura Reisfield (Laurita), Ana Paula Kawakami (Aninha), Graziela Habib (Grazi), Maria Flavia (Flavicha), Thainá, Vanessa e as professoras Selene, Ana Flavia, Leoni, gente vocês são especiais, nunca vi um laboratório com tanta harmonia e boa energia, isso ajudou bastante. Conselhos, orientações, desbafos e compreensão também estão inclusos.
Marli Penteado, Osmar, Roberto e todos do Ibama Tupinambás, além de Julio Cardoso obrigada pelo apoio e carinho por Alcatrazes. Graças a vocês a maior parte deste trabalho foi realizada!

Julio Avelar, Julio Velardi, Daniele Paludo e Vicente (Vicentão) aprendi muito de mar com estas pessoas especiais. Outra parte da “força-bruta” de toda a equipe, pense em pessoas que põe a mão na massa e fazem acontecer!
Aos amigos do peito e muito deles tomo como ídolos por sua força, coragem, dedicação e mais que tudo PAIXÃO pelo que fazem, e que cada dia mais me surpreendo com o que aprendi com eles. Valeria Ruoppolo (Vali), Juliana Marigo (Ju), Tatiana Neves (Tati), Flavia Miranda (Flu), Julio Reynoso (Julito), Shiley Pacheco, Salvatore Sicciliano, Sandra Cuenca, Marina Galvão Bueno, Patrícia Coutinho, Katia Dejuste, Erica Pacífico, Ralph Vantreels e Caio Marques, tento me espelhar em um pouquinho ou um “poucão” de vocês! Aos que estiveram mais próximos de mim, agradeço por tudo que me ensinaram e pelas oportunidades que me deram! OBRIGADAAAAA de Verdade!!!!
A todos do VPT amigos e professores, obrigado pela força! Ricardo Garé que tanto me incentivou e ajudou a tomar a decisão de entrar no mestrado.
A Elza Faquim o meu muito obrigada pela força e atenção.
Aos amigos do dia-a-dia que me dão forças e sempre sempre estão ao meu lado, dando esporros ou carinhos, é assim que os amigos de verdade são! Du, Kéti, Márcia, Murilo, Roberta, Manu, Paty, Biba, Lucy, Oto, Dona Bety, Wiwi, Anderson (Pêra), Igor (Kbeça) e Mariana Ohata (Mari)...VALEUUU pela compreensão e por não me abandonarem em momentos tão difíceis que só vocês sabem que passei.
Aos outros amigos que me surpreenderam e fizeram eu aprender de uma forma dolorida o que é amizade de verdade, eu também agradeço, porque graças a isso eu soube dizer não e cortar coisas que não me faziam bem.
Meus amigos não humanos, que me dão carinho, alegria e mostram seus sentimentos da forma mais pura que já vi! Até os que passaram pouco tempo em minha vida: Brenda, Sushi, Inu, Samui, Guto, Mila, Torah e Pablito. Meus grandes companheiros!
Aos meus guias, sei que estão e estarão sempre comigo...Obrigada por me escolherem, e espero que entendam minha falha por alguns períodos.
Ilan, você me devolveu a Vida...de verdade...me faz rir, e me sentir muito especial, e se essa tese saiu, não desmerecendo as outras pessoas, mas você foi o grande incentivador e contribuidor para isso, e sabe disso...Veio no momento que mais precisava, de verdade como diz Carol, você deve ter muitos hematomas, porque deve ter caído de muito alto meu ANJO! Muito Obrigada! E obrigada por me dar outra família muito especial que são seus pais (Odair e Marly) e seus irmãos (GrA e Austen).
Espero não ter esquecido de ninguém, mas são tantas pessoas que estão ao meu lado, que não lembrar de alguma, pra mim seria um crime!
Sei que muitos acreditaram em mim, e outros achavam engraçado eu não querer ser uma veterinária como as outras, mas agradeço por me tentarem a superar limitações e mais importante de tudo a me superar! E acreditar que eu estava certa e era capaz!
O MEU MUITO OBRIGADA A TODOS!!!!
Ju Yuri

Buscar a paixão pelo que faz é a chave da vida.
Busque descobrir o trabalho que lhe dá paixão,
aí você encontrará também a paixão pela vida...
(Fernando Viana)

RESUMO

SAVIOLLI, J. Y. **Pesquisa e caracterização de *Escherichia coli* patogênica (*E. coli* produtora de toxina Shiga – STEC; *E. coli* aviária patogênica - APEC) de fragatas (*Fregata magnificens*) da Costa do Estado de São Paulo**. [Research and characterization of pathogenic *Escherichia coli* (*E. coli* Shiga toxin-producing - STEC, avian pathogenic *E. coli* - APEC) frigates (*Fregata magnificens*) Coast of São Paulo]. 2010. 83 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

O presente trabalho objetivou pesquisar e caracterizar *Escherichia coli* patogênica (*E. coli* produtora de toxina Shiga – STEC; *E. coli* aviária patogênica - APEC) em fragatas (*Fregata magnificens*) da costa do Estado de São Paulo e, desta forma, contribuir para a compreensão de aspectos epidemiológicos deste importante grupo de enfermidades zoonóticas bacterianas, as colibaciloses. Para tanto, foram realizadas três expedições científicas aos dois sítios de nidificação de fragatas no estado de São Paulo, Ilha Principal do Arquipélago de Alcatrazes (24°06´S – 45°41´W) e Ilha de Castilho (25°16´S – 47°57´W), nas quais foi colhido um total de 42 amostras de “swabs”, sendo 21 cloacais e 21 de coanas, oriundos de 18 filhotes de sexo indeterminado, 2 fêmeas adultas e 1 macho adulto de fragatas. Das 42 amostras clinicas estudadas, foram identificadas 18 com crescimento de *E.coli*. Destas, foram isoladas 67 cepas, que foram então submetidas à pesquisa de genes de virulência e caracterização de grupos filogenéticos através da técnica de PCR. Em seguida, as cepas que exibiram fatores de virulência foram analisadas através de sorotipagem. Para investigar os padrões de resistência e sensibilidade a antimicrobianos, foram realizados antibiogramas para 18 tipos distintos de antimicrobianos para uma cepa de cada amostra selecionada de *E. coli*. Os resultados alcançados mostraram que foi possível identificar 15 diferentes perfis de virulência, com positividade para os seguintes genes: *fimH* (98,3%), *malX* (52,4%), *traT (*31,1%), *cvaC* (22,9%), *fyuA* (19,6%), *ibeA* (19,6%), *aer* (13,1%) e *papC* (13,1%). A maioria dos isolados de fragatas foi caracterizado entre os grupos filogenéticos D e B2, e os principais sorotipos encontrados foram O1:H6, O2:H7, O25:H4, e O102:H10. Em relação à resistência a antimicrobianos, 60,1%% dos isolados foram sensível aos 18 diferentes antimicrobianos testados; por outro lado, o antimicrobiano que apresentou maior resistência foi a Tetraciclina, que se revelou inefetiva em 20,1% das amostras pesquisados. Até o momento não foram

identificadas cepas de STEC nos indivíduos pesquisados; por outro lado, os isolados albergam genes que caracterizam as ExPEC. Tais resultados mostram que a maioria das cepas isoladas é potencialmente patogênica para as aves, podendo representar significativo risco para sanidade das aves marinhas, além de se configurar como agentes zoonóticos relevantes, enfatizando a importância de se investigar a eventual participação das aves selvagens, em especial as marinhas, na cadeia epidemiológica de doenças ocasionadas por *E. coli*. Tais informações poderão nortear as pesquisas de doenças selecionadas nas populações das fragatas, assim como embasar a adoção de eventuais ações em relação a aspectos de saúde animal e humana, que tenham as fragatas como um dos elos.

Palavras-chave: *Escherichia coli*. *Fregata magnificens.* ExPEC. STEC. APEC. Colibacilose.

ABSTRACT

SAVIOLLI, J. Y. **Research and characterization of pathogenic *Escherichia coli* (*E. coli* Shiga toxin-producing - STEC, avian pathogenic *E. coli* - APEC) frigates (*Fregata magnificens*) Coast of São Paulo**. [Pesquisa e caracterização de *Escherichia coli* patogênica (*E. coli* produtora de toxina Shiga – STEC; *E. coli* aviária patogênica - APEC) de fragatas (*Fregata magnificens*) da Costa do Estado de São Paulo]. 2010. 83 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

The present study is to investigate and characterize pathogenic *Escherichia coli* (*E. coli* Shiga toxin-producing - STEC avian pathogenic *E. coli* - APEC) on frigates (*Fregata magnificens*) from the coast of São Paulo and contribute to the understanding of epidemiological aspects in this important group of zoonotic bacterial diseases, the colibacillosis. To this, there were three scientific expeditions to two nesting sites of frigates in the state of Sao Paulo, the main island of Alcatraz (24 ° 06'S - 45 ° 41'W) and Castilho´s island (25 ° 16'S - 47 ° 57'W), in which it was collected a total of 42 samples of swabs, and 21 cloacal and choanal 21, coming from 18 offspring of indeterminate sex, 2 adult females and 1 adult male frigate. Of the 42 clinical samples studied, 18 were identified with growth of *E.coli*. Of these, 67 strains were isolated, which were then tested for virulence genes and characterization of phylogenetic groups by PCR technique. Then the strains that exhibited virulence factors were analyzed by serotyping. To investigate the patterns of resistance and sensitivity to antimicrobial susceptibility tests were performed for 18 different types of antimicrobials for one strain of each selected sample of *E. coli*. The results showed that it was possible to identify 15 different profiles of virulence, tested positive for the following genes: *fimH* (98.3%), *malX* (52.4%) *traT* (31.1%), *cvaC* (22.9 %), *fyuA* (19.6%), *ibeA* (19.6%), *aer* (13.1%) and *papC* (13.1%). Most isolates of frigates was characterized between phylogenetic groups D and B2, and the main serotypes were O1:H6, O2:H7, O25:H4, and O102:H10. For resistance to antibiotics, 60.1%% of the isolates were sensitive to 18 different antimicrobial agents tested on the other hand, the antimicrobial with the highest resistance was to tetracycline, which has proved ineffective in 20.1% of the samples studied. So far not been identified in STEC strains studied subjects on the other hand, isolates harbor genes that characterize ExPEC. These results show that most of the strains are potentially

pathogenic to birds and may represent significant risk to health of sea birds, including how to configure agents relevant, emphasizing the importance of investigating the possible involvement of wild birds, especially navies in the epidemiological chain of diseases caused by *E.coli*. Such information could guide the research of selected diseases in populations of the frigates, as well as basing the adoption of any action in relation to aspects of animal and human health, which have the frigates as a link.

Keywords: *Escherichia coli. Fregata magnificens.* ExPEC. STEC. APEC. Colibacillosis.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

(Lac-)	colônias lactose negativa em ágar MacConkey
(Lac+)	colônias lactose positiva em Agar MacConkey
Ami	amicacina
Amo	amoxacilina
Amp	ampicilina
APEC	avian Pathogenic *E.coli*
BHI	Brain Heart Infusion
C. coli	*Campylobacter coli*
C. lari	*Campylobacter lari*
CEMAVE	Centro de Pesquisa para a Conservação de Aves Silvestres
Cfe	Cefalexina
Cfo	Cefoxitina
Cip	Ciprofloxacina
Clo	Cloranfenicol
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
Cm	Centímetros
Ctf	Ceftiofur
Ctx	Cefotaxima
DAEC	*E.coli* de aderência difusa
dNTP	desorribonuleotídeo trifosfatado
Dra.	Doutoura
E.coli	*Escherichia coli*
EAEC	*E.coli* enteroagregativa
EDAS	Electrophoresis Documentation and Analysis System
EHEC	Enterohaemorrhagic *E.coli*
EIEC	*E.coli* enteroinvasora
Eno	Enrofloxacina
EPEC	*E.coli* enteropatogênica
EPM	Escola Paulista de Medicina
ESEC	Estação Ecológica
Est	Estreptomicina
ETEC	*E.coli* enterotoxigênica
ExPEC	Extraintestinal Pathogenic *E.coli*
F. andrewsi	*Fregata andrewsi*
F. áquila	*Fregata aquila*
F. ariel	*Fregata ariel*
F. magnificens	*Fregata magnificens*
F. minor	*Fregata minor*
FV	Fator de Virulência
Gen	Gentamicina
HPI	High Pathogenicity Island
I	Resistência Intermediária
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
Ind.	Sexo Indeterminado
lesão A/E	Lesão *attaching and effacing*

MgCl2	Cloreto de Magnésio
MILi	Motilidade, Descaboxilação da lisina e Produção de Indol
Mili-Q	Millipore Corporation
MLEE	Multi-Locus Enzyme Electrophoresis
mM	Milimol
n°	Número
NE	Não enterobactéria
Neo	Neomicina
Nit	Nitrofurantoína
NMEC	*E.coli* causadora de meningite neonatal
Nor	Norfloxacina
NR	Não realizado
PAI	Pathogenicity Island – Ilha de patogenicidade
PCR	Polimerase Chain Reaction - Reação em Cadeia da Polimerase
pmol	Peso molar
Pol	Polimixina B
Profa.	Professora
qsp	Quantidade suficiente para
R	Resistente
s	Segundos
S	Sensível
SC	Sem crescimento de enterobactéria
SHU	Síndrome Hemolítica Urêmica
STEC	*E.coli* produtora de toxina de Shiga
Stx1	Toxina de Shiga 1
Stx2	Toxina de Shiga 2
Sut	Cotrimazol
Tab.	Tabela
Tet	Tetraciclina
u	Unidade
UC	Unidade de Conservação
UNIP	Universidade Paulista
UTI	Urinary Tract Infection - infecção no trato urinário
UV	Ultra violeta

LISTA DE SÍMBOLOS

%	porcento
+	positivo
-	negativo
°C	graus Celsius
µL	Microlitro

SUMÁRIO

1 **INTRODUÇÃO** 17
2 **OBJETIVOS** 19
3 **REVISÃO DE LITERATURA** 20
3.1 AVES MARINHAS INSULARES 20
3.1.1 Fragatas – *Fregata magnificens* 21
3.1.2 Ambientes insulares do sudeste do Brasil 22
3.2 *ESCHERICHIA COLI* 25
3.2.1 *Escherichia coli* produtora de toxina de Shiga – STEC 28
3.2.2 *Escherichia coli* Patogênica para Aves - APEC 29
4 **MATERIAL E MÉTODOS** 33
4.1 EXPEDIÇÕES PARA A COLHEITA DE MATERIAL 33
4.2 ANIMAIS E PROCEDIMENTOS DE CAPTURA E COLHEITA DE MATERIAL 33
4.3 PROCESSAMENTO MICROBIOLÓGICO 34
4.3.1 Isolamento e identificação bacterianas 34
4.4 ANTIBIOGRAMA 37
4.5 SOROTIPAGEM DAS AMOSTRAS DE *E.COLI* 37
4.6 CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DAS AMOSTRAS DE *E.COLI* 37
4.6.1 Pesquisa de fatores de virulência de *E.coli* 38
4.6.2 Eletroforese em gel 39
4.7 DETERMINAÇÃO DE GRUPOS FILOGENÉTICOS 41
5 **RESULTADOS** 43
5.1 DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS COLHIDAS 43
5.2 CRESCIMENTO BACTERIANO E ISOLAMENTO DE *ESCHERICHIA COLI* 43
5.3 PESQUISA DE MARCADORES DE VIRULÊNCIA 44
5.4 SOROTIPAGEM: 45
5.5 ANTIBIOGRAMA 45
5.6 FILOGENIA 46
6 **DISCUSSÃO** 59
7 **CONCLUSÕES** 70
REFERÊNCIAS 71

1 INTRODUÇÃO

O diagnóstico de doenças em aves marinhas representa uma tarefa de difícil execução, pois muitas enfermidades apresentam sinais semelhantes e, algumas vezes, o quadro observado é inespecífico ou inexistente. Desta forma, as aves podem ser portadoras sãs de vírus, bactérias, fungos ou parasitas (WEBER, 2003). Neste sentido, um aspecto importante de se considerar é que estes animais podem ser propagadores de doenças, tanto para outras espécies de animais como para o homem, com relativa facilidade (BOGOMOLNI et al., 2006).

Fragatas são aves marinhas insulares, que se alimentam de peixes e utilizam ilhas costeiras e oceânicas para sua reprodução. Encontram-se dentro da ordem dos Pelecaniformes, sendo que a espécie *Fregata magnificens* é a única do gênero *Fregata* encontrada na costa brasileira. Sabe-se que as fragatas podem realizar migrações e que devido ao seu comportamento interagem diretamente com outras espécies de aves migratórias, além de manterem proximidade com as comunidades litorâneas (SICK, 1997).

Dentre as zoonoses de crescente interesse, tanto para a saúde humana, quanto para a sanidade animal, destaca-se a colibacilose (MARVULO, 2007). Tal enfermidade, cujo agente é a bactéria *Escherichia coli*, pertencente à Família Enterobacteriaceae, é responsável por significativa incidência de processos mórbidos em seres humanos e animais domésticos e selvagens mantidos em cativeiro ou em vida livre (CARVALHO et al., 2007). Vários fatores contribuem para a disseminação dessas bactérias no ambiente, ocorrendo a contaminação ambiental principalmente em cursos de água e praias, devido a presença de dejetos de todos os tipos. Tal fato permite que a *E. coli* se estabeleça com maior facilidade em hospedeiros que vivem em proximidade com o homem (ISHII; MEYER; SADOWSKY, 2007).

A presente proposta se baseou na perspectiva de melhor compreender aspectos epidemiológicos destas enfermidades zoonóticas bacterianas, as colibaciloses, que podem atingir tanto a *F. magnificens* como outras espécies de aves selvagens e domésticas com as quais as fragatas interagem. Tais informações poderão nortear as pesquisas de doenças selecionadas nas populações das fragatas, assim como embasar a adoção de eventuais ações em relação a aspectos de saúde animal e humana, que tenham as fragatas como um dos elos.

2 OBJETIVOS

Investigar a ocorrência e caracterizar fenotípica e genotipicamente, isolados de *Escherichia coli* patogênica na população de *Fragata magnificens* de sítios selecionados da costa de São Paulo, bem como, testar a sensibilidade dos isolados frente à antibióticos selecionados.

3 REVISÃO DE LITERATURA

O presente estudo integra uma das espécies de aves marinhas insulares, a fragata (*Fregata magnificens*), o ecossistema insular marinho do Estado de São Paulo, com uma breve avaliação do perfil sanitário em relação a doenças bacterianas causadas por *Escherichia coli* e sua caracterização molecular quanto ao seu potencial zoonótico.

3.1 AVES MARINHAS INSULARES

As aves marinhas são espécies que sofreram adaptações para aproveitar recursos do ambiente marinho antes inacessíveis. Consideram-se aves marinhas as espécies que obtém seu alimento através do mar. Estima-se que haja em todo o mundo cerca de 310 espécies de aves marinhas, e ao redor de 90 na costa brasileira. As espécies de aves marinhas existentes estão distribuídas em 4 Ordens (Procellariformes, Sphenisciformes, Pelecaniformes e Charadriiformes) (DEL HOYO, 1992; SICK, 1997).

O litoral brasileiro possui cerca de 8.000km de costa, sendo, considerado o maior litoral inter e subtropical do mundo (AB´SABER, 2001). Neste, é possível encontrar mais de 130 espécies de aves marinhas e costeiras que, e em sua maioria, são espécies migratórias do hemisfério norte (setembro a maio) e extremo meridional (maio a agosto).

As aves que nidificam em ilhas costeiras e oceânicas do litoral brasileiro são consideradas aves marinhas insulares, sendo que, dentre estas, cerca de 18 espécies utilizam o ambiente insular do Brasil para sua reprodução. Neste panorama, as aves marinhas são utilizadas como modelo de monitoramento de biodiversidade destes ambientes, uma vez que são caracterizadas como predadores de topo de cadeia (SICK, 1997).

O hábito de reprodução em colônias é um significativo estimulo social que resulta em uma maior taxa de reprodução. Acredita-se que isto seja conseqüência da

observação de comportamentos reprodutivos, como coleta de material para confecção de ninhos e cerimônias pré-nupciais (SICK, 1997).

A dificuldade para o desenvolvimento de estudos com aves marinhas no litoral brasileiro é uma questão de grande relevância, que faz com que as pesquisas com estas espécies sejam raras. Diversos aspectos contribuem para isto, incluindo desde as adversidades naturais para o estabelecimento de investigações no ambiente marinho, passando por questões relativas ao planejamento de colheita de dados e monitoramento de colônias, até a recorrência de entraves burocráticos para a efetiva realização dos trabalhos de campo.

3.1.1 Fragatas – *Fregata magnificens*

Fragata é o nome dado a um navio à vela antigo, muito veloz, usado tanto na guerra como na pirataria. Dele originou-se o nome *Fregata* ("Águia-do-mar", *Man-o-war-bird*), que caracteriza a espécie por seus hábitos agressivos (AUSTIN JR., 1983; SICK, 1997).

O gênero *Fregata* é composto por cinco espécies: *Fregata magnificens*, *F. minor*, *F. ariel, F. andrewsi* e *F. aquila,* e encontra-se dentro da Ordem dos Pelecaniformes (HARRISON, 1983). No Brasil ocorrem, esporadicamente, três das cinco espécies de fragatas: *F. magnificens, F. ariel e F. minor*. Porém, a *F. magnificens* é a única espécie do gênero com registros de reprodução na costa brasileira; as outras espécies reproduzem-se em ilhas oceânicas e, devido a sua ampla distribuição natural, não está incluída na lista de aves ameaçadas de extinção do IBAMA/CEMAVE (SICK, 1997).

Fenotipicamente, o espécime macho de fragata é preto, com saco ou bolsa gular vermelha, que quando inflada caracteriza o período reprodutivo da espécie; por outro lado, a fêmea é preta com peitoral branco e os filhotes possuem cabeça e peitoral brancos, com o restante do corpo preto ou amarronzado (HARRISON, 1983). Seus ninhos são construídos, entre abril e outubro, sobre vegetações arbustivas e arbóreas, sendo compostos por gravetos e fezes. Os pais geralmente incubam um único ovo branco, que eclode entre 45 e 56 dias, e as fêmeas

alimentam seus filhotes por até nove meses de idade, mesmo estes podendo realizar vôos em aproximadamente 4,5 meses (SICK, 1997).

Há relatos de colônias reprodutivas nos estados do Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina, Bahia e Pernambuco (SICK, 1997; ALVES; SOARES; COUTO, 2004).

As fragatas possuem comportamento predominantemente aéreo, exibindo distinta silhueta de vôo (DEL HOYO et al., 1992). O peso total dos indivíduos varia de 600 a 1600g, sendo que as fêmeas tendem a ser até 25% mais robustas que os machos. Apesar de seu tamanho (114 cm – comprimento total), possuem ossos altamente pneumáticos, que correspondem a menos de 5% do peso total dos espécimes (DEL HOYO et al., 1992).

As fragatas pescam na superfície da lâmina de água do mar, sem molhar-se, predando os filhotes de peixes e peixes voadores. Por terem facilidade em localizar barcos de pesca, interagem com esta forma de atividade econômica e fazem de seus alvos outras aves marinhas, quando praticam “pirataria” ou cleptoparasitismo, (NOVELLI, 1997; BRANCO, 2004). No cleptoparasitismo, as fragatas perseguem e roubam a presa ingerida das outras aves, em especial atobás, gaivotas e trinta-réis. Na pirataria, uma fragata pode tirar o roubo de outra fragata, em geral, um indivíduo imaturo.

Marinheiros do tempo da descoberta da América tinham as fragatas como indicativo de terra próxima, por não se afastarem muito de suas ilhas. Contudo, isto não impede que essas aves efetuem migrações em certas épocas e às vezes, quando planam a grandes alturas, sejam levadas para longe pelos ventos; daí vem o fato de ocuparem as ilhas oceânicas mais afastadas (SICK, 1997).

3.1.2 Ambientes insulares do sudeste do Brasil

No litoral de São Paulo há cerca de 140 formações insulares emersas exclusivamente marinhas, entre ilhas, ilhotes, lajes e rochedos, inseridas em mais de 1.300.000 hectares de águas jurisdicionais. A proteção a estes sistemas ecológicos é genérica e caracterizada, principalmente, pelo tombamento da Serra do Mar. Aliado a isto, percebe-se que tais formações compõem um cenário carente de

planos de estudos representativos destes ecossistemas (CAMPOS et al., 2004). Neste panorama encontramos, no Estado de São Paulo, as fragatas reproduzindo na Ilha de Castilho (25°16´S – 47°57´W), em Cananéia (Figuras 1 e 2), e na Ilha principal do Arquipélago dos Alcatrazes (24°06´S – 45°41´W) (Figura 3).

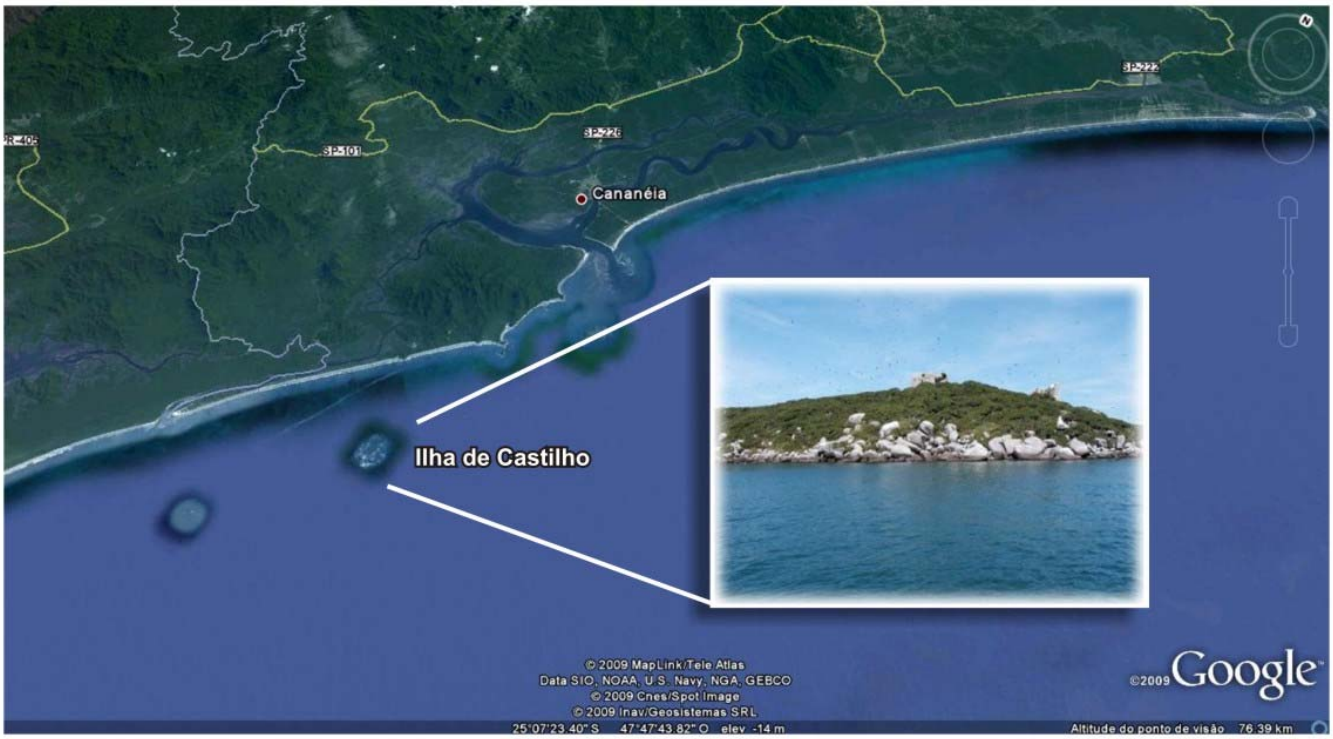
De maneira geral as aves marinhas que utilizam as ilhas sofrem pressões diversas, como: predação por outras aves, ou por animais introduzidos como gatos e ratos; fogo intencional; coleta de ovos; e destruição de ninhos. Reconhecidamente, crê-se que as interferências humanas sejam as mais desastrosas para a sobrevivência das espécies aviárias insulares (ALVES; SOARES; COUTO, 2004; CAMPOS et al., 2004).

Fonte: Google Earth

Figura 1- Localização do Arquipélago dos Alcatrazes, São Sebastião, litoral norte de São Paulo

Foto: Israel Hideo Saviolli

Figura 2 - Ninhal de fragatas na ilha principal do Arquipélago dos Alcatrazes



Fonte: Google Earth

Figura 3 - Localização da Ilha de Castilho, Cananéia, litoral sul de São Paulo

3.2 *ESCHERICHIA COLI*

Esta espécie de bactéria Gram negativa, pertencente à família Enterobacteriaceae e caracteriza-se por apresentar metabolismo anaeróbio facultativo, podendo ser móvel ou imóvel (ANDREATTI FILHO, 2007).

Trata-se de um dos principais constituintes da microbiota entérica de mamíferos e aves. Como comensal, provenientes da mãe ou do ambiente, as *E. coli* colonizam o intestino de seu hospedeiro logo após o nascimento, e convivem com este de forma vitalícia (GYLES, 1993).

Existem dentre as *E. coli,* entretanto, diversas cepas com potencial patogênico. Este potencial se deve a ganhos genéticos ocorridos durante o processo evolutivo da espécie, devido à aquisição de genes de virulência por cepas comensais de *E. coli,* através de mutações ou transferência horizontal de material genético. Estes genes de virulência, contidos em ilhas de patogenicidade no cromossomo bacteriano (PAIs- *Pathogenicity Islands)* ou em material genético extra-cromossômico, codificam proteínas que possibilitaram a colonização, penetração e invasão de novos nichos em seus hospedeiros (HACKER et al., 1997).

Desta forma, devido à combinação destes genes, diferentes grupos de amostras patogênicas possuem mecanismos de virulência específicos, sendo classificadas em patotipos (FERREIRA; KNÖBL, 2000). De modo geral, as *E. coli* patogênicas podem ser classificadas em dois grandes grupos: o das *E. coli* diarreiogênicas, que tem seu mecanismo de patogenicidade estabelecido no intestino; e o das *E. coli* patogênicas extraintestinais (EXPEC), com capacidade de colonização e disseminação para outros sítios orgânicos, como sangue, sistema nervoso central e trato urinário, entre outros (JOHNSON; RUSSO, 2005; WILES; KULESUS; MULVEY, 2008).

A detecção dos genes que codificam as características de virulência através de técnicas moleculares, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), além de sorotipagem e pesquisa de produção de toxinas, são algumas das técnicas utilizadas como ferramentas para a diferenciação destas cepas (NATARO; KARPER, 1998).

Dentre as *E. coli* que ocasionam diarréias, a combinação de fatores de virulência (FV) possibilita a classificação das cepas em seis patotipos diferentes: *E.*

coli enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* de aderência difusa (DAEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC) e *E. coli* produtora de toxina de Shiga (STEC) (NATARO; KAPER, 1998).

As ETEC são caracterizadas por apresentarem, como mecanismo central de virulência, a produção de toxinas termolábil e/ou termoestável. No organismo de seus hospedeiros colonizam a superfície da mucosa intestinal e, pela ação de suas toxinas, causam diarréia aquosa, principalmente em animais recém nascidos (NATARO; KARPER, 1998).

Embora ainda não totalmente elucidado, o mecanismo de patogenicidade das EAEC consiste na colonização bacteriana formando agregados no epitélio intestinal, com conseqüente aumento da produção de muco. Danos ao epitélio intestinal observados nas infecções por este patotipo são provavelmente mediados por toxinas. Diferentemente destas, as DAEC possuem padrão de aderência difusa às células do hospedeiro que é mediada por fimbrias, sendo que o sorotipo mais comumente identificado com este padrão é o O126:H27 (NATARO; KARPER, 1998).

O patotipo EIEC se caracteriza por invadir o epitélio do cólon e sua patogenicidade é muito semelhante a da bactéria *Shigella* spp., sendo que ambas podem elaborar uma ou mais enterotoxinas que são capazes de causar diarréia. Em casos de infecção severa por EIEC observa-se uma reação inflamatória intensa com presença de ulcerações do epitélio intestinal (NATARO; KARPER, 1998).

As EPEC têm como ponto central do seu mecanismo de virulência a capacidade de ocasionar a lesão A/E (*attaching-and-effacing*). Esta é caracterizada por alterações morfológicas nas células do epitélio intestinal que levam à perda de microvilosidades dos enterócitos e consequente processos diarréicos (NATARO; KARPER, 1998).

Já, as STEC são bactérias produtoras de citotoxinas semelhantes à “Toxina de Shiga” (Stx1 e Stx2), que ocasionam lesões celulares por afetarem a síntese protéica. Dentro deste patotipo se destaca o sub-grupo das EHEC (*Enterohaemorrhagic E. coli*) cujo principal sorotipo é o O157:H7. Estas bactérias, além da produção de citotoxinas, apresentam a capacidade de ocasionar a lesão A/E e são responsáveis por severos quadros de diarréia hemorrágica (colite hemorrágica - HC) e a Síndrome Hemolítica Urêmica (SHU) no homem (NATARO; KARPER, 1998).

Alguns destes patotipos apresentam hospedeiros animais e podem ser caracterizados como agentes zoonóticos. Destacam-se neste contexto as STECs que, além de apresentarem como hospedeiros naturais os ruminantes, ainda têm outras espécies animais como possíveis veiculadoras (PRITCHARD; WILLIANSON; CARSON, 2001; MAKINO; KOBORI; ASAKURA, 2000; MORABITO et al., 2001; NIELSEN; SKOV; MASEN, 2004).

O grupo de *E. coli* patogênica capaz de ocasionar infecções extra-intestinais (ExPEC - *Extraintestinal Pathogenic E. coli*) pode ser considerado de grande heterogeneidade, uma vez que várias combinações de FV são encontrados nestas bactérias. Ocorre, entretanto, que são observadas combinações de FV semelhantes em cepas isoladas de diferentes síndromes clínicas e, em isolados de diferentes espécies animais, incluindo-se aqui o homem. Devido a isso, Johnson e Russo (2005) propuseram a designação genérica de ExPEC para as cepas capazes de ocasionar infecções extra-intestinais, antes denominadas de acordo com a síndrome clínica, o sítio anatômico de infecção ou o hospedeiro.

Entre estas se encontram as APEC (*Avian Pathogenic E. coli*), grupo bem caracterizado, responsável por doença respiratória e sistêmica em aves, e que apresenta grande similaridade com amostras envolvidas em doença humana (JOHNSON et al., 2006; JOHNSON et al., 2008; MOULIN-SCHOULEUR et al., 2007).

Sobreposições de sorogrupos, grupos filogenéticos e fatores de virulência, por exemplo, foram observados em cepas de APEC e em isolados de *E. coli* causando infecções de trato urinário e meningite neonatal em humanos (RODRIGUEZ-SIEK et al., 2005a; EWERS et al., 2007; JOHNSON et al., 2008).

Aves silvestres e humanos compartilham, com frequência, o mesmo ambiente e, possivelmente, algumas espécies aviárias se alimentam de restos de alimentos de humanos. Este contato é crescente, podendo tanto as aves representar uma potente fonte de infecção para o homem, como cepas de origem humana podem atingir esses animais. Aves silvestres podem ser responsáveis pela propagação de organismos patogênicos, atuando como carreadores ou reservatórios entre as populações locais e aquelas existentes a grandes distâncias, em função das características das espécies e dos hábitos migratórios. Estudos epidemiológicos já registraram relatos de disseminação de bactérias entre aves e humanos, além da

disseminação de resistência bacteriana a antimicrobianos (FOSTER et al., 2006; POETA et al., 2008; BONNEDAHL et al., 2009).

A poluição ambiental é um fator que também favorece a disseminação e transferência de patógenos de humanos e animais domésticos para animais de vida livre, através de descargas de dejetos em córregos, cursos de rios, estuários e costas (BOGOLMONI et al., 2006).

3.2.1 *Escherichia coli* produtora de toxina de Shiga – STEC

Como referido anteriormente, as STEC compõem o grupo das *E. coli* diarreiogênicas, e caracterizam-se por apresentar genes que codificam a produção de toxinas semelhantes às toxinas de Shiga. O subgrupo das EHEC, além de diarréia sanguinolenta, pode levar à falência renal, ocasionando a Síndrome Hemolítica Urêmica (SHU) em humanos. Tais cepas também são capazes de ocasionar a lesão *attaching and effacing* (A/E) (MAINIL, 1999).

Os bovinos são reservatórios naturais destas cepas, encontradas na microbiota de vários animais. Sua transmissão ocorre a partir de carne mal cozida, produtos não pasteurizados e vegetais/água contaminados por fezes. Estas bactérias aderem-se no epitélio intestinal e colonizam o tubo digestivo, de forma assintomática ou ocasionando diarréia (NATARO; KAPER, 1998; GARCÍA-ALJARO et al., 2005).

Dois grupos de toxina de Shiga (Stx1 e Stx2) podem ser sintetizados por STEC. Estas citotoxinas recebem este nome por serem iguais a toxina produzida por Shigella dysenteriae I e seus receptores são encontrados em células renais e intestinais. A produção de Stx e enterohemolisina e a capacidade de causar lesão A/E estão envolvidos com a patogenicidade de STEC (NATARO; KAPER, 1998).

A ligação de Stx aos receptores causa morte das células por inibição de síntese protéica, causando enterocolite hemorrágica e falência renal (NATARO; KAPER, 1998;

Cepas de STEC já foram isoladas de animais domésticos, ovelhas, mosquitos, gaivotas, veados, coelhos, javali, alce, pombos e pássaros, sem, contudo, ficar esclarecido se estes animais atuavam como hospedeiros naturais ou

vetores deste patógeno (MAKINO; KOBORI; ASAKURA, 2000). Investigações neste sentido são relevantes, uma vez que a *E. coli* O157 é um importante agente zoonótico, tendo sido descritos casos humanos envolvendo animais de cativeiro e vida livre (MAKINO; KOBORI; ASAKURA, 2000; MORABITO et al., 2001; HEUVELINK et al., 2002; NIELSEN; SKOV; MADSEN, 2004). Por outro lado, não existem dados na literatura sobre a ocorrência de doença clínica em animais selvagens ocasionada por STEC.

Aves são consideradas potenciais transmissores de STEC, por seus hábitos de deslocamento a grandes áreas, e por estar envolvidas na transmissão de várias bactérias patogênicas, incluindo *Campylobacter* spp. e *Salmonella* spp. Cepas de STEC altamente patogênicas para humanos foram isoladas em gaivotas (Japão e Inglaterra) sendo que os sorogrupos encontrados entre estas cepas (O136 e O153) são os mesmos isolados de gado e ovelhas, elucidando o potencial de disseminação entre esses animais (MAKINO; KOBORI; ASAKURA, 2000).

A caracterização molecular das amostras de STEC se faz através da pesquisa dos *operons* para as toxinas Stx1 e Stx2, associada à pesquisa do gene *eae* (MAINIL, 1999).

3.2.2 *Escherichia coli* Patogênica para Aves - APEC

Escherichia coli patogênica para aves – APEC são responsáveis por uma série de enfermidades e grandes prejuízos na indústria avícola (GROSS, 1994). Estas bactérias têm sido isoladas de avestruzes, mutuns, aves de rapina, gansos, papagaios, aves marinhas em centros de reabilitação e gaivotas (MAKINO; KOBORI; ASAKURA, 2000; STEELE; BROWN; BOTZLER, 2005; BOGOLMONI et al., 2006; FOSTER et al., 2006; COSTA et al., 2008; KNÖBL et al., 2008; POETA et al., 2008; BONNEDAHL et al., 2009; RADHOUANI et al., 2009; SAINDENBERG et al., 2009).

A colibacilose é a doença infecciosa mais significante de aves de produção (frangos, perus, patos e codornas), e pode ocasionar aerossaculite, onfalite, peritonite, salpingite, sinovite, síndrome da cabeça inchada, doença respiratória crônica, celulite e colisepticemia, associadas ou não a outros patógenos (KNÖBL et al., 2004; RODRIGUEZ-SIEK et al., 2005b; JOHNSON et al., 2006).

Os mecanismos de patogenicidade das APEC ainda não são totalmente elucidados. As APEC fazem parte do grupo das ExPEC, e podem ser encontradas na microbiota gastrointestinal de aves. Embora possam estar confinadas ao sistema gastrointestinal, mesmo cepas aparentemente apatogênicas de *E. coli* são capazes de causar infecção em decorrência de situações imunossupressivas afetando os hospedeiros, ou então como resultados de comportamentos oportunistas apresentados pela bactéria (NATARO; KARPER, 1998). Ainda, além da imunossupressão e do comportamento oportunista bacteriano, vários fatores podem tornar a ave susceptível à infecção por *E.coli*, entre eles os ambientais, nutricionais e infecciosos capazes de lesar o epitélio respiratório (FERREIRA; KNÖBL, 2000).

Por transmissão vertical em fêmeas infectadas, ou no momento da postura, as aves podem entrar em contato com a *E. coli* já a partir da penetração da bactéria pela casca do ovo, ou ainda, por contaminação fecal no momento do nascimento. A via oral representa a porta de entrada mais importante para aves de um dia de idade. Aves jovens, de quatro a nove semanas de idade, se mostram mais susceptíveis a quadros respiratórios, e o favorecimento da colonização do trato respiratório superior por *E. coli* ocorre a partir de alguma lesão do mesmo, como perda de cílios e acúmulo de muco (ANDREATTI FILHO, 2007; REVOLLEDO; FERREIRA, 2009).

Tratando-se de cepas APEC, a capacidade de transmissão ainda conta com a via aerógena, pois estas podem estar presentes na poeira e ser inaladas por seu hospedeiro (DHO-MOULIN; FAIRBROTHER, 1999). As características anátomo-histofisiológicas do sistema respiratório das aves, dotado de pulmões e sacos aéreos e carente de células de defesa residentes, predispõem ainda mais estes indivíduos. Além disso, o contato com outros animais ou fezes destes, ingestão de água e/ou alimentos contaminados, e o contato com fômites, são formas de estabelecimento de *E.coli* em animais suscetíveis (NATARO; KAPER, 1998).

As cepas de APEC apresentam fatores de virulência (FV), traduzidos em adesinas, toxinas, sideróforos, colicina, resistência a proteínas do soro, entre outros (ROCHA et al., 2008; NAKAZATO et al., 2009; REVOLLEDO; FERREIRA, 2009).

A pesquisa de marcadores para FV que caracterizam as APECs inclui a presença de genes que codificam as adesinas: fímbria do tipo 1 (*fimH*), fímbria P (*pap*), fímbria S (*sfa*), adesina afimbrial (*afaI*), “curli” (*crl, csgA*); sistema de aquisição de ferro

aerobactina (*iucD*); hemaglutinina (*tsh*); toxinas (*cnf, hly*); plasmídio ColV (*cvaC*), entre outros (DHO-MOULIN; FAIRBROTHER, 1999; KNÖBL et al., 2004).

O processo inicial de infecção é marcado pela adesão bacteriana através de adesinas, que são proteínas responsáveis pela fixação da bactéria aos tecidos epiteliais do hospedeiro. Este é, portanto, um pré-requisito importante para o estabelecimento da infecção por *E. coli* (BEACHEY, 1981; KNÖBL et al., 2004).

Entre as adesina, a fimbria tipo 1 possibilita a adesão, principalmente ao trato respiratório superior das aves, porém não é necessária para a colonização de traquéia e sacos aéreos. Codificada pela sequência *fim*, a fímbria do tipo 1 é constituída pela associação de várias proteínas (FimA, FimF, FimG) estando em sua extremidade a proteína responsável pela adesão propriamente dita, FimH. Sua patogênese ainda não está totalmente esclarecida, mas a fimbria do tipo 1 é associada com proteção à fagocitose de *E. coli* e resistência aos efeitos bactericidas do soro do hospedeiro (DHO-MOULIN; FAIRBROTHER, 1999).

A fimbria P é constituída pela subunidade protéica PapA, possuindo em sua extremidade as proteínas PapE, PapF e PapG. Esta fímbria está envolvida na adesão das *E. coli* aos demais órgãos. Em humanos, está associada com infecções do trato urinário (UTI) por mediar a adesão bacteriana à células uroepiteliais, e são codificadas por um aglomerado de 11 genes denominado “cluster” *pap,* localizado no cromossomo bacteriano (DHO-MOULIN; FAIRBROTHER, 1999; NAKAZATO et al., 2009). Seu papel na patogenicidade de APEC ainda não foi completamente elucidado, porém sabe-se que esta fimbria está comumente relacionada a cepas de *E. coli*, causando septicemia em frangos. A não aderência ao trato respiratório superior das aves por cepas que possuem a fímbria P sugere que estes sítios podem estar desprovidos de seus receptores (DHO-MOULIN; FAIRBROTHER, 1999).

A fimbria S (Sfa) faz parte de uma família de adesinas predominantemente expressadas por cepas de ExPEC causadoras de meningite e septicemia. Tais fímbrias são codificadas pelo *operon sfa,* e podem fazer parte de ilhas de patogenicidade (PAI). O papel desta fimbria ainda não está claro para cepas de APEC (DOBRINDT et al., 2001; KNÖBL et al., 2004).

Após a adesão, os fenômenos de colonização e persistência nos tecidos são conferidos por outros FV.

A produção de colicina envolve determinantes genéticos localizados em plasmídios, chamados de Col fatores. Plasmídeos de grande extensão são capazes de codificar vários determinantes de virulência, sendo a colicina V um deles. Muitos dos genes encontrados em plasmídeos ColV tem sido amplamente associados a virulência de *E. coli,* especialmente em cepas de APEC, e principalmente na habilidade de causar doenças em animais de produção. Este plasmídio é responsável por transportar o *operon* aerobactina. A aerobactina por sua vez faz parte de um sistema de aquisição de ferro em sítios do hospedeiro, onde a concentração de ferro livre não é suficiente para permitir o crescimento bacteriano. A maioria das cepas APEC expressa este sistema, no entanto, cepas não patogênicas também são capazes de produzir aerobactina, porém com menor freqüência (DHO-MOULIN; FAIRBROTHER, 1999; EWERS et al., 2004; RODRIGUEZ-SIEK et al., 2005b; JOHNSON et al., 2006).

Por sua vez, cepas de APEC comumente apresentam estruturas como cápsula, lipopolissacarídeos e proteínas de superfície de membrana bacteriana que conferem resistência a efeitos bactericidas do soro. A proteína de superfície TraT (gene *traT*) pode ser codificada por genes contidos em plasmídios, e normalmente está associada a isolados de APEC causando septicemia em aves (DHO-MOULIN; FAIRBROTHER, 1999; MELLATA et al., 2003).

À proteína IbeA é atribuída a habilidade de cepas de *E. coli* invadir células endoteliais da microvasculatura cerebral. Este fator de virulência codificado pelo gene *ibeA,* é responsável por causar meningite neonatal em humanos e recentemente foi relacionado com cepas de APEC. A afinidade das *E.coli* que possuem o gene *ibeA* pelo sistema nervoso central pode ser explicada pela presença de receptores de IbeA, já identificados em humanos e bovinos (HUANG et al., 2001; GERMON et al., 2005).

O potencial zoonótico de cepas de APEC é elucidado quando fatores de virulência encontrados nas APEC são freqüentemente encontrados em cepas de *E. coli* causando doenças extraintestinais em humanos, caracterizando uma relação positiva principalmente entre APEC e UPEC (*E. coli* uropatogênica) e NMEC (*E. coli* causadora de meningite neonatal) (KNÖBL et al., 2004; MOULIN-SCHOULER et al., 2007, JOHNSON et al., 2008).

4 MATERIAL E MÉTODOS

Descrição da colheita de amostras, processamento laboratorial do material colhido e técnicas laboratoriais utilizadas para obtenção dos resultados.

4.1 EXPEDIÇÕES PARA A COLHEITA DE MATERIAL

Foram realizadas três expedições para a colheita de material biológico em duas ilhas da costa oceânica do Estado de São Paulo, sendo duas expedições para a Ilha dos Alcatrazes (24°06´S – 45°41´W; 05/12/2008 a 06/12/2008; 07/04/2009) e uma expedição para a Ilha de Castilho (25°16´S – 47°57´W; 07/01/2009 e 08/01/2009).

A captura, contenção, anilhamento e colheita de material foram realizadas conforme especificados nos itens correspondentes, e de acordo com autorizações e licenças concedidas pelos órgãos competentes (Autorização nº 2997/1, Emissão: 06/03/08, Validade: 07/03/10; Autorização n° 16553-1, Emissão: 09/10/2008, Validade: 09/10/2009).

4.2 ANIMAIS E PROCEDIMENTOS DE CAPTURA E COLHEITA DE MATERIAL

Os procedimentos de captura adotados para a contenção dos espécimes de fragatas foram definidos com o objetivo prioritário de preservar a integridade dos animais. Desta forma, os filhotes, sempre com aspecto compatível com idade superior a três meses de idade, foram retirados manualmente dos ninhos e, no caso dos adultos e jovens que já eram capazes de realizar vôos, utilizou-se puçás para conter estes indivíduos. Não foram utilizadas armadilhas ou redes para a captura

dos animais nem foram escolhidos para captura indivíduos adultos em ninhos com ovos ou filhotes pequenos, para que estes não caíssem ou sofressem com insolação. Foram pesquisados os ninhos localizados no extrato arbustivo e não arbóreo, facilitando o trabalho e evitando a ocorrência de maior estresse das aves. Todos os animais submetidos à contenção foram anilhados conforme preconizado pelo Manual de Anilhamento de Aves Silvestres do CEMAVE/IBAMA (NETO et. al., 1994).

Imediatamente após a colheita do material biológico e anilhamento, os animais foram devolvidos ao ambiente. Todas as amostras colhidas foram armazenadas em meios de transporte apropriados e processadas em aproximadamente 72hs após a colheita, sendo que os "*swabs*" com meio Stuart foram acondicionados em caixas térmicas[1] com conservante de gelo reciclável para manter a temperatura de 2°C a 8°C até o momento do processamento.

4.3 PROCESSAMENTO MICROBIOLÓGICO

O processamento microbiológico e a pesquisa molecular dos fatores de virulência das *E. coli* patogênicas foram realizados no Laboratório Multidiciplinar de Biologia Molecular e Celular – UNIP, sob a supervisão da Profa. Dra. Vania Maria de Carvalho, de acordo com métodos microbiológicos e moleculares padronizados no citado laboratório e descritos abaixo.

4.3.1 Isolamento e identificação bacterianas

A figura 4 apresenta sumário dos passos adotados para o isolamento e identificação dos isolados de *E. coli.*

Todas as amostras de *swabs* cloacal e de coanas foram semeadas em ágar MacConkey[1] e incubadas a 37°C, durante 24 horas. A identificação das amostras

[1] Coleman®

isoladas foi realizada de acordo com as técnicas rotineiras de identificação bioquímica (KONEMAN et al., 1997), incluindo o kit de identificação bioquímica EPM, MILi, Citrato[2].

De cinco a oito isolados de *E. coli* de cada um dos sítios (cloca e coana) de cada ave foram estocados para os testes moleculares. Estas cepas foram mantidas a -70°C, em meio BHI (*Brain Heart Infusion* - [3]) acrescido de glicerol a 80% em uma proporção de (1:1) e mantidas em estoque em Ligniéres[4].

[2] Probac do Brasil, São Paulo, Brasil
[3] Difco™ BD, New Jersey, EUA
[4] Ligniéres: Extrato de carne (5g), Peptona (10g), NaCl (5g), Gelatina (5g), Agar (7g), Água destilada (1000ml)

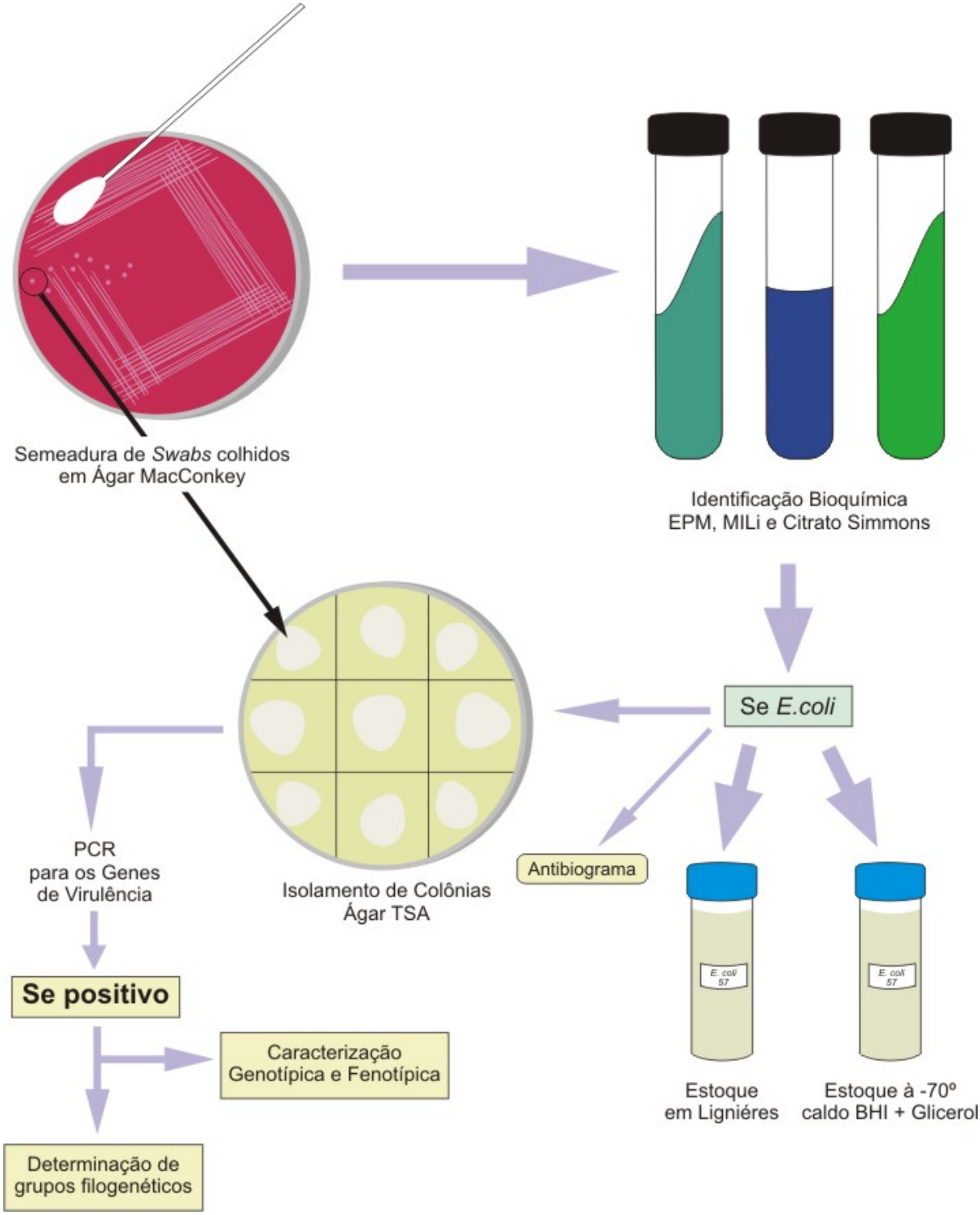


Figura 4 - Esquema do Procedimento para Isolamento e Caracterização das Amostras de *Escherichia coli* de Fragatas

4.4 ANTIBIOGRAMA

A técnica empregada para a pesquisa de sensibilidade e resistência à antimicrobianos das bactérias isoladas foi a de disco difusão, preconizada como método de referência pelo (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2008).

Foi selecionada aleatoriamente uma cepa de *E.coli* de cada sítio anatômico das fragatas, imediatamente após o isolamento. As cepas foram testadas para os antibióticos Ampicilina, Amoxacilina, Cefalexina, Cefotaxima, Ceftiofur, Tetraciclina, Cloranfenicol, Nitrofurantoína, Polimixina B., Estreptomicina, Gentamicina, Amicacina, Neomicina, Norfloxacina, Ciprofloxacina, Enrofloxacina e Cotrimoxazol.

4.5 SOROTIPAGEM DAS AMOSTRAS DE *E. COLI*

Todas os isolados de *E. coli* que apresentaram genes de virulência foram encaminhadas para sorotipagem, através de testes de aglutinação, utilizando-se os anti-soros O1 ao O181 e H1 ao H56, de acordo com as técnicas sorológicas internacionalmente padronizadas, no Instituto Adolph Lutz, centro de referência para sorotipagem de *E. coli* no Brasil, sob a supervisão da Profa. Dra. Kinue Irino.

4.6 CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DAS AMOSTRAS DE *E. COLI*

Métodos utilizados para a pesquisa de fatores de virulência dos isolados de *E. coli* obtidos das fragatas. Descrição de métodos e técnicas utilizadas para a determinação de grupos filogenéticos a partir dos resultados da pesquisa de fatores de virulência.

4.6.1 Pesquisa de fatores de virulência de *E. coli*

Os isolados de *E. coli* obtidos foram submetidos à reação de PCR (*Polimerase Chain Reaction* – Reação em Cadeia da Polimerase) para a pesquisa de diferentes genes, que codificam fatores de virulência característicos de STEC e APEC.

A pesquisa de genes que codificam os fatores de virulência reconhecidos de APEC foi realizada utilizando-se os iniciadores para os genes associados à expressão de adesinas (*papC*, *papEF, iha, sfa),* sideróforos *(iucD* e *fyuA)* e toxinas *(cnf1, hly)* (JOHNSON; RUSSO, 2005).

Resumidamente, a pesquisa de genes pelo PCR-monoplex foi realizada em reações de 50 µL contendo: 5 µL de DNA molde, lisado por fervura a 10 minutos; 1,5 mM de $MgCl_2$; 0,2 mM de cada uma das 4 dNTP; 1,5 u de *Taq* DNA polimerase Fermentas em 10X PCR Buffer e água mili-Q qsp. Os iniciadores para os genes *papC*, *sfa*, *papEF, iucD*, *cnf1* foram utilizados na concentração de 0,4µM cada um. Já para os genes *hlyA*, *fyuA* e *iha,* a concentração de cada um dos iniciadores foi de 0,6 µM. As reações foram submetidas ao ciclo de amplificação, no termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient, sendo inicialmente aquecidas à 94°C por 3 minutos, em seguida a 30 ciclos de desnaturação à 94°C por 1 minuto, 30 segundos à 63°C no anelamento, extensão à 72°C por 3 minutos e um ciclo de extensão final de 7 minutos (JOHNSON; RUSSO, 2005).

Outros genes foram pesquisados em conjunto em reações de PCR- Multiplex. Para isso foram feitos dois “pools” de genes, um primeiro para *malX* (marcador para PAI I_{CFT073}), adesina Tipo I (*fimH*) e invasina (*ibeA*: ibe10 f, ibe10 r). O segundo para o marcador do plasmídio ColV (cvaC) e a proteína de membrana externa (TraT) (JOHNSON; STELL, 2000).

Brevemente, em reações de PCR Multiplex, contendo 2 µL de DNA molde, lisado por fervura, 4mM $MgCl_2$; 0,8mM de cada um dos 4 dNTPs; 2,5 u de AmpliTaq Gold em 1 X PCR Buffer (Roche[4]), ambos os “pools” com concentração individual de 0,6 µM. O volume final de cada reação foi de 25 µL. Os ciclos de amplificação consistiram em uma etapa inicial de 12 minutos à 95°C para ativação da AmpliTaq

Gold (Applied Biosystems[5]), seguida de 25 ciclos de desnaturação µL (94°C, 30s), anelamento (63°C, 30s) e extensão (68°C, 3 min) e uma etapa de extensão final à 72°C por 10 minutos.

No quadro 1 encontram-se descritas as seqüências, tamanho do produto amplificado e referências de cada um dos iniciadores utilizados.

Objetivando verificar a presença de cepas de STEC nos animais estudados, foi realizada a pesquisa dos genes que codificam a produção de toxinas de Shiga (*stx1* e *stx2*) e o gene *eae* nas cepas de *E. coli* isoladas (POLLARD et al., 1990; GANNON et al., 1993; OLSVIK; STROCKBINE, 1993).

Para os genes *stx1, stx2* e *eae*, cada reação de amplificação foi realizada com 0,75 mM $MgCl_2$; 25pmol de cada iniciador; 0,1mM (cada) de dATP, dGTP, dCTP e dTTP e 1,25U de *Taq* DNA polimerase. Os ciclos de amplificação foram semelhantes ao descrito anteriormente, com temperatura de anelamento de 55°C.

4.6.2 Eletroforese em gel

Após os ciclos de amplificação na PCR, uma alíquota de 5µL da amostra foi adicionada a 1µL de tampão de ressuspensão para uma corrida eletroforética a 100W por uma hora em gel de agarose a 2%[6]. Em seguida, o gel foi corado com brometo de etídio[7], sendo realizada a leitura em transluminador UV e fotografadas pelo sistema EDAS[8].

---

[5] Manufactured for Applied Biosystems by Roche Molecular Systems, Inc., New Jersey, EUA
[6] Bio Basic, Inc., Ontário, Canadá
[7] Invitrogen Corporation, Carlsbad, EUA
[8] Kodak

	Gene	Iniciador	Marcador	Seqüência	Tamanho (pb)	Referência do iniciador[1]
ADESINAS	*papC*	pap 1	fimbria P	5'-GACGGCTGTACTGCAGGGTGTGGCG-3'	**328**	a
		pap 2		5'-ATATCCTTTCTGCAGGGATGCAATA-3'		a
	papEF	pap 3	fimbria P	5'-GCAACAGCAACGCTGGTTGCATCAT-3'	**336**	c
		pap 4		5'-AGAGAGAGCCACTCTTATACGGACA-3		c
	sfa	sfa 1	fimbria S	5'-CTCCGGAGAACTGGGTGCATCTTAC-3'	**410**	a
		sfa 2		5'-CGGAGGAGTAATTACAAACCTGGCA-3'		a
	fimH	FimH f	fimbria do tipo 1	5' TGCAGAACGGATAAGCCGTGG 3'	**508**	e
		FimH r		5' GCAGTCACCTGCCCTCCGGTA 3'		e
	iha	IHA f	adesina não hemaglutinante	5' CTG GCG GAG GCT CTG AGA TCA 3'	**827**	f
		IHA r		5' TCC TTA AGC TCC CGC GGC TGA 3'		f
TOXINAS	*hlyA*	hly 1	α-hemolisina	5'-AACAAGGATAAGCACTGTTCTGGCR-3'	**1177**	c
		hly 2		5'-ACCATATAAGCGGTCATTCCCGTCA-3'		c
	cnf1	cnf1	fator citotóxico necrotizante I	5'-AAGATGGAGTTTCCTATGCAGGAG-3'	**498**	c
		cnf2		5'-CATTCAGAGTCCTGCCCTCATTATT-3'		c
SIDERÓFORO	*iucD*	aer 1	aerobactina	5'-TACCGGATTGTCATATGCAGACCGT-3'	**602**	c
		aer 2		5'-AATATCTTCCTCCAGTCCGGAGAAG-3'		c
	fyuA	FyuA f	yersiniabctina	5' TGA TTA ACC CCG CGA CGG GAA 3'	**880**	e
PLASMÍDIO	*cvaC*	ColV-Cf	plamídio ColV	5' CAC ACA CAA ACG GGA GCT GTT 3'	**680**	e
		ColV-Cr		5' CTT CCC GCA GCA TAG TTC CAT 3'		e
RESISTÊNCIA AO SORO	*traT*	TraT f	proteína de membrana externa TraT	5' GGT GTG GTG CGA TGA GCA CAG 3'	**290**	e
		TraT r		5' CAC GGT TCA GCC ATC CCT GAG 3'		e
INVASINA	*ibeA*	ibe10 f	"invasion of brain edotelial cells"	5' AGG CAG GTG TGC GCC GCG TAC 3'	**170**	b
		ibe10 r		5' TGG TGC TCC GGC AAA CCA TGC 3'		e
PAI	malX	RPAi f	PAI ICFT073	5´GCA CAT CCT GTT ACA GCG CGC A 3´	**925**	e

Quadro 1 - Genes, seqüência dos iniciadores, tamanho dos amplificados e referência dos iniciadores utilizados nas PCRs

4.7 DETERMINAÇÃO DE GRUPOS FILOGENÉTICOS

Por meio do método descrito por Clermont, Bonacorsi e Bingen (2000), realizou-se a classificação das amostras de *E. coli* que apresentaram genes de virulência através de reações de PCR, entre os quatro principais grupos filogenéticos (A, B1, B2 e D).

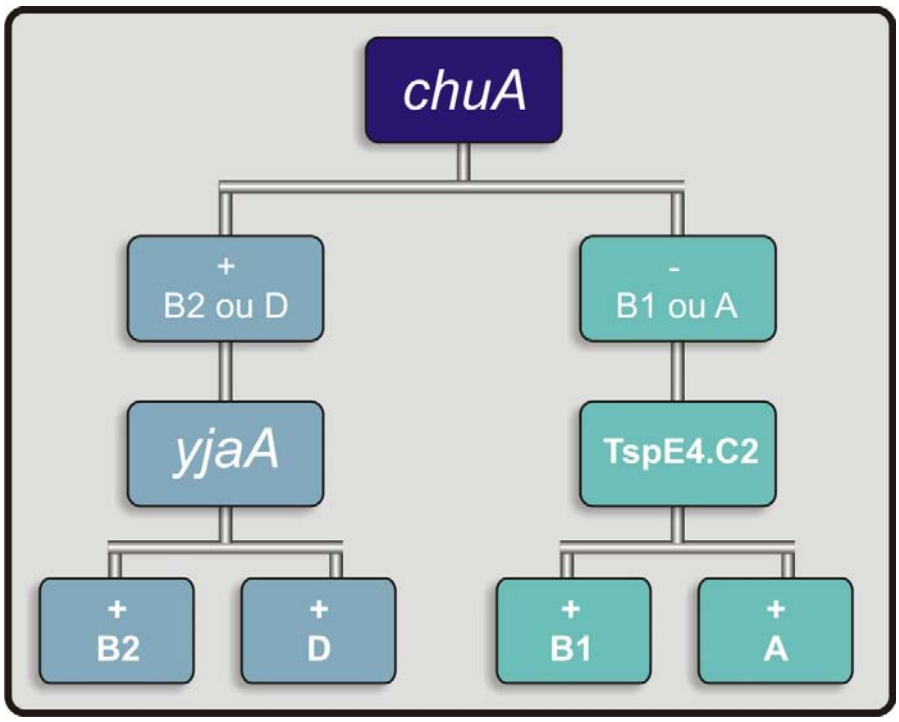
Os dois genes *chuA* e *yjaA*, e o fragmento TSPE 4C2 foram testados individualmente para cada isolado. As reações continham 50 µL de DNA molde, lisado por fervura a 10 minutos; 1,5 mM de $MgCl_2$; 0,2 mM de cada uma das 4 dNTP; 0,4 µM de cada iniciador; 1,5 u de Taq DNA polimerase[9] em 10X PCR Buffer e água mili-Q qsp. Após o ciclo de amplificação, que consistiu de 94°C por 5 minutos para a desnaturação inicial e 30 ciclos de desnaturação (30 segundos a 94°C), anelamento (55°C à 30 segundos), extensão (72°C à 30 segundos) e 7 minutos a 72°C para a extensão final, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel agarose (2%), coradas em brometo de etídio, visualizadas em transiluminador UV e fotografadas pelo sistema EDAS[10] (Quadro 2).

[9] Fermentas, Inc., Maryland, EUA
[10] Kodak

Gene / Fragmento	Descrição	Iniciador	Sequencia	Tamanho (pb)
chuaA	gene necessário para o transporte de heme em O157:h7	ChuA.1	5´GACGAACCAACGTCAGGAT3´	279
		ChuA.2	5´TGCCGCCAGTACCAAAGACA 3´	
yjaA	gene identificado no genoma de E.coli K-12, com função desconhecida	YjaA.1	5´TGAAGTGTCAGGAGACGCTG 3´	211
		YjaA.2	5´ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC 3´	
TSPE.4C2	fragmento anônimo de DNA	TspE4C2.1	5´GAGTAATGTTCGGGGCATTCA 3´	152
		TspE4C2.2	5´CGCGCCAACAAAGTATTACG 3´	

Quadro 2 - Descrição dos genes utilizados para a classificação de grupos filogenéticos de *E.coli*, seqüência dos iniciadores e tamanho do fragmento amplificado

As amostras foram classificadas em um dos grupos filogenéticos (A, B1, B2 ou D), de acordo com a interpretação dos resultados das PCRs, segundo a árvore de decisão dicotômica (Figura 5).



Fonte: adaptado de Clermont, Bonacorsi e Bingen (2000).

Figura 5 - Árvore de decisão dicotômica para determinação do grupo filogenético em amostras de *E.coli* de acordo com os resultados de PCR para os genes *chuA*, *yjaA* e o fragmento de DNA TSPE4 C2

5 RESULTADOS

Neste capítulo serão descritos os resultados obtidos ao longo da realização deste trabalho.

5.1 DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS COLHIDAS

Ao longo das 3 expedições realizadas foram capturados 21 espécimes de fragatas e colhidos 42 swabs, sendo 21 de cloaca e 21 de coana. Das 21 fragatas contidas, 19 eram da ilha de Alcatrazes e 2 da ilha de Castilho. Das 19 fragatas capturadas na Ilha de Alcatrazes, 16 delas eram filhotes, 2 fêmeas adultas e 1 macho adulto, enquanto os 2 animais capturados na Ilha de Castilho eram filhotes. O sexo dos filhotes contidos não pode ser determinado (Tabela 1).

5.2 CRESCIMENTO BACTERIANO E ISOLAMENTO DE *ESCHERICHIA COLI*

Houve crescimento bacteriano em 83,3% (35/42) das amostras clínicas estudadas, sendo que 40% (14/35) dos isolados eram provenientes de coana e 60% (21/35) de cloaca. Sete amostras clínicas (16,6%, 7/42) não apresentaram crescimento de bactérias. Isolou-se *E.coli* como única bactéria em 60,0% (21/35) dos sítios e em apenas um deles (n° 54) (2,8%; 1/35) se observou crescimento misto. Com relação aos sítios de isolamento de *E. coli,* 18,1% (4/22) eram de coana, e 81,8% (18/22) de cloaca. Nos 37,1% (13/35) restantes em que ocorreu crescimento bacteriano, foram isoladas diferentes enterobactérias em 76,9% (10/13), e em 30,7% (4/13) isolou-se não enterobactérias (Figura 6). Das 22 amostras clínicas com crescimento de *E. coli*, três placas foram perdidas nos procedimentos laboratoriais. Das 18 restantes, foram selecionadas três a oito colônias bacterianas para a

pesquisa de genes de virulência, de maneira que foram mantidas e pesquisadas 67 cepas de *E. coli* (Tabela 2).

5.3 PESQUISA DE MARCADORES DE VIRULÊNCIA

A pesquisa dos genes de virulência, conforme descrito no Item 4.6.1, foi realizada em um total de 67 cepas de *E. coli* obtidas a partir de 18 amostras colhidas. Em apenas 8,9% (6/67) dos isolados, obtidos de duas amostras clínicas, não foi detectado nenhum fator de virulência. Dos 61 isolados que apresentaram fatores de virulência, a seqüência *fimH* (fimbria do tipo 1) foi a de maior prevalência, sendo detectada em 98,3% (60/61) dos isolados. As seqüências *papC* (fímbria P) e *iucD* (aerobactina) estiveram presentes em 13,1% (8/61) das cepas cada.

Os marcadores para yersiniabactina (*fyuA*) e para invasina (*ibeA)* foram detectados em 45,9% (28/61) e 19,6% (12/61) dos isolados, respectivamente. Com relação ao marcador de resistência ao soro, *traT,* 31,1% (19/61) dos isolados foram positivos. Já, a seqüência relacionada ao plasmídeo ColV (*cvaC*) esteve presente em 22,9% (14/61) das cepas. Finalmente, em 52,4% (32/61) dos isolados foi detectado o gene *malx*, que caracteriza a ilha de patogenicidade de *E. coli* uropatogênica,PAI_{CFT073} (Figura 7).

Em 50,8% (31/61) das amostras houve associação de, no mínimo, três marcadores de virulência. Desta forma, entre os 61 isolados positivos para genes de virulência foram caracterizados 15 diferentes perfis, sendo a associação *fimH, malX* e *fyuA* a mais freqüente entre as estudadas, estando presente em 27,8% (17/61) dos isolados (Figura 8).

5.4 SOROTIPAGEM

A sorotipagem foi feita para todos os isolados que apresentavam fatores de virulência (n=61). Foi possível identificar 12 sorogrupos e 10 sorotipos diferentes, sendo que em 27,8% (17/61) dos isolados não foi possível tipificar o antígeno O.

Entre os isolados em que os sorogrupos foram identificados (n=44), o O1 foi o de maior prevalência com 22,7% (10/44), sendo que todas as cepas eram pertencentes ao sorotipo O1:H6. Seis destas 10 cepas, eram provenientes de dois indivíduos do Arquipélago de Alcatrazes (um filhote e uma fêmea adulta) e quatro oriundas de dois indivíduos (filhotes) da Ilha de Castilho.

Os sorotipos O2:H7, O25:H4 e O102:H10 foram encontrados em 9% (4/44) cada. Três cepas de cada um dos seguintes sorotipos, O8:H23, O13:H4, O49:H49, O73:H41, O88:H1 e O179:H21 foram tipificadas, perfazendo 6,8% (3/44) das amostras cada. Apenas uma cepa pertencia ao sorogrupo O24, representando 2,2% dos isolados (1/44) (Tabela 2).

Seis cepas com antígeno O não-tipável possuíam o antígeno H7 e outras seis o antígeno H10.

5.5 ANTIBIOGRAMA

Os resultados obtidos na pesquisa de resistência das amostras bacterianas isoladas, frente aos antimicrobianos selecionados encontram-se na tabela 3 e figura 9. Como referido no item 4.4, uma cepa recém isolada de cada um dos sítios foi utilizada para a pesquisa de resistência aos antimicrobianos (exceto o sítio de número 36, em que as amostras foram perdidas), portanto, 21 cepas foram testadas. Destas, 33,3% (7/21) apresentaram resistência a antimicrobianos, sendo observada resistência a Tetraciclina em 28,6% (6/21) das cepas. Duas delas (sorotipos O1:H6 e O179:H21 – cloaca e coana, respectivamente), foram isoladas de amostras das duas únicas fragatas fêmeas adultas investigadas no presente trabalho e oriundas do Arquipélago de Alcatrazes, as outras quatro, provenientes de filhotes.

Entre as amostras colhidas na Ilha de Castilho apenas uma, obtida a partir de material cloacal de um filhote e caracterizada como sorotipo O1:H6, mostrou resistência intermediária a Nitrofurantoína.

Multi-resistência foi verificada em dois isolados (9,5%) cloacais de filhotes de Alcatrazes com relação a Ampicilina, Amoxacilina e Cefalexina em um isolado (1/21) e a sete diferentes princípios ativos, incluindo Ampicilina, Amoxacilina, Tetraciclina, Norfloxacina, Ciprofloxacina, Enrofloxacina e Cotrimoxazol, além de sensibilidade intermediária a outros dois principios ativos (Cloranfenicol e Estreptomicina), em outro (1/21).

Das amostras testadas, 60,1% (14/23) foram sensíveis a todos os 18 tipos de antibióticos pesquisados. Em relação à sensibilidade intermediaria, observamos somente 13% das amostras (3/23) com esta característica.

5.6 FILOGENIA

A tabela 4 distribui os resultados filogenéticos obtidos no presente trabalho e a figura 10 mostra os genes de virulência encontrados em cada grupo filogenético. Das 61 cepas isoladas e entre os 15 perfis de virulência caracterizados, uma cepa representante de cada amostra e/ou cepas com perfis de virulência distintos, dentro da mesma amostra, foram selecionadas para a pesquisa dos grupos filogenéticos, totalizando 27 isolados distintos pesquisados.

Apenas uma cepa (3,7%; 1/27), oriunda de amostra cloacal de um filhote da Ilha de Alcatrazes e positiva para os genes *fyuA, fimH* e *cvaC,* foi classificada no grupo filogenético A.

No grupo filogenético B1 encontram-se quatro isolados provenientes de três animais diferentes da ilha de Alcatrazes (dois filhotes e uma fêmea adulta). Em 100% (4/4) observou-se a presença do gene *fimH* e em 50% (2/4) a associação de *fimH* e *traT*. Os sorotipos encontrados são O8:H23, O102:H10 e O179:H21.

Dez cepas (37,0%; 10/27), oriundas de sete filhotes do Arquipélago de Alcatrazes, foram classificadas no grupo filogenético B2. Estas amostras apresentaram associação de três até sete fatores de virulência. A característica dominante (100%; 10/10) para as cepas do grupo B2 foi a presença do marcador

para a ilha de patogenicidade PAI_{CFT073} (*malX*). A segunda maior prevalência neste grupo filogenético foi de *fimH,* com 90% (9/10), seguida de *fyuA* e *ibeA,* ambos com 70% (7/10) cada. Ainda, *traT* e *cvaC* estiveram presentes em 50% (5/10) cada, e *papC e iucD* em 30% (3/10) cada.. Vale ressaltar que o grupo B2 foi o único que apresentou o genes *ibeA* e *iucD,* que codificam uma invasina e um sideróforo. Os sorotipos encontrados neste grupo filogenético foram: O2:H7, O13:H4 e O25:H4 sendo que em 50% (5/10) não foi possível a tipificação do antígeno O (ONT:H7, ONT:H14).

O grupo filogenético D foi representado por 44,4% (12/27) das cepas estudadas. Cinco isolados de duas amostras colhidas de filhotes na Ilha de Castilho foram classificadas neste grupo, sendo que ainda encontram-se mais sete isolados colhidos de cinco indivíduos de Alcatrazes (uma fêmea adulta e quatro filhotes). O gene *fimH,* que caracteriza a fimbria do tipo 1, teve prevalência de 100% (12/12) entre as cepas deste grupo. Os genes *malX* e *fyuA*, com 41,6% (5/12) de prevalência cada um, apresentaram-se associados em 80% (4/5), e uma destas apresentou ainda a associação do gene *traT*. O gene *traT* também esteve presente em uma das cepas em que foi detectada a sequência *cvaC* para a colicina V , sendo este o único relato de positividade para este gene no grupo D. Os sorotipos correspondentes foram: O1:H6, O24:H-, O49:H49, O73:H41, O88:H1, O169:H- e 25% (3/12) não teve o antígeno O tipificado (ONT:H10, ONT:H18 e ONT:H23).

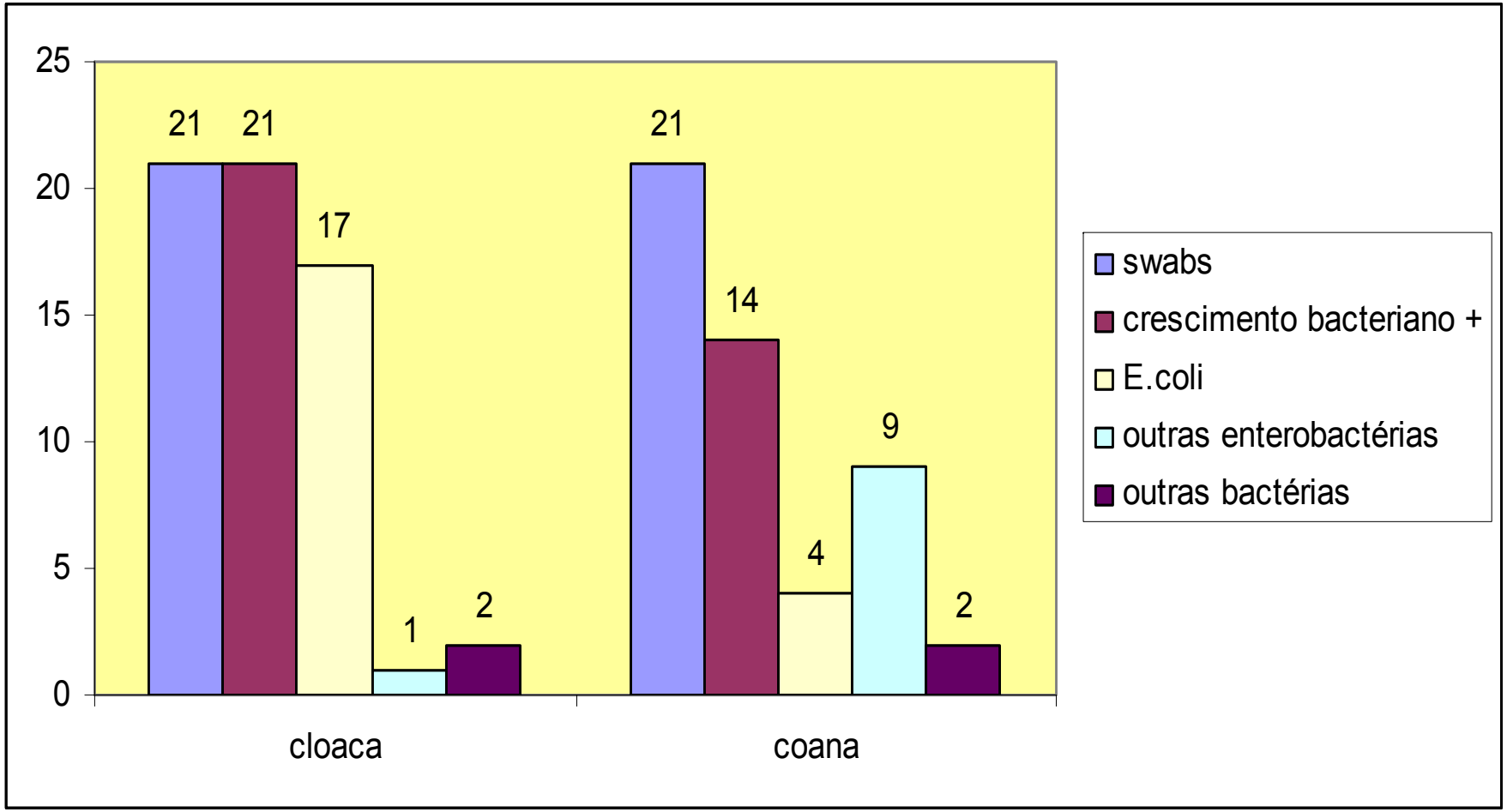


Figura 6 - Distribuição da ocorrência de crescimento bacteriano a partir de 42 amostras clinicas (*swabs*) colhidas de cloaca e coana de fragatas (*Fregata magnificens*), em função dos tipos bacterianos identificados - São Paulo - 2008/2009

Tabela 1 - Distribuição das 42 amostras clinicas colhidas através de *swabs* de cloaca e coana de fragatas (*Fregata magnificens*), segundo sítio geográfico de colheita, tipo de bactéria isolada em agar MacConkey, identificação bacteriana e cepas identificadas - São Paulo - 2008/2009 (Continua)

Local	Amostra	Sexo(a,b)	Origem	Tipo (c)	Identificação (d)	Cepas
Alcatrazes	21	fêmea	cloaca	21 (Lac -)	*E.coli*	**21A, 21B, 21C**
	22		coana	SC		
	23	Ind.	cloaca	23 (Lac -)	*NE*	
	24		coana	SC		
	25	Ind.	cloaca	25 (Lac +)	*E.coli*	**25A, 25B, 25C**
	26		coana	26/1 (Lac -)	*Serratia sp.*	
				26/2 (Lac +)	*Citrobacter freundii*	
				26/3 (Lac +)	*Serratia liquefaciens*	
	27	Ind.	cloaca	27 (Lac +)	*E.coli*	**27B, 27C, 27D**
	28		coana	SC		
	29	Ind.	cloaca	29 (Lac +)	*E.coli*	**29A, 29B, 29C**
	30		coana	SC		
	31	Ind.	cloaca	31 (Lac -)	*E.coli*	**31C, 31F, 31/1A, 31/1E, 31/1L**
	32		coana	SC		
	33	Ind.	cloaca	33 (Lac +)	*E.coli*	**33A, 33B, 33C**
	34		coana	SC		
	35	Ind.	cloaca	35 (Lac +)	*E.coli*	**35A, 35B, 35E**
	36		coana	36 (Lac -)	*E.coli*	NR
	37	Ind.	cloaca	37 (Lac -)	*E.coli*	NR
	38		coana	38 (Lac -)	*Citrobacter freundii*	
	39	Ind.	cloaca	39/1 (Lac +)	*E.coli*	**39/1A, 39/1B, 391C,**
				39/2 (Lac -)	*E.coli*	**39/2A, 39/2B, 39/2C**
	40		coana	40 (Lac -)	*Citrobacter freundii*	
	41	Ind.	cloaca	41 (Lac +)	*E.coli*	AMOSTRA PERDIDA
	42		coana	SC		
	43	Ind.	cloaca	43 (Lac +)	*E.coli*	**43A, 43B, 43C**
	44		coana	44 (Lac -)	*E.coli*	**44A, 44B, 44C**
	45	Ind.	cloaca	45 (Lac +)	*E.coli*	**45B, 45C, 45H**
	46		coana	46 (Lac -)	*Citrobacter freundii*	
	47	Ind.	cloaca	47 (Lac +)	*E.coli*	**47F, 47G, 47H**
	48		coana	48 (Lac -)	*NE*	

(Conclusão)

Local	Amostra	Sexo(a,b)	Origem	Tipo (c)	Identificação (d)	Cepas
Alcatrazes	49	indefinido	cloaca	49 (Lac +)	*E.coli*	**49A, 49B, 49C**
	50		coana	50 (Lac -)	*Serratia liquefaciens*	
	51	indefinido	cloaca	51 (Lac +)	*E.coli*	**51A, 51B, 51C**
	52		coana	52/1 (Lac +)	*Hafnia alvei*	
				52/2 (Lac -)	*Citrobacter freundii*	
	53	indefinido	cloaca	53 (Lac +)	*E.coli*	**53B, 53G, 53H**
	54		coana	54/1 (Lac +)	*E.coli*	**54/1A, 54/1C, 54/1F**
				54/2 (Lac -)	*Citrobacter diversus*	
	133	macho	cloaca	133 (Lac -)	*Hafnia alvei*	
	134		coana	134 (Lac -)	*NE*	
	135	femea	cloaca	135 (Lac -)	*NE*	
	136		coana	136/1 (Lac +)	*E.coli*	**136/1E, 136/1F, 136/1G**
Castilho	55	indefinido	cloaca	55 (Lac -)	*E. coli*	**55B, 55C, 55E**
	56		coana	56 (Lac -)	*Hafnia alvei*	
	57	indefinido	cloaca	57/1(Lac +)	*E.coli*	**57/1AB, 57/1C, 57/1D**
				57/2 (Lac +)	*E.coli*	**57/2A, 57/2B, 57/2C**
				57/3 (Lac + tardia)	*E.coli*	**57/3A, 57/3B**
	58		coana	58 (Lac -)	*Hafnia alvei*	

(a) Ind. : Sexo indeterminado;
(b) Todos animais de sexo indefinido eram filhotes; os demais eram adultos.
(c) (Lac-), colônias lactose negativa em ágar MacConkey; (Lac+), colônias lactose positiva em Agar MacConkey;
SC: Sem crescimento de enterobactéria;
(d) NE: não enterobactéria.
NR: Não realizado.
E. coli: Escherichia coli

Tabela 2 - Distribuição dos 61 isolados de *Escherichia.coli* obtidos de fragatas (*Fregata magnificens*), segundo local de origem, sitio anatômico de colheita, sorotipagem e positividade aos fatores de virulência pesquisados - São Paulo - 2008/2009
(Continua)

Local	Origem	Número de Referência	Sorotipo	*papC*	*fyuA*	*iucD*	*ibeA*	*fimH*	*malX*	*traT*	*colV*
Alcatrazes	cloaca	21A	O1:H6					+	+		
		21B	O1:H6					+	+		
		21C	O1:H6					+	+		
	cloaca	27B	O25:H4		+		+	+	+	+	+
		27C	O25:H4		+		+	+	+	+	+
		27D	O25:H4		+		+	+	+	+	+
	cloaca	29A	ONT:H7		+		+		+		
		29B	ONT:H7		+		+	+	+		
		29C	ONT:H-		+			+		+	+
	cloaca	31C	O2:H7	+	+	+	+	+	+	+	+
		31F	O2:H7	+	+	+	+	+	+	+	+
		31/1A	O2:H7	+		+	+	+	+	+	+
		31/1E	O2:H7	+		+	+	+	+	+	+
		31/1L	O2:H7	+		+	+	+	+	+	+
	cloaca	33A	O49:H49					+			
		33B	O49:H49					+			
		33C	O49:H49					+		+	+
	cloaca	35A	ONT:H7	+	+	+		+	+	+	+
		35B	ONT:H7	+	+	+		+	+	+	+
		35E	ONT:H7	+	+	+		+	+	+	+
	cloaca	39/1A	O73:H41					+			
		39/1B	O73:H41					+			
		39/1C	O73:H41					+			
		39/2 A	O1:H6		+			+	+		
		39/2B	O1:H6		+			+	+		
		39/2C	O1:H6		+			+	+		

(Conclusão)

Local	Origem	Número de Referência	Sorotipo	*papC*	*fyuA*	*iucD*	*ibeA*	*fimH*	*malX*	*traT*	*colV*
Alcatrazes	cloaca	43A	O24:H-					+			
		43B	O169:H-					+			
		43C	O169:H-					+			
	cloaca	45 B	O13:H4		+			+	+		
		45C	O13:H4		+			+	+		
		45H	O13:H4		+			+	+		
	cloaca	47F	ONT:H10		+			+			
		47G	ONT:H10		+			+			
		47H	ONT:H18		+			+			
	cloaca	49 A	ONT:H14		+			+	+		
		49B	ONT:H14		+			+	+		
		49C	ONT:H14		+			+	+		
	cloaca	51 A	O8:H23					+			
		51B	O8:H23					+			
		51C	O8:H23					+			
	cloaca	53B	O25:H4				+	+	+	+	+
		53G	ONT:H7				+	+	+		
		53H	O102:H10					+		+	
	coana	54/1 A	O102:H10					+		+	
		54/1C	O102:H10					+		+	
		54/1F	O102:H10					+		+	
	coana	136/1E	O179:H21					+			
		136/1F	O179:H21					+			
		136/1G	O179:H21					+			
Castilho	cloaca	55B	O1:H6		+			+	+		
		55C	O1:H6		+			+	+		
		55E	O1:H6		+			+	+		
	coana	57/1AB	O88:H1					+			
		57/1C	O88:H1					+			
		57/1D	O88:H1					+			
		57/2 A	ONT:H23					+			
		57/2B	ONT:H23					+			
		57/2C	ONT:H23					+			
		57/3 A	ONT:H23		+			+	+		
		57/3B	O1:H6		+			+	+	+	

a. Os isolados não apresentaram positividade para os genes de virulência *stx1, stx2, eae, cnf, hly, iha, sfa, pap E,F.*
b. Os isolados de número 25A, 25B, 25C, 44A, 44B e 44C não apresentaram nenhum dos genes de virulência pesquisado

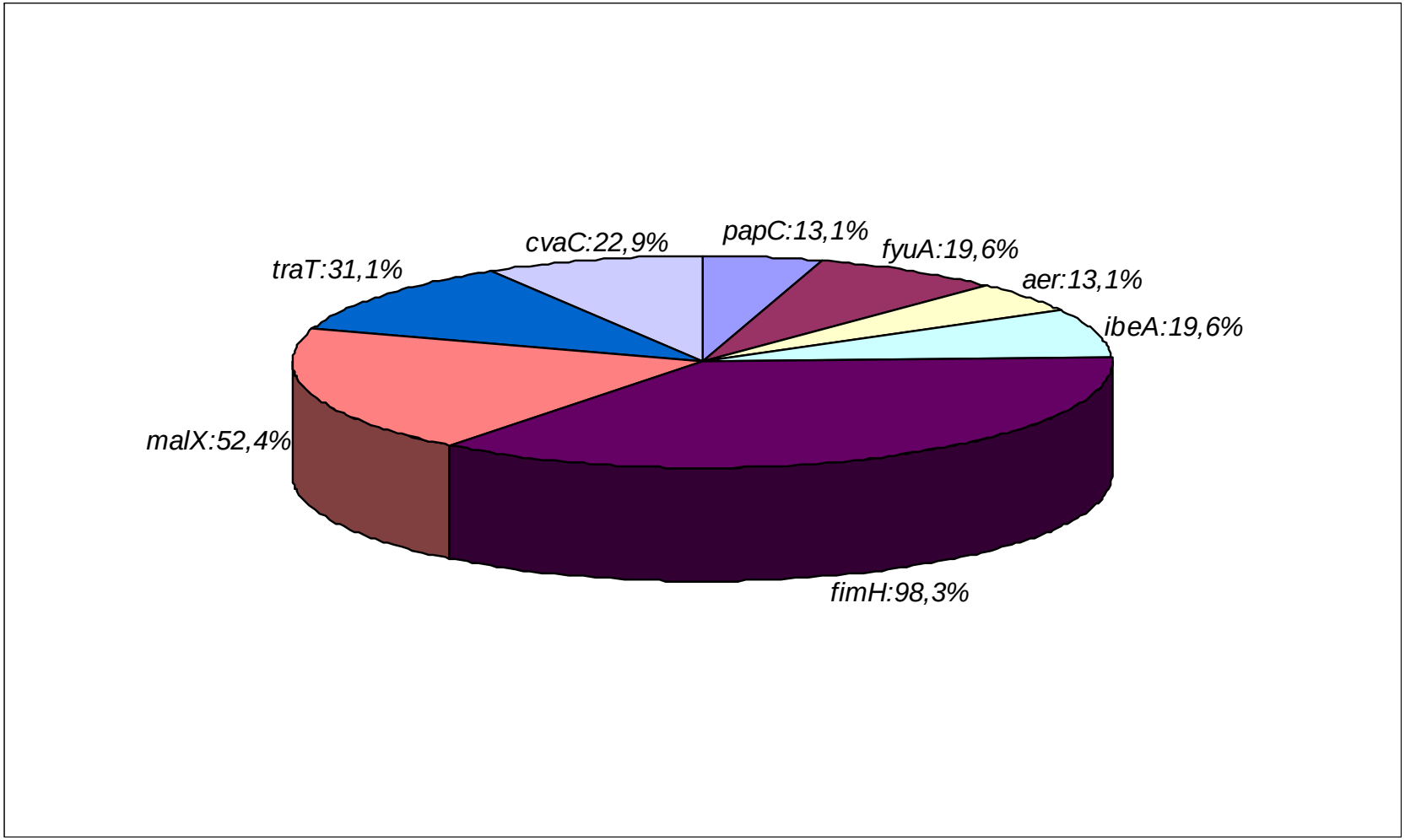


Figura 7 - Distribuição percentual de genes de virulência detectados nas 61 cepas de *Escherichia coli* estudadas - São Paulo - 2008/2009

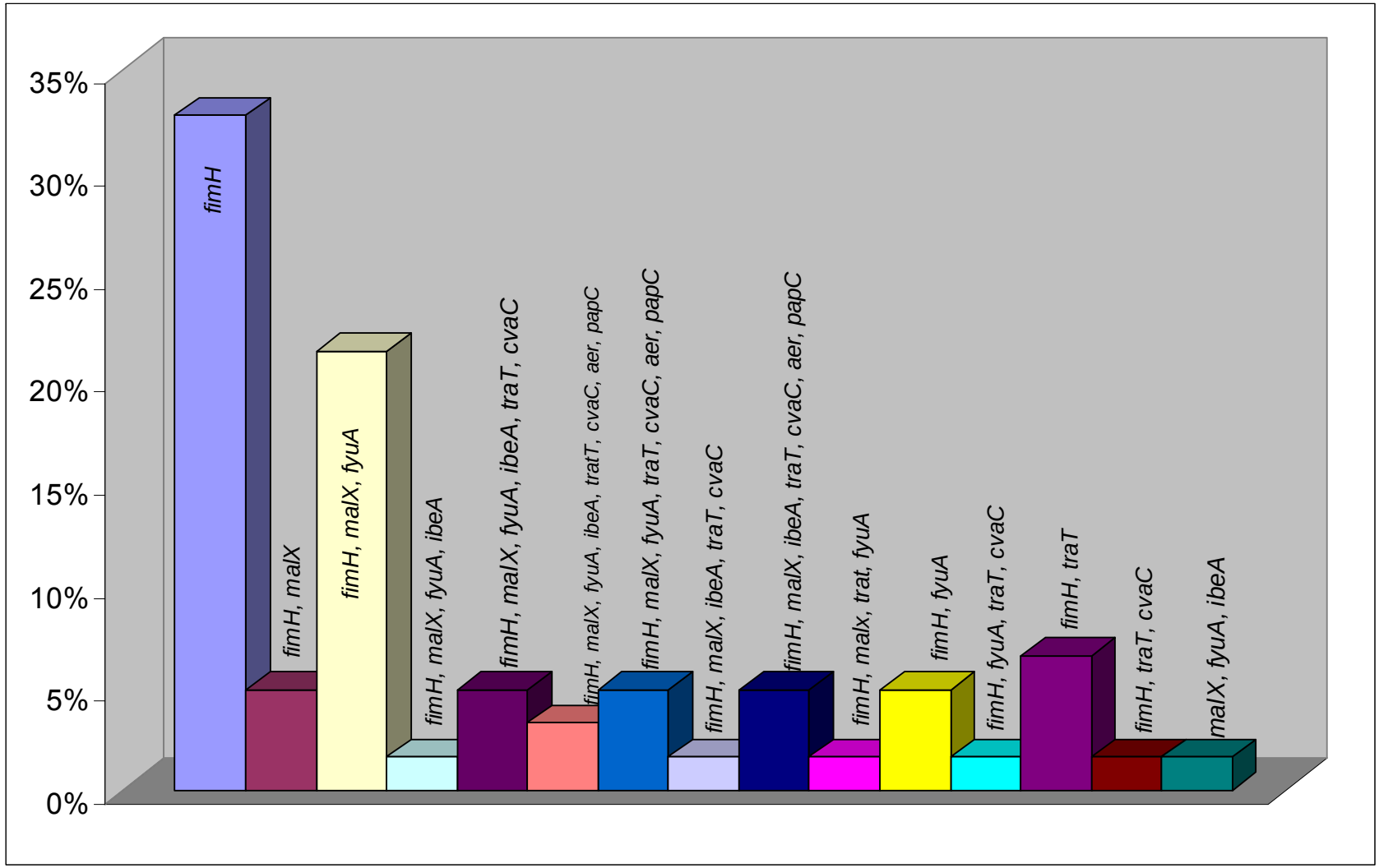


Figura 8 - Distribuição percentual de 61 cepas de *Escherichia coli* isoladas de cloaca e coana de fragatas (*Fregata magnificens*), segundo os perfis de virulência apresentados - São Paulo - 2008/2009

Tabela 3 - Distribuição do padrão de resistência/sensibilidade frente à antimicrobianos selecionados dos 21 isolados de *Escherichia coli* obtidos de fragatas (*Fregata magnificens*), em função dos sítios geográfico e anatômico de colheita - São Paulo - 2008/2009

Local	Animal	Sítio anatômico	Amp	Amo	Cfe	Cfo	Ctx	Ctf	Tet	Clo	Nit	Pol	Est	Neo	Gen	Ami	Nor	Cip	Eno	Sut
Alcatrazes	21	cloaca	s	s	s	s	s	s	R	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s
	25	cloaca	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s
	27	cloaca	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s
	29	cloaca	s	s	s	s	s	s	R	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s
	31	cloaca	R	R	R	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s
	33	cloaca	s	s	s	s	s	s	R	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s
	35	cloaca	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s
	37	cloaca	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s
	39	cloaca	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s
	41	cloaca	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s
	43[a]	cloaca	s	s	s	s	s	s	R	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s
	44[a]	coana	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s
	45	cloaca	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	I	s	s	s	s	s	s	s
	47	cloaca	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s
	49	cloaca	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s
	51	cloaca	R	R	s	s	s	s	R	I	s	s	I	s	s	s	R	R	R	R
	53[b]	cloaca	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s
	54[b]	coana	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s
	136	coana	s	s	s	s	s	s	R	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s
Castilho	55	cloaca	s	s	s	s	s	s	s	s	I	s	s	s	s	s	s	s	s	s
	57/1	cloaca	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s

Legenda: Amp – Ampicilina; Amo – Amoxacilina; Cfe – Cefalexina; Cfo – Cefoxitina; Ctx – Cefotaxima; Ctf – Ceftiofur; Tet – Tetraciclina; Clo – Cloranfenicol; Nit – Nitrofurantoína; Pol – Polimixina B; Est – Estreptomicina; Gen – Gentamicina; Ami – Amicacina; Neo – Neomicina; Nor – Norfloxacina; Cip – Ciprofloxacina; Eno – Enrofloxacina; Sut – Cotrimazol; R – Resistente; s – Sensível; I – Resistência Intermediária.

a. Mesmo indivíduo

b. Mesmo indivíduo

Tabela 4 - Distribuição de 27 cepas de *Escherichia coli* isoladas de fragatas (*Fregata magnificens*), em função dos grupos filogenéticos, sorotipos e genes de virulência encontrados - São Paulo - 2008/2009

Grupo Filogenético	Número de Referência	Sorotipo	*papC*	*fyuA*	*iucD*	*ibeA*	*fimH*	*malX*	*traT*	*colV*
B2	27B	O25:H4		+		+	+	+	+	+
	29A	ONT:H7		+		+		+		
	29B	ONT:H7		+		+	+	+		
	31C	O2:H7	+	+	+	+	+	+	+	+
	31/1A	O2:H7	+		+	+	+	+	+	+
	35A	ONT:H7	+	+	+		+	+	+	+
	45 B	O13:H4		+			+	+		
	49 A	ONT:H14		+			+	+		
	53B	O25:H4				+	+	+	+	+
	53G	ONT:H7				+	+	+		
D	21A	O1:H6					+	+		
	33A	O49:H49					+			
	33C	O49:H49					+		+	+
	39/1A	O73:H41					+			
	39/2A	O1:H6		+			+	+		
	43 A	O24:H-					+			
	47F	ONT:H10		+			+			
	55B	O25:H4		+			+	+		
	57/1AB	O88:H1					+			
	57/2 A	ONT:H23					+			
	57/3 A	ONT:H23		+			+	+		
	57/3B	O1:H6		+			+	+	+	
B1	51 A	O8:H23					+	+		
	53H	O102:H10					+		+	
	54/1 A	O102:H10					+		+	
	136/1E	O179:H21					+			
A	29C	ONT:H-		+			+		+	+

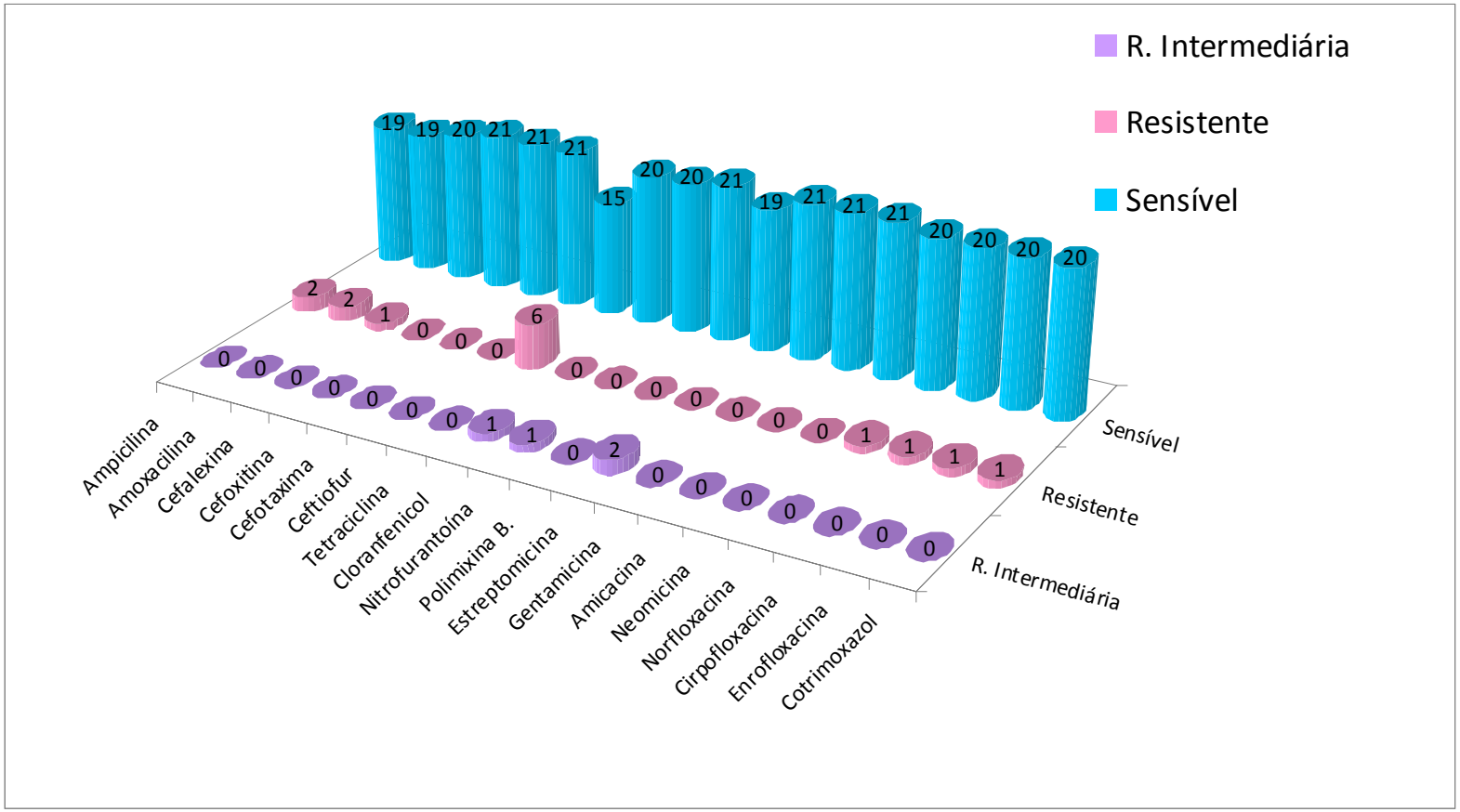


Figura 9 - Distribuição quantitativa do padrão de resistência/sensibilidade de 21 isolados de *Escherichia coli* oriundos de fragatas (*Fregatas magnificens*), frente à antimicrobianos selecionados - São Paulo - 2008/2009

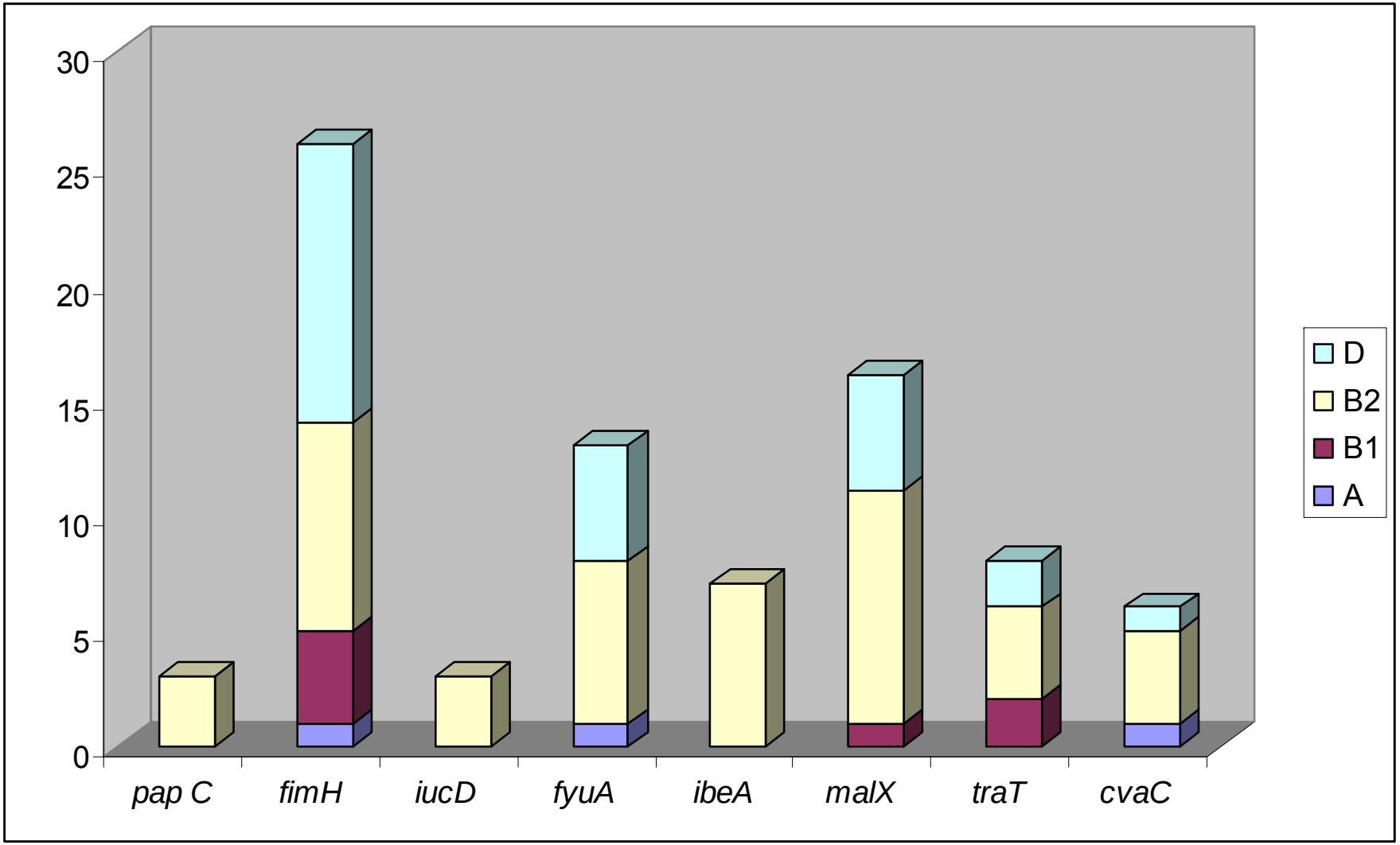


Figura 10 - Distribuição quantitativa das 27 cepas de *Escherichia coli* obtidas de fragatas (*Fregata magnificens*) em relação aos fatores de virulência encontrados em cada grupo filogenético - São Paulo - 2008/2009

6 DISCUSSÃO

O Arquipélago dos Alcatrazes constitui o maior sítio reprodutivo de aves marinhas do sudeste brasileiro, principalmente tratando-se de fragatas. A colônia de fragatas na ilha principal do arquipélago é considerada a maior do Atlântico (PENTEADO, 2009). Tal fato propiciou à primeira expedição à ilha dos Alcatrazes (05 e 06/12/2008) obter o maior numero amostral deste trabalho.

Em contraposição, a segunda expedição (07/04/2009) ao mesmo arquipélago resultou na colheita de apenas quatro amostras, pelo fato dos trabalhos terem sido interrompidos por uma abordagem fiscal do IBAMA a uma embarcação pesqueira que realizava pesca dentro da estação ecológica. Assim toda a expedição foi paralisada e a equipe de pesquisadores teve que voltar ao continente escoltando a embarcação infratora até o cais de São Sebastião.

Já na ilha de Castilho, durante a terceira expedição (07 e 08/01/2009), foi possível colher amostras de apenas dois indivíduos. A ausência de um número representativo de ninhos nesta data impossibilitou a captura prevista das fragatas, uma vez que os indivíduos presentes no local já estavam aptos a realizar vôos, fato que inviabilizou a colheita de um maior número de material. Porém, esta informação representa um novo dado reprodutivo, já que na Ilha de Castilho, neste mesmo período em 2007, reportou-se o encontro de animais em reprodução (Informação pessoal)[11]. Cumpre ressaltar que o biólogo Fausto Pires de Campos, responsável pelo projeto “Estudos para a Conservação de Aves Insulares Marinhas e Residentes em São Paulo, Brasil” e a oceanógrafa Danielle Paludo, responsável pelo projeto “Aves do Lagamar – Levantamento de aves aquáticas da região estuarina de Iguape-Cananéia, São Paulo, Brasil”, realizam anualmente o monitoramento e anilhamento das aves marinhas na Ilha Castilho.

Ambos os sítios de reprodução visitados sofrem ameaças antrópicas. Essas adversidades podem influir na taxa de sobrevivência e no sucesso reprodutivo

[11] Informação fornecida por Fausto Pires de Campos em 08 de janeiro, 2008.

(BRANCO, 2004). O arquipélago dos Alcatrazes está inserido dentro da área DELTA estabelecida pela Marinha do Brasil, sendo que as ilhas da Sapata e dos Alcatrazes são utilizadas para exercícios de bombardeios militares. Os projéteis lançados durante os procedimentos, além do impacto direto na ilha, são capazes de causar incêndios que se alastram com muita facilidade, retardando ou impedindo a regeneração florestal, que é a base para a construção dos ninhos das aves. Em contraposição a esta situação, parte das formações do Arquipélago de Alcatrazes está inserida na Estação Ecológica dos Tupinambás – ESEC Tupinambás, Unidade de Conservação Marinha Federal de Proteção Integral, havendo ainda a proposta de criação de um Parque Nacional Marinho abrangendo todas as ilhas do arquipélago, com vistas à preservação deste ambiente insular único.

A ilha de Castilho, apesar de fazer parte da Estação Ecológica dos Tupiniquins – ESEC Tupiniquins, caracterizada como Unidade de Conservação – UC, ainda é visitada por muitos pescadores que desembarcam e pernoitam na ilha, deixando lixo acumulado e provocando perturbação dos ninhais das fragatas e de outras espécies de aves marinhas. Esta perturbação faz com que os pais levantem vôo e deixem seus ovos e filhotes expostos ao ataque de predadores, assim como à insolação. A fiscalização da UC e o monitoramento constante das colônias reprodutivas por expedições de pesquisadores e pelo IBAMA minimizam estes impactos. Porém a dificuldade de trabalho no ambiente marinho, desde a disponibilidade de recursos à dependência das condições climáticas propícias para a realização de tais expedições, ainda deixa uma lacuna neste panorama.

Além do impacto direto nos ambientes insulares, as ações antrópicas acima mencionadas acarretam outro problema: a proximidade humana com as aves marinhas em geral e, em especial, com as fragatas. Desta forma, uma vez que as fragatas procuram alimento nas imediações do continente, e devido à facilidade para localizar embarcações pesqueiras, estas aves valem-se para a alimentação do descarte de pesca das embarcações, fato que propicia grande aproximação entre as fragatas e as comunidades humanas, favorecendo a cadeia de disseminação de patógenos zoonóticos (SICK, 1997; BRANCO, 2001).

Aves selvagens podem ser reservatórios de muitos agentes e carrear microrganismos transmissíveis a humanos. Além disto, podem estar infestadas por vetores artrópodes, que facilitam a disseminação e dispersão de patógenos, principalmente tratando-se de aves migratórias, situações que podem mostrar-se de grande importância para a saúde pública (REED et al., 2003).

O contato direto com seres humanos nas ilhas, em especial quando estes montam acampamentos de pesca, com o consequente acúmulo de restos alimentares e excretos nos sítios reprodutivos destas aves, pode representar uma potente fonte de disseminação de patógenos tanto para as aves, como das aves para outras espécies e para o ambiente.

Além de ser susceptíveis a enteropatógenos, as aves também podem transmitir esses agentes a outras espécies. Algumas bactérias patogênicas como *Campylobacter jejuni, C. coli, C. lari, Enterococcus* spp. e *Escherichia coli*, têm sido isoladas de amostras de fezes de aves marinhas como gaivotas e aves antárticas, assim como tem sido demonstrada a resistência desses agentes a diferentes antimicrobianos (MAKINO; KOBORI; ASAKURA, 2000; REED et al., 2003; LEOTTA et al., 2006; COSTA et al., 2008; POETA et al., 2008; BONNEDAHL et al., 2009; RADHOUANI et al., 2009).

Gordon e Cowling (2003), em um estudo de prevalência de *E. coli* em vertebrados na Austrália, comprovou que aves que mantêm contato ou vivem próximas aos locais habitados por humanos têm maior possibilidade de albergar *E. coli* que aves que vivem afastadas deste tipo de instalações.

Até onde vai o nosso conhecimento, não existem estudos de campo extensivos sobre o perfil sanitário de aves marinhas no estado de São Paulo.

No presente trabalho, a bactéria *E. coli* foi eleita para a avaliação do perfil sanitário de fragatas capturadas no litoral de São Paulo, uma vez que esta espécie bacteriana pode apresentar marcadores de virulência que conferem patogenicidade para as aves que as albergam, bem como podem representar risco para a saúde pública, devido ao seu papel zoonótico (CARVALHO et al., 2007).

E. coli faz parte da microbiota de aves e mamíferos, incluindo os seres humanos. Cepas patogênicas desta espécie estão associadas a doenças diarréicas, bem como a infecções extra-intestinais em várias espécies (NATARO; KARPER, 1998).

No presente estudo foram avaliados 42 *swabs* de 21 fragatas, sendo 21 de coanas e 21 de cloacas. Deste esforço amostral foram isoladas *E. coli* em 23 das 35 amostras que exibiram crescimento bacteriano, predominantemente de cloaca (81,8%). A pesquisa de marcadores de virulência nas cepas de *E. coli* demonstrou que em apenas dois materiais clínicos (25 e 44) estes não estavam presentes.

Dentre os grupos de *E. coli* diarreiogênicas encontram-se as STEC, caracterizadas por ocasionarem sérios prejuízos a Saúde Pública, uma vez que estão envolvidas em episódios de colite hemorrágica e de síndrome hemolítica urêmica, esta última levando à ocorrência de altas taxas de mortalidade humana (KARPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

Os ruminantes, em especial os bovinos, constituem os reservatórios naturais destas cepas (KARPER; NATARO, 2004). Existem, entretanto, na literatura estudos revelando que outras espécies animais podem carrear estes patógenos, tendo sido demonstrado que pássaros, gaivotas e pombos podem albergar cepas de STEC (MAKINO; KOBORI; ASAKURA, 2000; MORABITO et al., 2001; FOSTER et al., 2006).

Makino et al. (2000), a partir de 50 amostras de fezes frescas de gaivotas do Japão encontraram duas amostras de sorotipos O136:H16 e O153:H positivas para o gene *stx*, que caracteriza a produção de toxina de Shiga.

Foster et al. (2006) detectaram em um isolado de 231 amostras de fezes colhidas de aves silvestres na Escócia, os genes *eae, stx* e *hlyA*; esta cepa foi caracterizada no sorogrupo O157.

No presente estudo pesquisou-se os marcadores de virulência para STEC, *stx1, stx2* e *eae,* nos isolados de fragatas, não tendo sido identificado estes genes em nenhuma das cepas estudadas. Devido ao número relativamente pequeno de animais estudados, não é possível afirmar que estas aves, bem como os ambientes insulares onde elas habitam, estejam isentos de cepas de STEC, uma vez que tem sido demonstrado que estas bactérias estão presentes em ambientes onde ocorre a interferência humana (MAKINO; KOBORI; ASAKURA, 2000; MORABITO et al., 2001), especialmente em locais onde a contaminação ambiental com dejetos humanos e de animais de produção estão presentes (GARCÍA-ALJARO et al., 2005). Estudos complementares, envolvendo tanto um número maior de amostras, como uma maior

diversidade de espécies aviárias, são necessários para esclarecer sobre a ocorrência de cepas de STEC nestas populações de aves.

A colibacilose aviária se caracteriza como uma infecção extra-intestinal. Esta enfermidade é responsável pelas maiores perdas econômicas contabilizadas pela indústria aviária e é ocasionada por um grupo de *E. coli* patogênica extra-intestinal, denominada APEC (DHO-MOULIN; FAIRBROTHER, 1999).

Estudos recentes, comparando amostras isoladas de casos de colibacilose aviária e infecções urinárias/meningite/septicemia humanas, demonstraram que estas cepas não podem ser distinguidas filogeneticamente, situação que sugeriu o potencial zoonótico destas (MOULIN-SCHOULEUR et al., 2007; JOHNSON et al., 2008).

Parte dos estudos existentes de *E. coli* patogênica para aves foi realizada com amostras provenientes de animais com doença aparente ou apresentando lesões *post-mortem* (NGELEKA et al., 1996; GINNS et al., 2000; ROCHA et al., 2008; RODRIGUEZ-SIEK et al., 2005a, b; MOULIN-SCHOULEUR et al., 2007). No presente estudo, todos os isolados de *E. coli* eram provenientes de amostras da microbiota de fragatas aparentemente sadias, sendo a grande maioria (81,8%) oriunda da microbiota cloacal. Porém, 18,2% (4/22) das *E. coli* isoladas faziam parte do trato respiratório superior das mesmas (coana). Gross, em 1994, descreveu que, na maioria das vezes, infecções causadas por *E. coli* patogênica para aves estão associadas com o trato respiratório superior ou infecções sistêmicas. Porém no presente estudo, das amostras isoladas de coana apenas aquelas provenientes de 2 animais (54/1 e 136/1) apresentaram fatores de virulência. As cepas 54/1A, 54/1C e 54/1F eram provenientes de um filhote e somente foram positivas para o gene de virulência *fimH* (fimbria do tipo 1), tendo sido classificadas como sorotipo O102:H10. As cepas 136/1E, 136/1F e 136/1G eram provenientes de uma fêmea adulta e continham a associação dos genes *fimH* e *traT,* sendo que todas eram do sorotipo O179:H21. Todas as cepas acima mencionadas foram filogeneticamente classificadas no grupo B1 e eram provenientes do arquipélago dos Alcatrazes.

Rodriguez-Siek et al. (2005b), em trabalho realizado com 451 cepas de *E. coli* isoladas de perus e galinhas com colibacilose, e 104 cepas isoladas de fezes de aves sadias, observaram que alguns genes de virulência estavam presentes em percentuais

significantemente elevados nos isolados de casos clínicos, sugerindo que estes podem representar importantes marcadores de virulência para as cepas patogênicas.

No presente estudo, entre os genes encontrados nas cepas de *E. coli* isoladas das fragatas, destaca-se o *fimH* com 98,3% entre os isolados. Esta sequência relacionada à fímbria do tipo 1 tem sido encontrada igualmente em amostras aviárias isoladas de indivíduos sadios, assim como de espécimes doentes (KNÖBL et al., 2004; RODRIGUEZ-SIEK et al., 2005b), embora tenha sido aventado o importante papel desta fímbria na colonização inicial da traquéia das aves, facilitando a posterior manifestação de outros fatores de virulência (POURBAKHSH et al., 1997).

Ainda em relação às adesinas, a sequência *papC,* relacionada à fimbria P, esteve presente em 13,1% dos isolados de cloaca de duas aves de Alcatrazes; em uma destas aves as cepas foram sorotipadas como O2:H7, enquanto na outra não foi possível identificar o antígeno O, tendo esta também, o antígeno H7. Em ambos os animais as cepas foram caracterizadas no grupo filogenético B2.

Estes resultados se assemelham aos obtidos por Knöbl et al. (2004), nos quais foi verificada a seqüência *papC* em 16% dos isolados de frangos com sinais de doença causada por *E. coli*. Estes autores, em 2008, detectaram uma porcentagem maior (30%) de cepas com este gene em isolados de papagaios com colibacilose, porém pertencentes a sorogrupos diferentes (O64, O54). Ainda, em estudo realizado em 2008 em nosso meio, Rocha et al. (2008) encontraram o gene *papC* em 24,6% das cepas de *E.coli* provenientes de frangos com colibacilose, porém neste estudo não foram realizados sorotipagem e caracterização filogenética. Vale ressaltar que este gene é comum entre cepas de UPEC, especialmente aquelas relacionadas à pielonefrite e, nas amostras de origem aviária, está relacionado à colonização de órgãos internos e aos sorogrupos O1, O2 e O78 (DHO-MOULIN; FAIRBROTHER, 1999; MELLATA et al., 2003), tendo sido a sua presença relacionada a um percentual significativamente maior de amostras isoladas de doença clínica do que de microbiota (RODRIGUEZ-SIEK et al., 2005a).

No presente trabalho, a segunda maior prevalência entre os genes pesquisados foi representado por *malX,* com 52,4% entre as cepas de *E. coli* de fragatas. Este gene, que caracteriza a ilha de patogenicidade PAI_{CFT073} de UPEC, esteve presente em 64,7%

(11/17) dos materiais clínicos dos quais se isolou *E. coli* para a pesquisa de genes de virulência. Esta sequência esteve presente em todas as cepas que foram classificadas no grupo filogenético B2, em quatro cepas do grupo D e em uma cepa do grupo B1, sempre associada a outros genes de virulência. As PAIs, embora inseridas no cromossomo bacteriano, podem ser consideradas elementos móveis, uma vez que sofrem transferência entre bactérias. Tal fenômeno levanta a hipótese de que PAIs encontradas em cepas de UPEC, também possam ser encontradas entre cepas de outros patotipos extra-intestinais (OELSCHLAEGER; DOBRINDT; HACKER, 2002).

Os resultados obtidos no presente estudo quanto a sequência *malX* indicam a presença deste gene em um percentual maior nas cepas isoladas de fragatas, quando comparados com resultados obtidos por outros pesquisadores em amostras aviárias. Estudo de cepas isoladas de aves com colibacilose e de microbiota cloacal de animais sadios demonstraram 15,3% e 8,7% deste gene, respectivamente (RODRIGUEZ-SIEK et al., 2005b). Os mesmos autores em estudo comparando amostras de APEC e UPEC verificaram 16,6 % de prevalência deste gene nas 524 cepas APEC estudadas, enquanto que em amostras UPEC a prevalência foi 74,5%. Johnson et al. (2007) verificaram percentuais próximos do gene *malX* aos obtidos neste trabalho, em amostras NMEC e UPEC, mas percentuais inferiores em cepas APEC.

As *E. coli* com propriedades invasivas apresentam sistemas especializados e com elevada afinidade para aquisição de ferro, denominados sideróforos, os quais possibilitam o crescimento bacteriano em ambientes de baixa concentração deste metal (DHO-MOULIN; FAIRBROTHER, 1999). Dois diferentes sideróforos foram pesquisados no presente trabalho: o sistema yersiniabactina, codificado por genes contidos em uma ilha de patogenicidade, cujo gene *fyuA* codifica uma proteína de membrana externa com função de receptar o ferro (HANCOCK; FERRIÈRES; KLEMM, 2008); e o sistema aerobactina, cujo gene *iucC* é um dos quatro envolvidos na biossíntese do sideróforo, estando presentes em grandes plasmídios de virulência (HERRERO; LORENZO; NEILANDS, 1988)

Os genes *fyuA* e *iucD* estiveram presentes em 45,9% e 13,1%, respectivamente, dos isolados de fragatas, sendo que ambos os sistemas foram detectados conjuntamente em 8,3% das cepas. O gene *fyuA* esteve presente em isolados dos

sorotipos O1:H6, O2:H7 e O25:H4 que, por sua vez, foram filogeneticamente classificados entre os grupos B2 e D; enquanto que o gene *iucD* foi detectado predominantemente em cepas do sorotipo O2:H7, pertencentes ao grupo B2. Embora a yersiniabactina seja um importante marcador de virulência para as UPEC, também tem sido relacionada à patogenicidade das APEC (RODRIGUEZ-SIEK et al., 2005a); com relação à aerobactina, este sistema de tem sido descrito como de importância para as amostras patogênicas para aves (RODRIGUEZ-SIEK et al., 2005a, b; JOHNSON et al., 2008) .

A capacidade de invasão da corrente sanguínea e do endotélio cerebral tem sido relacionada às amostras de *E. coli* capazes de ocasionar infecções extra-intestinais. Dentre os fatores de virulência que conferem esta característica encontra-se uma invasina, cujo gene codificador é o *ibeA*. Este foi significantemente relacionado com cepas patogênicas para aves, mas não com as amostras apatogênicas (GERMON et al*.,* 2005).

No trabalho em discussão, a presença do marcador *ibeA* esteve presente em 20% das cepas estudadas e associadas aos sorotipos O2:H7 e O25:H4. Germon et al. (2005) verificou que este gene estava presente em 26% das 213 cepas de APEC estudadas e relacionadas aos sorogrupos O2, O18 e O88. Por outro lado, Rodriguez-Siek et al. (2005b) encontraram 14,4% de prevalência do gene *ibeA* entre 451 cepas de APEC estudadas.

Ainda relacionado com cepas invasoras, a lipoproteína TraT de membrana externa, codificada pelo gene *traT,* tem se mostrado de grande importância uma vez que aumenta a resistência bacteriana à ação lítica do complemento, conferindo resistência frente ao soro (SUKUPOLVI; O'CONNOR, 1990). No presente trabalho, o gene *traT* teve 31,1% de prevalência entre os isolados, estando presente em grande diversidade de sorotipos (O25:H4, O2:H7, O49:H49, O102:H10 e O1:H6) e em todos os grupos filogenéticos. As cepas de APEC estudadas por Rodriguez-Siek et al. (2005b) e Johnson et al. (2007) apresentavam 78% de prevalência de *traT.* Rodriguez-Siek et al. (2005 b) ressaltam, ainda, que a presença de *traT* esteve associada com o gene *cvaC* entre cepas de APEC. Ambos os genes fazem parte do mecanismo de resistência a efeitos bactericidas do soro, e normalmente estão associadas à aves com quadros de

septicemia (GROSS, 1994). Mais especificamente o gene *cvaC* está relacionado à produção de colicinas, e está inserido em plasmídios conhecidos como Col fatores (ColV). A colicina V é encontrada principalmente em cepas virulentas extra-intestinais, causando doenças em humanos e animais (LIOR, 1994).

No caso das fragatas observou-se a presença do gene *cvaC* em 22,9% dos isolados, estando quase que na sua totalidade associado ao gene *traT*. Esta porcentagem coincide com os valores encontrados por Rocha et al. (2008), que detectaram a presença de *cvaC* em 23% das amostras estudadas provenientes de 61 isolados de frangos com quadro compatível com colibacilose.

Segundo estudos realizados por MLEE (*Multi-Locus Enzyme Electrophoresis*) demonstrou-se que as *E. coli* podem ser agrupadas em quatro principais grupos filogenéticos: A, B1, B2 e D. Amostras patogênicas extra-intestinais, com grande variedade de fatores de virulência, concentram-se nos grupos B2 e D, enquanto amostras comensais no grupo A e B1 (JOHNSON; RUSSO, 2005; LE GALL et al., 2007; MOULIN-SCHULEUR et al., 2007). Entre os isolados das fragatas obtidos no atual trabalho, cerca de 80% das cepas foram classificadas nos grupos filogenéticos B2 e D com 37% e 44,4% de ocorrência, respectivamente.

Dos 12 sorogrupos identificados entre os isolados das fragatas, sete deles coincidem com sorogrupos de APEC encontrados por Rodriguez-Siek et al. (2005 b), sendo eles: O1, O2, O8, O25, O73, O88 e O102. Estudos realizados por diversos autores consideram que cepas de APEC estão predominantemente entre os sorogrupos O1, O2, O5, O8, O18 e O78 (GROSS, 1994; BLANCO et al., 1998; DHO-MOULIN; FAIRBROTHER, 1999). Alguns destes sorogrupos também são frequentes em doenças extra-intestinais humanas como meningites, septicemias e infecções do trato urinário (JOHNSON; RUSSO, 2005; WILES; KULESUS; MULVEY, 2008; NAKAZATO et al., 2009).

Os sorogrupos pouco associados às APEC e isolados das fragatas foram O13, O24, O49, O73 e O179. Porém, entre estes, o sorogrupo O24 foi identificado em 18,75% entre 69 isolados de *E. coli* de aves comerciais contendo a fimbria do tipo 1 e ilha de alta patogenicidade (*HPI – High Pathogenicity Island*) (ZHU; LU; WANG, 2007). Segundo Ramchandani et al. (2005), o sorogrupo O73 está associado a *E. coli*

uropatogênica responsável por infecção no trato urinário (UTI) em humanos. O sorogrupo O179 foi anteriormente descrito em cepas produtoras de verotoxinas e associadas à diarréia sanguinolenta em humanos (SCHEUTZ et al., 2004).

A resistência a antimicrobianos tem se mostrado um sério problema de Saúdes Pública e Animal dos tempos modernos. A utilização indiscriminada de antimicrobianos, como ferramenta terapêutica ou na profilaxia de doenças infecciosas, ou ainda, como promotores de crescimento em animais de produção, tem levado ao aparecimento de cepas resistentes (SCHWARZ; CHASLUS-DANCLA, 2001). As bactérias potencialmente patogênicas para o homem e animais ganham, via de regra, os mananciais aquáticos devido a sua eliminação pelos sistemas de esgotos (BAQUERO; MARTINEZ; CANTÓN, 2008). Desta maneira, é através da água que mais genes de resistência são introduzidos nos sistemas naturais, propiciando sua ampla distribuição ambiental (BAQUERO; MARTINEZ; CANTÓN, 2008).

No tocante à presença de bactérias resistentes em ambientes naturais, os animais selvagens assumem grande importância (MIDDLETON; AMBROSE, 2005; COLE et al., 2005; COSTA et al., 2008; LEMUS et al., 2008; ROSE et al., 2009). Dentre estes, as aves selvagens, em especial as migratórias, são excelentes instrumentos para a disseminação de cepas resistentes (COLE et al., 2005; MIDDLETON; AMBROSE, 2005; ROSE et al., 2009), pois são majoritariamente hospedeiras assintomáticas, além de terem contato direto com diversos animais, alimentos e sítios geográficos. Outro aspecto importante é o fato das aves marinhas manterem estreita associação com ambientes aquáticos, favorecendo desta forma a sobrevivência e propagação de bactérias com genes de resistência.

Segundo Radhouani et al. (2009), cepas de *E. coli* isoladas de gaivotas em Portugal se mostraram resistentes a 11 diferentes antibióticos testados, incluindo Ampicilina, Amoxicilina, Gentamicina, Tobramicina, Amicacina, Streptomicina, Tetraciclina, Trimetorpim, Acido Nalidixico, Ciprofloxacina e Cloranfenicol. O maior percentual de resistência, 43,9%, foi verificado com a ampicilina.

Na atual investigação, dentre as 23 cepas testadas quanto à sensibilidade a antimicrobianos, 34,7% (8/23) mostraram-se resistentes a pelo menos um antibiótico, sendo que 26,1% (6/23) das cepas revelaram-se resistentes à tetraciclina. Tais dados

encontram-se próximos aos reportados por Radhouani et al. (2009), e ratificam a necessidade de se ter particular atenção à possibilidade de disseminação de patógenos resistentes aos antimicrobianos utilizados em medicina humana e veterinária.

Finalizando, os resultados alcançados no presente trabalho evidenciam que a maioria das cepas isoladas de *E. coli* é potencialmente patogênica para as aves, podendo representar significativo risco para sanidade das aves marinhas, além de se configurar como agentes zoonóticos relevantes. Tal fato enfatiza a importância de se investigar a eventual participação das aves selvagens, em especial as marinhas, na cadeia epidemiológica de doenças ocasionadas por *E. coli*. Tais informações poderão nortear as pesquisas de doenças selecionadas nas populações das fragatas, assim como embasar a adoção de eventuais ações em relação a aspectos de saúde animal e humana, que tenham as fragatas como um dos elos.

7 CONCLUSÕES

As principais conclusões obtidas no presente trabalho são:

1. A grande maioria das cepas (61/67 em 18 amostras clínicas) de *Escherichia coli* isoladas a partir das microbiotas de cloaca e coana de fragatas aparentemente sadias apresentou potencial patogênico, com a presença de associações de marcadores de virulência que caracterizam a ExPEC. Tais dados enfatizam o potencial patogênico destas cepas de *E. coli* para as aves marinhas em geral, e fragatas em especial, além de denotar evidente potencial zoonótico.

2. Não foram identificadas cepas de *E. coli* com características de STEC nos isolados pesquisados. Porém, em função do número amostral relativamente reduzido, e da distribuição geográfica das amostras ter sido restrita a dois sítios de nidificação, estudos mais extensivos são necessários para determinar, ou não, a ocorrência de STECs na população de fragatas da costa do Estado de São Paulo.

3. Dentre as 23 cepas testadas quanto à sensibilidade a antimicrobianos, 34,7% (8/23) mostraram-se resistentes a pelo menos um antibiótico, sendo que a tetraciclina revelou-se inefetiva para 26,1% (6/23) das cepas estudadas. Ainda, duas cepas cloacais mostraram resistência múltipla a 3 e 7 antibióticos. Tais dados exigem particular atenção, em especial considerando-se os potenciais patogênico e zoonótico dos isolados pesquisados.

4. A elevada ocorrência de cepas de *E. coli* portadoras de marcadores de virulência característicos de ExPEC, associada a significativa resistência à antimicrobianos verificada nas amostras oriundas de fragatas aparentemente sadias, ratifica a necessidade de se investigar a eventual participação de aves selvagens, em particular as marinhas, na cadeia epidemiológica de doenças ocasionadas por *E. coli.*

REFERÊNCIAS

AB'SABER, A. N. **Litoral do Brasil**. São Paulo: Metalivros, 2001. v. 1, 287p.

ANDREATTI FILHO, L. R. **Saúde aviária e doenças**. São Paulo: Roca, 2007. v. 10, p. 112-117.

ALVES, V. S.; SOARES, A. B. A.; COUTO, G. S. Aves marinhas e aquáticas das ilhas do litoral do estado do Rio de Janeiro. **Aves marinhas e insulares brasileiras**. Itajaí: Univali, 2004. v. 1, n. 1, p. 83-100.

AUSTIN JR., L. O. **Birds of the world**. Barcelona: Western Publishing Company, 1983. p. 47- 49.

BAQUERO, F.; MARTINEZ, J. L.; CANTÓN, R. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. **Science Direct,** v. 19, p. 260-265, 2008.

BLANCO, J. E.; BLANCO, M.; MORA, A.; JANSEN, W. H.; GARCIA, V.; VÁSQUEZ, M. L.; BLANCO, J. Serotypes of *Escherichia coli* isolated from septicaemic chickens in Galicia (northwest Spain). **Veterinary Microbiology,** v. 61, n. 3, p. 229-235, 1998.

BEACHEY, E. H. Bacterial adherence: adhesin-receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surfaces.**The Journal of Infectious Diseases,** v. 143, n. 3, p. 325-345, 1981.

BOGOMOLNI, A.; ELLIS, J.; GAST, R.; HARRIS, B.; POKRAS, M.; TOUHEY, K. MOORE, M. Emerging zoonoses in marine mammals and seabirds of the northeast U.S. **Proceedings Oceans,** Boston: MA, v. 18, n. 21, p. 1-5, 2006.

BONNEDAHL, J.; DROBNI, M.; GAUTHIER-CLERC, M.; HERNANDEZ, J.; GRANHOLM, S.; KAYSER, Y.; MELHUS, A.; KAHLMETER, G.; WALDENSTRÖM, J.; JOHANSSON, A.; OLSEN, B. Dissemination of *Escherichia coli* with CTX-M type ESBL between humans and yellow-legged gulls in the south of France. **PLoS ONE,** v. 4, n. 6, p. 1-6, 2009.

BRANCO, J. O. **Aves marinhas e insulares brasileiras biologia e conservação**. Itajaí: Univali. 2004. p. 266.

CAMPOS, F. P.; PALUDO, D.; FARIA, P. J.; MARTUSCELLI, P. Aves insulares marinhas, residentes e migratórias, do litoral do estado de São Paulo. In: BRANCO, J. O. **Aves Marinhas e Insulares Brasileiras**. Itajaí: Univali, v. 1, p. 57-82, 2004.

CARVALHO, V. M. de. **Isolamento e caracterização de amostras de *Escherichia coli* enteropatogênicas (EPEC) em primatas neotropicais**. 2003. 93 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

CARVALHO, V. M. de; IRINO, K.; ONUMA, D.; PESTANA DE CASTRO, A. F. Random amplification of polymorphic DNA reveals clonal relationships among enteropathogenic *Escherichia coli* isolated from non-human primates and humans. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research,** v. 40, n. 2, p. 237-241, 2007.

CHANSIRIPORNCHAI, N.; RAMASOOTA, P.; SASIPREEYAJAN, J.; SVENSON, B. S. Differentiation of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) strains by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. **Veterinary Microbiology,** v. 80, p. 75-83, 2001.

CHENG, J.; WANG, Q.; WANG, W.; WANG, Y.; WANG, L.; FENG, L. Characterization of *Escherichia coli* O24 and O56 O antigen gene cluster reveals a complex evolutionary history of the O24 gene cluster. **Current Microbilogy,** v. 53, n. 3, p. 470-476, 2006.

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

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals.** 3th ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008. (CLSI document M31-A3).

COLE, D.; DRUM, D. J. V.; STALLKNECHT, D. E.; QHITE, D. G.; LEE, M. D.; AYERS, S.; SOBSEY, M.; MAURER, J. J. Free-living Canada geese and antimicrobial resistance. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, p. 935-938, 2005.

COSTA, D.; POETA, P.; SÁENZ, Y.; VINUÉ, L.; COELHO, A. C.; MATOS, M.; ROJO-BEZARES, B.; RODRIGUES, J.; TORRES, C. Mechanism of antibiotic resistance in *Escherichia coli* Isolates recovered from wild animals. **Microbial Drug Resistance,** v. 14, n. 1, p. 71-77, 2008.

DEL HOYO, J.; ELLIOTT, A.; SARGATAL, J. **Handbook of the birds of the world**. Barcelona: Lynx Edicions, 1992, v. 1, p. 362-374.

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

DIARRA, M. S.; GIGUÈRE, K.; MALOUIN, F.; LEFEBRE, B.; BACH, B.; DELAQUIS, P.; ZIEBELL, K. A.; ROY, G. Genotype, serotype, and antibiotic resistance of sorbitol-negative *Escherichia coli* isolates from feedlot cattle. **Journal of Food Protection,** v. 72, n. 1, p. 28-36, 2009.

DOBRINDT, U.; BLUM-OEHLER, G.; HARTSCH, T.; GOTTSCHALK, G.; RON, E. Z.; FUNFSTÜCK, R.; HACKER, J. **Infection and Immunity,** v. 69, n. 7, p. 4248-4256, 2001.

DONNENBERG, S. M.; WHITTAM, S. T. Pathogenesis and evolution of virulence in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 107, n. 5, p. 539-548, 2001.

ETOH, Y.; MURAKAMI, K.; ICHIHARA, S.; SERA, N.; HAMASAKI, M.; TEKENAKA, S.; HORIKAWA, K.; KAWANO, K.; TAKEISHI, T.; KUWANA, Y.; INOUE, A.; NAGATSU, Y.; HIRA, Y.; TAKAHASHI, M.; ITO, K. Isolation of shiga toxin 2f-Producing *Escherichia coli* (0115:HNM) from na adult symptomatic patient in fukuoka precfeture. **Japanese Journal of Infectious Diseases,** v. 62, p. 315-317, 2009.

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

EWERS, C.; LI, G.; WILKING, H.; KIESSILING, S.; ALT, K.; ANTAO, E. M.; LATURNUS, C.; DIEHL, I.; GLODDE, S.; HOMEIER, T.; BOHNKE, U.; STEINRUCK, 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. 1, p. 163-176, 2007.

FERREIRA, A. J. P.; KNÖBL, T. Colibacilose Aviária. In: BERCHIERI JUNIOR, A.; MACARI, M. **Doença das Aves.** Campinas: FACTA, v. 1, p. 197-207, 2000.

FOSTER, G.; EVANS, J.; KNIGHT, I. H.; SMITH, W. A.; GUNN, J. G.; ALLISON, J. L.; SYNGE, A. B.; PENNYCOTT, W. T. Analysis of feces samples collected from a wild-bird garden feeding station in Scotland for the presence of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157. **Applied and Environmental Microbiology,** v. 72, n. 3, p. 2265-2267. 2006.

GANNON, J. P. V.; RASHED M.; KING, K. R.; THOMAS G. Detection and characterization of the gene of shiga-Like toxin-producting *Escherichia coli* using polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 5, p. 1268-1274, 1993.

GARCÍA-ALJARO, C.; MUNIESA, M.; BLANCO, E. J.; BLANCO, M.; BLANCO, J.; JOFRE, J.; BLANCH, R. A. Characterization of shiga toxin-producting *Escherichia coli* isolated from aquatic environments. **FEMS Microbiology Letters,** v. 246, p. 55-65, 2005.

GERMON, P.; CHEN, Y. H.; HE, L.; BLANCO, J. E.; BRÉE, A.; SCHOULER, C.; HUANG, S. H.; MOULIN-SCHOULEUR, M. ibeA, a virulence factor of avian pathogenic *Escherichia coli.* **Microbiology,** v. 151, n. 4, p. 1179-1186, 2005.

GHANBARPOUR, R.; OSWALD, E. Characteristics and virulence genes of *Escherichia coli* isolated from septicemic calves in southeast of Iran. **Tropical Animal Health and Production,** v. 41, n. 7, p. 1091-1099, 2009.

GINNS, C. A.; BENHAM, M. L.; ADAMS, L. M.; WHITHEAR, K. G.; BETTELHEIM, K. A.; CRABB, B. S.; BROWNING, G. F. Colonization of the respiratory tract by a virulent strain of avian *Escherichia coli* requires carriage os a conjugative plasmid. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 3, p. 1535-1541, 2000.

GORDON, M. D.; COWLING, A. The distribution and genetic structure of *Escherichia coli* in australian vertebrates: host and geographic effects. **Microbiology**, v. 149, p. 3575-3586, 2003.

GROSS, W. B. Diseases due to Escherichia coli in poultry. **Escherichia coli in domestic animals and humans**. 2 ed. Wallingford: CAB International, 1994. p. 237-259.

GYLES, C. L. *Escherichia coli.* **Pathogenesis of bacterial infections in animals***.* 2. ed. Iowa State: Ames University Press, 1993. p. 133-153.

GYLES, C. L. ***Escherichia coli* in domestic animals and humans.** 2 ed. Wallingford: CAB International, 1994. 666 p.

GUIMARÃES DE BRITO, B.; VIDOTTO, C. M.; BERBEL, M. M.; TAGLIARI, C. K. Fatores de virulência presentes em amostras de *Escherichia coli* uropatogênicas – UPEC para suínos. **Ciência Rural,** Santa Maria, v. 34, n. 2, p. 645-652, 2004.

HACKER, J.; BLUM-OEHLER, G.; MÜHLDORFER, L.; TSCHÄPE, H. Pathogenicity islands of virulent bactéria: structure, function and impacto n microbial evolution. **Molecular Microbiology**, v. 23, n. 6, p. 1089-1097, 1997.

HANCOCK, V.; FERRIÈRES, L.; KLEMM, P. The ferric yersianiabactin uptake receptor FyuA is required for efficient biofilm formation by urinary tract infectious *Escherichia coli* in human urine. **Microbiology**, v. 154, n. 1, p. 167-175, 2008.

HARRISON, P. **Seabirds an identification guide**. Boston: Houghton Mifflin Company, 1983, v. 1, 598 p.

HERRERO, M.; LORENZO, V. de; NEILANDS, J. B. Nucleotide sequence of the *iucD* gene of the pColV-K30 aerobactin operon and topology of its product studied with *phoA* and *lacZ* gene fusions. **Journal of Bacteriology**, v. 170, n. 1, p. 56-63, 1988.

HUANG, S. H.; WAN, Z. S.; CHEN, Y. H.; JONG, A. Y.; KIM, K. S. Further characterization of *Escherichia coli* brain microvascular endothelial cell invasion gene *ibeA* by deletion, complementation and protein expression. **The Journal of Infectious Diseases**. v. 183, n. 7, p. 1071-1078, 2001.

HEUVELINK, A. E., VAN HEERWAARDEN, C., ZWARTKRUIS-NAHUIS, J. T. M. *Escherichia coli* O157 infection associated with a petting zoo. **Epidemiology and Infection**, v. 129, p. 295-302, 2002.

IRINO, K.; KATO, M. A.; VAZ, T. M.; RAMOS, L. L.; SOUZA, M. A.; CRUZ A. S.; GOMES, T. A.; VIEIRA, M. A.; GUTH, B. E. Serotypes and virulence markers of shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolated from dairy cattle in São Paulo State, Brazil. **Veterinary Microbiology,** v. 105, n. 1, p. 29-36, 2005.

ISHIGURO, F.; KYOTA, Y.; MOCHIZUKI, M.; HORIKAWA, T. Na outbreak of diarrhea caused by *Escherichia coli* serogroup O169:HNM harboring a coding gene for enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 (*astA*) in Fukui prefecture. **Japanese Journal of Infectious Diseases,** v. 58, p. 119-120, 2005.

ISHII, S.; MEYER, P. K.; SADOWSKY, J. M. Relationship between phylogenetic group, genotypic cluster, and virulence gene profiles of *Escherichia coli* strains from diverse human and animal sources. **Applied and Environmental Microbiology,** v. 73, n. 18, p. 5703-5710, 2007.

JOHNSON, J. R.; CLABOTS, C. Sharing of virulent *Escherichia coli* clones among household members of a woman with acute cystitis. **Clinical Infectious Diseases,** v. 43, n. 10, p. 101-108, 2006.

JOHNSON, R. J.; STELL, L. A. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. **The Journal of Infectious Diseases Society of America,** v. 181, p. 261-272, 2000.

JOHNSON, R. J.; RUSSO, A. T. Molecular epidemiology of extraintestinal pathogenic (uropathogenic) *Escherichia coli.* **International Journal of Medical Microbiology,** v. 295, p. 383-404, 2005.

JOHNSON, J. T.; SIEK, E. K.; JOHNSON, J. S.; NOLAN, K. L. 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.; KARIYAWASAM, S.; WANNEMUEHLER, Y.; MANGIAMELE, P.; JOHNSON, S. J.; DOETKOTT, C.; SKYBERG, J. A.; LYNNE, A. M.; JOHNSON, J. R.; NOLAN, L. K. The genome sequence of avian pathogenic *Escherichia coli* strain O1:K1:H7 shares strong similarities with human extraintestinal pathogenic *E.coli* genomes. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 8, p. 3228-3236, 2007.

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. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 2, p. 417-422, 2008.

KARPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews**, v. 2, n. 1, p. 123-140, 2004.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN JR., W. C. **Color atlas and textbook of diagnostic microbiology**. 5th ed. Philadelphia: Lippincott, 1997. p. 1395.

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

KNÖBL, T.; TARDELII GOMES, A. T.; MIDOLLI VIEIRA, A. M.; BOTTINOA, A. J.; FERREIRA, J. A. P. Detection of *pap, sfa, afa* and *fim* adhesin-encoding operons in avian pathogenic *Escherichia coli.* **International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine,** v. 2, n. 2, p. 135-141, 2004.

LA RAGIONE, R. M.; WOODWARD, M. J. Virulence factors of *Escherichia coli* serotypes associated with avian colisepticaemia. **Department of Bacterial Diseases,** v. 73, p. 37-25, 2002.

LE GALL, T.; CLERMONT, O.; GOURIOU, S.; PICARD, B.; NASSIF, X.; DENAMUR, E.; TENAILLON, O. Extraintestinal virulence is a coincidental by-product of commensalism in B2 phylogenetic group Escherichia coli strains. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, p. 2373-2384, 2007.

LEMUS, J. A.; BLANCO, G.; GRNADE, J.; ARROYO, B.; GARCÍA-MONTIJANO, M.; MARTÍNEZ, F. Antibiotics threaten wildlife: circulating quinolone residues and disease in avian scavengers. **PLoS One,** v. 3, p. e1444, 2008.

LEOTTA, G. A.; DEZA, N.; ORIGLIA, J.; TOMA, C.; CHINEN, I.; MILIWEBSKY, E.; IYODA, S.; SOSA-ESTANI, S.; RIVAS, M. Detection and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in captive non-domestic mammals. **Veterinary Microbiology**, v. 118, n. 1-2, p. 151-157, 2006.

LIOR, H. Classification of *Escherichia coli*. In: GROSS, W. B. **Escherichia coli in Domestic Animals and Humans**. Wallingford: CAB International, 1994. v. 1, p. 31-72.

MAINIL, J. Shiga/verocytotoxins and Shiga/verotoxigenic *Escherichia coli* in animals. **Veterinary Research**, v. 30, n. 2-3, p. 235-257, 1999.

MAKINO, S., KOBORI, H., ASAKURA, H. Detection and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from seagulls. **Epidemiology and Infection**, v. 125, p. 55-61, 2000.

MARVULLO, M. F. V. Zoonoses. In: ZALMIR, S. C.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. **Tratado de Animais Selvagens**. São Paulo: Roca, 2007. v. 1, p. 1250-1258.

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

MIDDLETON, J. H.; AMBROSE, A. Enumeration and antibiotic resistance patterns of fecal indicator organism isolated from migratory Canada geese. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 41, n. 1, p. 334-341, 2005.

MORABITO S. DELL' OMO, G., AGRIMI, U., SCHMIDT, H. Detection and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in feral pigeons. **Veterinary Microbiology**, v. 82, p. 275-283, 2001.

MOULIN-SCHOULEUR, M.; REPÉRANT, M.; LAURENT, S.; BRÉE, A.; MIGNON-GRASTEAU, S.; GERMON, P.; RASSCHAERT, D.; SCHOULEUR, C. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains of avian and human origin: link between phylogenetic relashionships and common virulence patterns. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 10, p. 3366-3376, 2007.

NAKAZATO, G.; AMABILE DE CAMPOS, T.; STEHLING, G. E.; BROCCHI, M.; DIAS DA SILVEIRA, W. Virulence factors of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). **Pesquisa Veterinária Brasileira,** v. 29, n. 7, p. 479-486, 2009.

NASEER, U.; HALDORSEN, B.; TOFTELAND, S.; HEGSTAD, K.; SCHEUTZ, F.; SIMONSEN, G. S.; SUNDSFJORD, A.; NORWEGIAN, E. S. B. L. STUDY GROUP. Molecular characterization of CTX-M-15-producing clinial isolates of *Escherichia coli* reveals the spread of multidrug-resistant ST131 (O25:H4) and ST964 (O102:H6) strains in norway. **APMIS,** v. 117, n. 7, p. 526-536, 2009.

NATARO, P. J.; KAPER, B. J. Diarrheagenic *Escherichia coli.* **Clinical Microbiology Reviews,** v. 11, p. 142-201, 1998.

NETO, A. S.; CASTRO, I. N. de; LUÇÓLLI, S. C.; SOUZA, E. R. de; ARAÚJO, I. O.; LEAL, R. P.; ANTAS, P. T. Z.; REZENDE, S. M. L.; NASCIMENTO, I. L. S. do; NASCIMENTO, J. L. X. do; RODRIGUES, V. A. B. **Manual de anilhamento de aves silvestres**. 2. ed. Brasília: IBAMA, 1994. p. 74.

NGELEKA, M.; KWAGA, J. K. P.; WHITE, D. G.; WHITTAM, T. S.; RIDDELL, C.; GOODHOPE, R.; POTTER, A. A.; ALLAN, B. *Escherichia coli* in broiler chickens: clonal relationship among strains and analysis of virulence-associated factors of isolates from diseased birds. **Infection and Immunity,** v. 64, n. 8, p. 3118-3126, 1996.

NIELSEN, E. M., SKOV, M. N., MADSEN, J. J. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* in wild birds and rodents in close proximity to farms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 11, p. 6944-6697, 2004.

NISHIKAWA, Y.; HELANDER, A.; OGASAWARA, J.; MOYER, N. P.; HANAOKA, M.; HASE, A.; YASUKAWA, A. Epidemiology and properties of heat-stable enterotoxin-producing *Escherichia coli* serotype O169:H41. **Epidemiology and Infection,** v. 121, n. 1, p. 31-42, 1998.

NOVELLI, R. Família Fregatidae. In: MANICA, I. **Aves marinhas costeiras do Brasil: identificação e bioecologia.** Porto Alegre: Cinco Continentes, 1997, p. 20-25.

OELSCHLAEGER, A. T.; DOBRINDT, U.; HACKER, J. Pathogenicity island of uropathogenic, *Escherichia coli* and the evolution of virulence. **International Journal of Antimicrobial Agents,** v. 19, p. 517-521, 2002.

OLSVIK, O.; STROCKBINE, N. A. PCR detection of heat-stable, heat-labile, and Shiga-like toxin genes in *Escherichia coli*. In: PERCING, D. H.; SMITH, T. F.; TENOVER, F. C.; WHITE, T. J. **Diagnostic molecular microbiology**. New York: Mayo Foundation, 1993, p. 271-276.

OSUGUI, L. **Pesquisa e caracterização de amostras de ExPEC (Extraintestinal Pathogenic Escherichia coli) isoladas de infecções do trato urinário (ITU) de cães e gatos.** 2008. 77 p. Dissertação (Mestrado Ciências Biológicas) Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

PENTEADO, M. Arquipélago dos Alcatrazes: um modelo para monitoramento de biodiversidade. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE ECOLOGIA, 3.;

CONGRESSO DE ECOLOGIA DO BRASIL, 9., 2009. São Lourenço. **Resumo... de** São Lourenço, 2009. p. 1-2.

POETA, P.; RADHOUANI, H.; IGRAJAS, G.; GONÇALVES, A.; CARVALHO, C.; RODRIGUES, J.; VINUÉ, L.; SOMALO, S.; TORRES, C. Seagulls of the berlengas natural reserve of Portugal as carriers of fecal *Escherichia coli* harboring CTX-M and TEM extended-spectrum beta-lactamases. **Applied and Environmental Microbiology,** v. 74, n. 23, p. 7439-7441, 2008.

POLLARD, D. R., JOHNSON, W. M.; LIOR, H.; TYLER, S. D.; ROZEE K. R. Rapid and specific detection of verotoxin genes in *Escherichia coli* by the polymerase chain reaction. **J Clin Microbiol**, v. 28, p. 540-545, 1990.

POURBAKHSH, S. A.; DHO-MOULIN, M.; BRÉE, A.; DESAUTELS, C.; MARINEAU-DOIZE, B; FAIRBROTHER, J. B. Localization of the in vivo expression of P e F1 fimbriae in chickens experimentally inoculated with pathogenic *Escherichia coli* strains. **Infection and Immunity**, v. 22, n. 1, p. 231-341, 1997.

PRITCHARD, G. C., WILLIANSON, T. C., CARSON, T. Wild rabbits- a novel vector for verotoxigenic *Escherichia coli* O157. **Veterinary Record**, v. 149, p. 557-567, 2001.

RADHOUANI, H.; POETA, P.; IGRAJAS, G.; GONÇALVES, A.; VINUÉ, L.; TORRES, C. Antimicrobial resistance and phylogenetic groups in isolates of *Escherichia coli* from seagulls at the Berlengas nature reserve. **Veterinary Record,** v. 165, p. 138-142, 2009.

RAMCHANDANI, M.; MANGES, A. R.; DEB ROY, C.; SMITH, S. P.; JOHNSON, J. R.; RILEY, L. W. Possible animal origino f human-associated, multidrug-resistant, uropathogenic *Escherichia coli.* **Clinical Infectious Diseases,** v. 40, n. 2, p. 251-257, 2005.

REED, K. D.; MEECE, J. K.; HENKEL, J. S.; SHUKLA, S. K. Birds, migration and emerging zoonoses: West nile vírus, Lyme Disease, *Influenza A* and *Enteropathogens.* **Clinical Medicine & Research,** v. 1, p. 5-12, 2003.

REVOLLEDO, L.; FERREIRA, J. A. P. **Patologia aviária**. Barueri: Manole, 2009. p. 67-74.

ROCHA, P. G. C. A.; ROCHA, S. L. S.; LIMA-ROSA, V. A. C.; SOUZA, F. G.; MORAES, S. L. H.; SALLE, O. F.; MORAES, B. L.; SALLE, P. T. C. Genes associated with pathogenicity of avian *Escherichia coli* (APEC) isolated from respiratory cases of poultry. **Pesquisa Veterinária Brasileira,** v. 28, n. 3, p. 183-186, 2008.

RODRIGUEZ-SIEK, K. E.; GIDDINGS, C. W.; DOETKOTT, C.; JOHNSON, T. J.; FAKHR, M. K.; NOLAN, L. K. Comparision of Escherichia coli isolates implicated in human urinary infection and avian colibacilosis. **Microbiology**, v. 1, n. 151, p. 2097-2110, 2005a.

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

ROONEY, P. J.; O´LEARY, M. C.; LOUGHREY, A. C.; MC CALMONT, M.; SMYTH, B.; DONAGHY, P.; BADRI, M.; WOODFORD, N.; KARISIK, E.; LIVERMORE, D. M. Nursing homes as a reservoir of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli.* **Journal of Antimicrobiology Chemother,** v. 64, n. 3, p. 635-641, 2009.

ROSE, J. M.; GAST, R. J.; BOGOMOLNI, A.; ELLIS, J. C.; LENTELL, B. J.; TOUHEY, K.; MOORE, M. Occurrence and patterns of antibiotic resistance in vertebrates off the Northeastern United States coast. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 67, p. 421-431, 2009.

SANTOS FILHO, J. C. B. **Pesquisa de bactérias e sua sensibilidade aos antimicrobianos em cães com piometra, com especial interesse na caracterização das *Escherichia coli* patogênicas extra-intestinais.** 2008. 68 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) Universidade Paulista. UNIP, São Paulo, 2007.

SAINDENBERG, A.; ALLEGRETTI, L.; FERREIRA, C. S. A.; FERREIRA, A. J. P.; ALMEIDA, M. A.; SILVEIRA, L. F.; RASO, T. F. Fatores de virulência de *Escherichia coli* isoladas a partir de *swabs* cloacais de Mutum-do-Nordeste (*Pauxi mitu*). In: CONGRESSO, 12.; ENCONTRO DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE ANIMAIS SELVAGENS, 18;, 2009, Águas de Lindóia. **Anais...** [São Paulo]: ABRAVAS, 2009. v. 1, n. 89, p. 263-266.

SCHEUTZ, F.; CHEASTY, T.; WOODWARD, D.; SMITH, H. R. Designation of O174 and O175 to temporary O groups OX3 and OX7, and six new *Escherichia coli* O groups that

include verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC): O176, O177, O178, O179, O180 and O181. **APMIS,** v. 112, n. 9, p. 569-584, 2004.

SCHWARZ, S.; CHASLUS-DANCLA, E. Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance. **EDP Sciences,** v. 32, p. 201-225, 2001.

SICK, H. Biologia; Tesourões: Família Fregatidae. In: SICK, H. **Ornitologia Brasileira**. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 1997, p. 117-119; 198-200.

STEELE, C. M.; BROWN, R. N.; BOTZLER, R. G. Prevalences of zoonotic bacteria among seabirds in rehabilitation centers along the pacific coast of California and Washington. **Journal of Wildlife Diseases,** v. 41, n. 4, p. 735-744, 2005.

SUKUPOLVI, S.; O´CONNOR, C. D. Trat lipoprotein, a plasmid-specified mediator of interactions between gram-negative bacteria and their environment. **Microbiological Reviews**, v. 54, n. 4, p. 331-341, 1990.

TERDELLI GOMES, A. T.; CAMPOS, C. L.; TRABULSI, R. L. Diagnóstico Bacteriológico. **Microbiologia,** v. 16, n. 3, p. 131-141, 1999.

VAN DEN BOGAARD, A. E.; STOBBERINGH, E. E. Epidemiology of resistance to antibiotics links between animals and humans. **International Journal of Antimicrobial Agents,** v. 14, p. 327-335, 2000.

VON SYDOW, G. D. M. C. A.; COOGAN, A. J.; MORENO, M. A.; MELVILLE, A. P.; BENITES, R. N. Ocorrências de fatores de virulência em estirpes de *Escherichia coli* isoladas de fezes de cães errantes. **Arquivo do Instituto Biológico de São Paulo,** v. 73, n. 4, p. 401-407, 2006.

WEBER, M. Pelicaniformes (Pelicans, tropicbirds, cormorants, fragatebirds, anhingas, gannets). In: FOWLER, M. E.; MILLER, R. M. **Zoo and Wild Animal Medicine**. Saint Louis: Saunders, 2003, p. 118-122.

WILES, J. T.; KULESUS, R. R.; MULVEY, A. M. Origins and virulence mechanisms of of uropathogenic *Escherichia coli.* Experimental and **Molecular Pathology,** v. 85, p. 11-19, 2008.

WOODFORD, N.; CARATTOLI, A.; KARISIK, E.; UNDERWOOD, A.; ELLINGTON, M. J.; LIVERMORE, D. M. Complete nucleotide sequences of plasmids pEK204, pEK499, and pEK516, encoding CTX-M enzymes in three major *Escherichia coli* lineages from the United Kingdom, all belonging to the international O25:H4-ST131 clone. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy,** v. 53, n. 10, p. 4472-7782, 2009.

ZALMIR, S. C.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. **Tratado de Animais Selvagens**. 1. ed. São Paulo: Roca, 2007, 1376 p.

ZHANG, X. X.; ZHANG, T.; FANG, H. H. P. Antibiotic resistance in water environment. **Applied Microbiology and Biotechnology,** v. 82, p. 397-414, 2009.

ZHU, S. Y.; LU, H.; WANG, J. Isolation of avian *Escherichia coli* and PCR detection of their F1 and HPI genes. **Wei Sheng Wu Xue Bao,** v. 47, n. 5, p. 795-799, 2007.