MARCOS PAULO VIEIRA CUNHA

**Resistência aos antimicrobianos e virulência de
Escherichia coli patogênica para aves (APEC) isoladas de perus
com doença respiratória**

São Paulo

2014

MARCOS PAULO VIEIRA CUNHA

**Resistência aos antimicrobianos e virulência de
Escherichia coli patogênica para aves (APEC) isoladas de perus
com doença respiratória**

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:

Profa. Dra. Terezinha Knöbl

São Paulo

2014

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.2970
FMVZ

Cunha, Marcos Paulo Vieira
Resistência aos antimicrobianos e virulência de *Escherichia coli* patogênica para aves (APEC) isoladas de perus com doença respiratória / Marcos Paulo Vieira Cunha. -- 2014.
111 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2014.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Profa. Dra. Terezinha Knöbl.

1. Avicultura. 2. Resistência antimicrobiana. 3. Colibacilose. 4. ExPEC. 5. APEC.
I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Resistência aos antimicrobianos e virulência de *Escherichia coli* patogênica para aves (APEC) isoladas de perus com doença respiratória", protocolado sob o nº2699/2012, utilizando coleta de amostras bacterianas dos sacos aéreos de perus, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Terezinha Knöbl, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião do dia 6 de fevereiro de 2013.

We certify that the Research "Antimicrobial resistance and virulence of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from turkeys with respiratory diseases", protocol number 2699/2012, under the responsibility Profa. Dra. Terezinha Knöbl, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved at the meeting on 6 February of two thousand and thirteen.

São Paulo, 24 de abril de 2014.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: Marcos Paulo Vieira Cunha

Título: Resistência aos antimicrobianos e virulência de *Escherichia coli* patogênica para aves (APEC) isoladas de perus com doença respiratória

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: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho àquele que sempre me incentivou, meu avô Paulo

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Terezinha Knöbl, pela atenção, disponibilidade, gentileza e diálogo. Agradeço a confiança nas minhas escolhas, a autonomia e liberdade que me deu durante a realização desse trabalho.

À Profa. Dra. Andrea Micke Moreno pela contribuição inestimável e à todos do Laboratório de Sanidade Suína e Virologia.

Ao Prof. Dr. Antonio J. Piantino Ferreira por ceder seu laboratório para a realização de grande parte desse trabalho e à toda equipe do Laboratório de Ornitopatologia.

À Profa. Dra. Vania Maria de Carvalho, pessoa elementar na minha formação.

Aos colegas do Laboratório de Ornito: Natalia, Silvana, Luis, Luciana, Márcia, Claudete, Maurício e Claudia por tornarem o dia-a-dia mais prazeroso.

Às meninas do Ambulatório de Aves, Livia, Yamê, Flávia e, em especial, à minha amiga Marta, por toda ajuda.

À Gabi e Mirela, pelo auxílio com os experimentos.

À doutoranda Ketrin C. Silva pela ajuda como ERIC-PCR.

À bibliotecária Elza Faquim, pelo profissionalismo.

Aos meus pais, Ivone e Paulo, minhas maiores referências. Sou imensamente grato por todo carinho, amor e bons exemplos que recebi durante toda minha vida.

À minha família em São Paulo, Aramis, Ana Beatriz, Nina e Amy pela companhia, apoio e amor. Sem vocês não teria sido possível.

Às minhas avós Olga e Aparecida, que mesmo à distância, tornam minha vida mais leve.

Agradeço à FAPESP, pelo apoio financeiro e a CAPES pela bolsa de mestrado.

RESUMO

CUNHA, M. P. V. **Resistência aos antimicrobianos e virulência de *Escherichia coli* patogênica para aves (APEC) isoladas de perus com doença respiratória.** [Antimicrobial resistance and virulence of avian pathogenic *Escherichia coli* isolated from turkeys with respiratory disease]. 2014. 111 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Os prejuízos causados por *Escherichia coli* patogênica para aves (APEC) na produção de aves é justificativa de pesquisas realizadas no mundo todo há décadas. Recentemente, o potencial zoonótico e a multirresistência das cepas desse patotipo têm sido alvo frequente dos trabalhos realizados com APEC. O objetivo desse trabalho foi caracterizar 225 cepas APEC isoladas de perus condenados por aerossaculite em abatedouros em relação à resistência a 14 antimicrobianos, perfil de virulência e grupos filogenéticos. 92% das amostras apresentaram perfil de multirresistência (MDR) e os índices mais altos de resistência foram a sulfonamidas (94%), tetraciclina (83%), eritromicina (82%), estreptomicina (60%), amoxicilina (53%) e ácido nalidíxico (48%). Metade das cepas foram classificadas no grupo filogenético B2 (50%), seguido por B1 (28,6%), grupo A (17,1%) e grupo D (4,8%). Os genes de virulência pesquisados tiveram prevalência de *iroN* (95%), *iss* (93%), *cvi/cva* (67%), *iucD* (67%), *tsh* (56%), *irp2* (51%), *ibeA* (31%), *vat* (24%), *neuS* (19%), *astA* (17%) e *papC* (15%). Considerando o potencial zoonótico e a associação a um maior número de genes de virulência quando comparadas aos outros grupos filogenéticos, as cepas B2 foram selecionadas para pesquisa de integrons de classe 1 e clonalidade. As 112 amostras B2 eram pertencentes a 83 diferentes perfis ERIC, sendo classificadas como multiclonais. Os integrons de classe 1 estiveram presentes em 107 isolados (95,5%). Esses resultados demonstram que a maioria das cepas pesquisadas pertencia ao grupo mais virulento (B2) e relacionado a cepas ExPEC humanas. Aliado ao alto índice de multirresistência encontrado, esses dados sugerem que as aves podem servir como reservatório de cepas patogênicas e multirresistentes, tanto para humanos como para animais, reforçando a ideia de que as aves representem importante papel na cadeia epidemiológica das ExPEC.

Palavras-chave: Avicultura. Resistência antimicrobiana. Colibacilose. ExPEC. APEC.

ABSTRACT

CUNHA, M. P. V. **Antimicrobial resistance and virulence of avian pathogenic *Escherichia coli* isolated from turkeys with respiratory disease.** [Resistência aos antimicrobianos e virulência de *Escherichia coli* patogênica para aves (APEC) isoladas de perus com doença respiratória]. 2014. 111 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC) has been studied for decades because of its economic impact on the poultry industry. Recently, the zoonotic potential of APEC and multidrug-resistant strains have emerged. The aim of this study was to investigate the virulence profile, phylogenetic background and antimicrobial resistance in 225 strains of *Escherichia coli* isolated from turkeys presenting airsacculitis. The results showed that 92% of strains presented a multidrug-resistance (MDR) profile, and the highest levels of resistance were to sulfamethazine (94%), tetracycline (83%). Half of these strains (112/225) were classified in phylogenetic group B2, followed by groups B1 (28.6%), A (17.1%) and D (4.8%). The prevalence of virulence genes was as follows: *iroN* (95%), *iss* (93%), *cvi/cva* (67%), *iucD* (67%), *tsh* (56%), *irp2* (51%), *ibeA* (31%), *vat* (24%), *neuS* (19%), *astA* (17%) and *papC* (15%). Considering the zoonotic potential and association to a greater number of virulence genes when compared to other phylogenetic groups, B2 strains were selected for screening of class 1 integrons and clonality. The 112 samples belonging to 83 ERIC profiles and classified as multiclonal. Class 1 integrons were present in 107 isolates (95.5%). These results demonstrate that the majority of the investigated strains belonged to group B2, which is more virulent and is related to human ExPEC strains. Coupled with the high rate of multidrug-resistance found, these data suggest that turkeys may serve as a reservoir for pathogenic and multidrug-resistance strains, for humans and animals, reinforcing the idea that poultry plays an important role in the epidemiological chain of ExPEC.

Keywords: Poultry production. Colibacillosis. Antimicrobial resistance. ExPEC. APEC.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Dados da produção nacional e exportação de carne de perus entre 1999 e 2012. Valores em mil toneladas.....	26
Figura 2 -	Distribuição dos patotipos de <i>Escherichia coli</i>	30
Figura 3 -	Organização dos operons fimbriais: <i>fim</i> (azul), <i>pap</i> (verde) e <i>sfa</i> (laranja).....	35
Figura 4 -	Elementos e rotas de transferência de resistência aos antimicrobianos entre animais de produção, humanos e alimentos.....	45
Figura 5 -	Distribuição das 225 cepas APEC em relação à resistência antimicrobiana e grupos filogenéticos.....	53
Figura 6 -	Árvore de decisão dicotômica para determinar o grupo filogenético em amostras de <i>Escherichia coli</i> conforme resultados da amplificação de <i>chuA</i> , <i>yjaA</i> e TSPE4.C2. por PCR.....	69
Figura 7 -	Diagrama esquemático apresentando os principais patotipos de ExPEC e doenças em aves e humanos e a possibilidade das aves e seus produtos serem reservatórios de genes de virulência e resistência a antibióticos, assim como causar doenças zoonóticas.....	74
Figura 8 -	(1) Representação da estrutura de um Integron de classe I. (2) Mecanismo de recombinação de um gene cassete (GC).....	78
Figura 9 -	Eletroforese em gel de agarose de diferentes amostras mostram amplificados da região variável dos integrons de classe 1.....	82
Figura 10-	Dendrograma das amostras APEC B2 com os resultados do ERIC-PCR baseado no coeficiente de Dice e UPGMA.....	86
Figura 11-	Dendrograma das amostras APEC B2 com os resultados do ERIC-PCR, virulência e resistência aos antimicrobianos baseado no coeficiente de Dice e UPGMA.....	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição das 225 cepas APEC em relação ao grupo filogenético e escore de virulência do total e de cada grupo.....	55
Tabela 2 - Distribuição de 225 cepas de APEC em relação grupo filogenético e prevalência dos fatores de virulência.....	55
Tabela 3 - Distribuição dos determinantes de virulência em relação ao fenótipo de resistência aos antimicrobianos das 225 cepas APEC.....	57
Tabela 4 - Distribuição das 107 cepas positivas para <i>int1</i> em função do tamanho da região variável.....	83
Tabela 5 - Distribuição das cepas positivas e negativas para integrons de classe 1 em função do fenótipo de multirresistência.....	83
Tabela 6 - Prevalência dos determinantes de virulência e distribuição em relação ao perfil de multirresistência (MDR).....	84

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Algumas características bioquímicas e de diagnóstico da espécie <i>Escherichia coli</i> segundo Barnes, Nolan e Vaillancourt (2008).....	29
Quadro 2 - Amostras padrão utilizadas como controle na determinação dos genótipos de virulência das 225 amostras APEC.....	50
Quadro 3 - Descrição dos genes, sequência dos primers, números de acesso GenBank, temperatura de anelamento e tamanho do amplicon dos genes pesquisados.....	51
Quadro 4 - Descrição dos genes utilizados para a classificação de grupos filogenéticos de <i>E.coli</i> , sequência dos iniciadores e tamanho do fragmento amplificado.....	52
Quadro 5 - Distribuição das 225 cepas APEC em relação aos perfis de resistência apresentados.....	54
Quadro 6 - Distribuição das 225 cepas APEC em relação aos perfis de virulência apresentados.....	56
Quadro 7 - Frequência dos grupos filogenéticos em isolados de APEC ou RPEC contendo genes de virulência e tipados molecularmente como ExPEC em vários países.....	71
Quadro 8 - Prevalência dos perfis de virulência em 112 amostras de APEC B2.....	85

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aggR - Ativador transcricional de AAFs em EAEC

AMO - Amoxicilina

APEC – *Escherichia coli* patogênica para aves (“*Avian pathogenic E. coli*”)

astA – Gene da toxina EAST1, toxina termolábil de EAEC

ATCC- American Type Culture Collection

BHI - *Brain Heart Infusion*

bla - Gene codificador de β -lactamases

bp - pares de bases

cvi/cva - Genes estruturais do operon ColV

CIM - Concentração inibitória mínima

CLSI - Clinical and Laboratory Standard Institute

CS-PCR – *Conserved Segment*-PCR

CFX – Cefotaxima

CTF - Ceftiofur

DNA- Ácido desoxiribonucleico

DAEC - *E.coli* de aderência difusa

dNTP - desoxirribonucleotídeo trifosfatado

DRCC - Doença respiratória crônica complicada

EAEC - *E.coli* enteroagregativa

E.coli - *Escherichia coli*

EHEC - *E.coli* enterohemorrágica

EIEC - *E.coli* enteroinvasora

ENO - Enrofloxacino

EPEC - *E. coli* enteropatogênica

ESBL - Beta-lactamase de espectro estendido

ETEC - *E. coli* enterotoxigênica

ExPEC- *E. coli* extra-intestinal (“*Extraintestinal Pathogenic E. coli*”)

ERI – Eritromicina

FOX – Cefoxitina

FLO - Florfenicol

GEN – gentamicina

ibeA – Gene codificador da invasina do endotélio cerebral

intl- Gene codificador de integrase, constituinte do elemento genético móvel integron

irp2 - Gene envolvido na síntese de yersiniabactina

iss – Gene de resistência ao soro

iroN – receptor do sideróforo salmochelina

iucD – Gene envolvido na síntese de aerobactina

kb - kilobases

MgCl² - Cloreto de Magnésio

MILi - Motilidade, Descaboxilação da lisina e Produção de Indol

Mili-Q - Millipore Corporation

MLEE - *Multi-Locus Enzyme Electrophoresis*

ml – Mililitro

MLST - *Multilocus Sequence Type*

mm - Milímetro.

mM - Milimolar

NAL - ácido nalidíxico

neuS – Gene codificador da Cápsula K1

NMEC - *E.coli* causadora de meningite neonatal

NOR - Norfloxacino

PAI – Ilha de patogenicidade (“*Pathogenicity Island*”)

papC - Gene do pili associado à pielonefrite

PCR- Reação em cadeia pela polimerase (“*Polymerase Chain Reaction*”)

PFGE- Eletroforese em gel de campo pulsado (“*Pulsed Field Gel Electrophoresis*”)

pmol - Peso molar

PMQR - Plasmídeos carreadores de genes de resistência às quinolonas

qnr – Gene de resistência às quinolonas

RNA- Ácido ribonucléico

RV - região variável

SEPEC - *E. coli* septicêmica

ST – *Sequence Type*

STR - Estreptomicina

SXT - Sulfametoxazol-trimetoprim

TET – Tetraciclina

TOC - Complexo osteomielite/sinovite dos perus (“*Turkey osteomyelitis complex*”)

Tris- Tris-hidroximetilaminometano (2-amino-2-(hidroximetil)propano-1,3-diol)

tsh – Hemaglutinina termo-sensível

UV - Ultra violeta

µg- Micrograma

µL- Microlitro

µM- Micromolar

UPEC - *E. coli* uropatogênica

UTI – Infecção do trato urinário (“*Urinary tract infection*”)

vat – Toxina vacuolizante

LISTA DE SÍMBOLOS

+ Positivo ou presente

- Negativo ou ausente

α Alfa

β Beta

λ Lambda

μ Mi

Sumário

1 INTRODUÇÃO GERAL	19
 2 GENÓTIPO DE VIRULÊNCIA, DISTRIBUIÇÃO FILOGENÉTICA E PERFIL RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS DE APEC (<i>Escherichia coli</i> PATOGÊNICA PARA AVES) ISOLADAS DE PERUS COM DOENÇA RESPIRATÓRIA	21
2.1 INTRODUÇÃO	22
2.2 REVISÃO DE LITERATURA.....	24
2.2.1 Criação de perus, características da espécie e domesticação.....	24
2.2.1.1 Produção industrial e ambiência	25
2.2.2 Colibacilose.....	27
2.2.3 <i>Escherichia coli</i>.....	28
2.2.3.1 <i>Escherichia coli</i> patogênica para aves (APEC)	31
2.2.3.1.1 <i>Fatores de virulência de APEC</i>	32
2.2.3.1.1.1 Adesinas	33
2.2.3.1.1.2 Invasinas.....	36
2.2.3.1.1.3 Evasinas.....	37
2.2.3.1.1.4 Sideróforos	39
2.2.3.1.1.5 Toxinas.....	39
2.2.3.1.1.6 Grandes plasmídeos de virulência	40
2.2.4 Resistência aos antimicrobianos.....	42
2.2.4.1 Produção animal e a resistência aos antibióticos	43
2.2.4.2 Resistência aos antimicrobianos em APEC	45
2.3 OBJETIVOS.....	48
2.4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	48
2.4.1 Amostras de APEC	48
2.4.2 Determinação do fenótipo de resistência aos antimicrobianos	49
2.4.3 Determinação do Genótipo de virulência.....	49
2.4.4 Análise filogenética	52
2.4.5 Análise estatística.....	52
2.5 RESULTADOS	53
2.6 DISCUSSÃO.....	58
2.7 CONCLUSÃO	62

3. CLONALIDADE E INTEGRONS DE CLASSE 1 EM CEPAS DE APEC (<i>Escherichia coli</i> PATOGÊNICA PARA AVES) PERTENCENTES AO GRUPO FILOGENÉTICO B2	64
3.1 INTRODUÇÃO	65
3.2 REVISÃO DE LITERATURA.....	67
3.2.1 Grupos filogenéticos	67
3.2.2 Potencial zoonótico de APEC	73
3.2.3 Integrans	75
3.3 OBJETIVOS.....	79
3.4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	80
3.4.1 Amostras bacterianas.....	80
3.4.2 Pesquisa de Integrans de classe 1 por CS-PCR.....	80
3.4.3 ERIC-PCR	80
3.4.4 Detecção de α e β-hemolisinas.....	81
3.4.5 Análise estatística.....	81
3.5 RESULTADOS	81
3.5 DISCUSSÃO.....	88
3.6 CONCLUSÃO.....	92
 4. CONCLUSÃO GERAL	 93
 REFERÊNCIAS	 94

1 INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil ocupa posição de destaque no cenário mundial de produção de aves, sendo considerado o principal exportador de carne de frango no mundo (UBABEF, 2013). A avicultura nacional responde por quase 1,5% do Produto Interno Bruto (PIB) brasileiro, empregando, direta e indiretamente, mais de 3,6 milhões de pessoas, (ABPA, 2014). Em 2012, a produção brasileira de carne de perus alcançou a marca histórica de 442,288 toneladas (UBABEF, 2013). No entanto, estima-se que 4% dos perus abatidos no Brasil sejam condenados por lesões em decorrência de aerossaculite (BRASIL, 2013). Dentre os vários agentes que podem causar aerossaculite em aves de produção, o patógeno mais comumente isolado dessas infecções é *Escherichia coli* patogênica para aves (APEC) (FERREIRA; KNÖBL, 2009).

APEC é considerada um dos principais desafios da avicultura industrial moderna, devido aos prejuízos que causa em todo mundo (BARNES; NOLAN; VAILLANCOURT, 2008; FERREIRA; KNÖBL, 2009). A doença causada por APEC é denominada colibacilose, enfermidade que compreende uma gama de diferentes síndromes e manifestações como celulite, síndrome da cabeça inchada, onfalite, colisepticemia, entre outras (BARNES; NOLAN; VAILLANCOURT, 2008; FERREIRA; KNÖBL, 2009; MELLATA, 2013).

Além das perdas geradas pelo patógeno na cadeia de produção de aves, trabalhos recentes relacionam as cepas aviárias com linhagens de *Escherichia coli* que causam doenças em humanos, sugerindo que as APEC tenham um potencial zoonótico (EWERS et al., 2007; MOULIN-SCHOULEUR et al., 2007; MANGES; JOHNSON, 2012; MELLATA, 2013). Outra preocupação em relação às APEC é o alto índice de resistência aos antimicrobianos apresentados por essas linhagens, indicando as aves como um possível reservatório de genes de resistência aos antibióticos (MANGES; JOHNSON, 2012; MELLATA, 2013). Trabalhos recentes demonstram que muitos dos genes de resistência apresentados pelas cepas aviárias estão localizados em elementos genéticos móveis, denominadas integrons, que têm a capacidade de transferir o genótipo de resistência para outras bactérias (KANG et al., 2005; VASILAKOPOULOU et al., 2009).

Considerando o impacto econômico negativo, os potenciais riscos de transmissão aos humanos e a crescente preocupação com a resistência antimicrobiana gerados por *Escherichia coli* patogênica para aves, os dois capítulos deste trabalho tem o objetivo de caracterizar sob o ponto de vista genotípico e fenotípico os atributos de virulência, resistência e classificação filogenética de amostras de APEC isoladas de perus comerciais condenados por doença respiratória.

2 GENÓTIPO DE VIRULÊNCIA, DISTRIBUIÇÃO FILOGENÉTICA E PERFIL DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS DE CEPAS APEC (*Escherichia coli* PATOGÊNICA PARA AVES) ISOLADAS DE PERUS COM DOENÇA RESPIRATÓRIA

2.1 INTRODUÇÃO

Infecções por *Escherichia coli* extra-intestinal (ExPEC) em aves de produção geram um impacto econômico negativo, principalmente em países como Brasil, China e EUA, onde a criação de aves ocupa lugar de destaque na economia (BARNES; VAILLANCOURT; GROSS, 2003; MELLATA, 2013). O subpatotipo das ExPEC que infecta as aves causando colibacilose é denominado *Escherichia coli* patogênica para aves (APEC - *Avian pathogenic Escherichia coli*), e é considerado um grupo heterogêneo de patógenos e com amplo repertório de virulência. APEC está presente em todas as etapas da cadeia de produção de aves, causando diversos tipos de lesões e doenças. As manifestações mais comuns associadas a um quadro de colibacilose são aerossaculite, perihepatite, pericardite, salpingite, onfalite, coligranuloma, celulite, síndrome da cabeça inchada e sepse (BARNES; VAILLANCOURT; GROSS, 2003; DZIVA; STEVENS, 2008). Em perus, particularmente os jovens, APEC está relacionada a um quadro denominado TOC (*Turkey osteomyelitis complex* – Complexo osteomielite/sinovite dos perus), que causa vários tipos de lesões que incluem artrite/sinovite, abscessos em tecidos moles, lesões esverdeadas no fígado, e osteomielite da tíbia proximal (HUFF et al., 2000; DZIVA; STEVENS, 2008). Todos estes quadros infecciosos causados por APEC resultam na condenação total ou parcial de um grande número de carcaças, causando prejuízos anuais de milhões de dólares, tornando-se um desafio sanitário. No Brasil, calcula-se que 4% do total das aves abatidas sejam condenadas por aerossaculite e 1,3% por lesões sistêmicas causadas pela colibacilose (BRASIL, 2013).

As vias oral e respiratória são importantes portas de entrada para o início de uma infecção sistêmica por APEC (DZIVA; STEVENS, 2008). A colonização da traqueia e sacos aéreos é considerada o primeiro passo das infecções sistêmicas por APEC, seguido de colonização do fígado, pericárdio e bacteremia, sendo a aerossaculite um dos primeiros sinais observados em infecções experimentais (DEROSA; FICKEN; BARNES, 1992).

Para aderir, colonizar, invadir e causar infecção, as cepas APEC dispõem de um variado armamento de virulência, que incluem adesinas, evasinas, sistemas de

captação e transporte de ferros, cápsulas, toxinas e invasinas (EWERS et al., 2004, 2007; RODRIGUEZ-SIEK et al., 2005a; JOHNSON et al., 2008b). Fatores de virulência que definem o patotipo APEC não estão completamente elucidados, assim como nas ExPEC humanas, linhagens APEC podem apresentar um repertório diverso e heterogêneo de genes de virulência (MELLATA, 2013). Alguns trabalhos associam vários genes de virulência ao patotipo APEC, podendo estes genes estarem presentes em plasmídios ou em fragmentos cromossômicos de DNA denominados ilhas de patogenicidade (PAIs) (JANSEN et al., 2001; RODRIGUEZ-SIEK et al., 2005a; EWERS et al., 2004, 2007; JOHNSON et al., 2008b). Recentemente, vários estudos têm demonstrado que alguns clones APEC são muito similares a cepas dos patotipos extraintestinais que afetam humanos (UPEC – uropathogenic *Escherichia coli*; NMEC – neonatal meningitis-causing *Escherichia coli*), sendo indistinguíveis pela posse de determinados fatores de virulência, grupos filogenéticos e causarem doença em modelos mamíferos de doenças humanas (RODRIGUEZ-SIEK et al., 2005b; EWERS et al., 2007; JOHNSON et al., 2008a; ZHAO et al., 2009; TIVENDALE et al., 2010; VINCENT et al., 2010; BERGERON et al., 2012; JAKOBSEN et al., 2012). Levando em conta essas evidências, alguns autores apontam as aves de produção como reservatório de ExPEC para os humanos, representando um risco para a saúde pública (VINCENT et al., 2010; BERGERON et al., 2012; JAKOBSEN et al., 2012).

Além das perdas econômicas e o risco de transmissão para humanos, cepas de *E. coli* isoladas de animais de produção, como as APEC, apresentam alto índice de resistência aos antimicrobianos (MANGES; JOHNSON, 2012; MELLATA, 2013). Outro fato que também deve ser considerado são os níveis alarmantes de contaminação por cepas de *E. coli* com perfil de multirresistência (MDR) na carne de aves (MANGES; JOHNSON, 2012; MELLATA, 2013).

2.2 REVISÃO DE LITERATURA

2.2.1 Criação de perus, características da espécie e domesticação

Os perus domésticos (*Meleagris gallopavo*) são originários do Novo Mundo, e foram domesticados por civilizações pré-colombianas no México e América Central há cerca de 4000 anos (SCANES; BRANT; ENSMINGER, 2004). As evidências demonstram que essa domesticação não teve o intuito de utilização das aves como fonte de alimento. A espécie foi domesticada com o objetivo de obtenção de ossos e penas para trajes festivos dos índios (MORENG; AVENS, 1990). Os colonizadores espanhóis levaram a espécie para a Europa em 1501, onde foi primeiramente distribuída pelos países mediterrâneos e depois por toda a Europa (SCANES; BRANT; ENSMINGER, 2004).

Os programas de aprimoramento na criação e melhoramento genético da espécie se iniciaram na Inglaterra na década de 1920, e poucos anos depois nos Estados Unidos. Porém, a criação a nível industrial se deu no início de 1940 (MORENG; AVENS, 1990; SCANES; BRANT; ENSMINGER, 2004).

Perus criados na Europa nos anos de 1930 foram importados pelos criadores norte-americanos e cruzados com perus selvagens (*Meleagris gallopavo silvestris*) para produzir a raça *Broad-Breasted Bronze* (SCANES; BRANT; ENSMINGER, 2004). Em meados dos anos 1950, criadores começaram a desenvolver perus com plumagem branca a partir da raça *Broad-Breasted Bronze* (SCANES; BRANT; ENSMINGER, 2004).

Para dimensionar a importância que o peru assume em determinados contextos nacionais, Moreng e Avens (2004) nos contam que Benjamin Franklin propôs que essa ave nobre, nativa da América, fosse adotada pelo Congresso como emblema nacional dos Estados Unidos. Em vez dele, foi escolhida a águia americana por uma pequena margem em votação no Congresso Nacional norte-americano (MORENG; AVENS, 1990).

No Brasil a criação industrial de perus surgiu na década de 1960 nas regiões sul e sudeste do país. Na década de 1970, período em que houve profunda reorganização do complexo de carnes no Brasil, a atividade passou a ser liderada pelos estados de Santa Catarina e Mato Grosso, sendo beneficiada pelos custos regionais mais baixo dos grãos de milho e soja, principais insumos para a produção de aves (ABPA, 2014).

Em território nacional foram introduzidas as raças *Mamonth Bronze Broad-Breasted*, *Mamouth White Broad-Breasted*, *White Holland* e *Beltville Small White*, essa última de menor tamanho. As indústrias brasileiras normalmente utilizam para o abate cruza de peruas *Mamouth* com *Bronze*, *Bourbon Red* ou *White Holland* e também a marca *British United Turkeys of America* (BUTA) (COSTA, 2006).

2.2.1.1 Produção industrial e ambiência

Na avicultura moderna, a produção de perus faz uso de grandes instalações que podem conter de 1.000 a 25.000 aves alocadas em densidades acima de 60 kg/m² (aproximadamente 3 machos adultos/m²) (MENDES, 2005). Perdas produtivas decorrentes de ondas de calor ou outras adversidades climáticas são comuns na produção de aves em clima tropical. Para evitar essas alterações climáticas, métodos de acondicionamento térmico artificial têm sido largamente utilizados para melhorar o ambiente das aves (MENDES, 2005).

Os perus são preferencialmente criados sob confinamento total durante a fase de aquecimento (até sete semanas), e então são transferidos com oito a doze semanas para crescer em galpões de semiconfinamento (MORENG; AVENS, 1990). O ciclo de criação até o abate varia conforme a faixa de peso pretendida. Os perus inteiros, consumidos tradicionalmente nas festas de final de ano no Brasil, são geralmente fêmeas com idade entre 56 e 70 dias, com peso variando de três a seis quilos. Os perus produzidos para cortes e embutidos são machos pesando entre 16 e 20 quilos, abatidos com idade entre 120 e 150 dias, ou fêmeas de nove a onze quilos e idade de abate entre 95 e 120 dias (KAIBER, 2005).

2.2.1.2 Importância econômica

O Brasil ocupa posição de destaque no cenário mundial de produção e exportação de carnes de perus. Em 2012, a produção brasileira passou de 442 mil toneladas, ultrapassando em mais de 100 toneladas a produção do ano anterior (Figura 1). Dentre a carne produzida, 40% foi destinada à exportação. Foram exportadas 170 mil toneladas de carne, gerando um aumento de 26,8% quando comparado com dados do ano anterior (Figura 1)(UBABEF, 2013). Esses dados colocam o Brasil na posição de segundo maior exportador do mundo, atrás dos Estados Unidos. A receita cambial teve crescimento de 12,5%, chegando a 500,4 milhões de dólares. O principal mercado comprador foi a União Europeia, destino de 46% do total exportado em 2012 (UBABEF, 2013).

Figura 1 - Dados da produção nacional e exportação de carne de perus entre 1999 e 2012. Valores em mil toneladas

Fonte: (UBABEF, 2013)

2.2.2 Colibacilose

O termo colibacilose se refere a qualquer infecção sistêmica ou localizada causada por *Escherichia coli* patogênica para aves (APEC), incluindo: aerossaculite, celulite, colisepticemia, doença respiratória crônica complicada (DRCC), síndrome da cabeça inchada, coligranuloma (doença de Hjarre), peritonite, peri-hepatite, salpingite, onfalite, orquite, sinovite, osteomielite, complexo ostemielite/sinovite dos perus (TOC), panoftalmia, ooforite, entre outras (BARNES; NOLAN; VAILLANCOURT, 2008; FERREIRA; KNÖBL, 2009).

Colibacilose é a infecção bacteriana mais comum em aves de produção e responsável por grandes perdas econômicas em todo mundo (BARNES; NOLAN; VAILLANCOURT, 2008). A doença está entre os principais motivos de condenações de carcaças, sendo que nos Estados Unidos estima-se que 43% das carcaças condenadas por lesões decorrentes de doenças são relacionadas com colisepticemia (YOGARATNAM, 1995). No Brasil, estimasse que 1,3% do total das aves condenadas sejam em decorrência de infecções por APEC (BRASIL, 2013).

Diferente da forma de doença apresentada pelos mamíferos, onde a infecção tende a ser entérica ou urinária, nas aves a doença tem caráter extra-intestinal, podendo ser localizada ou sistêmica (BARNES; NOLAN; VAILLANCOURT, 2008; FERREIRA; KNÖBL, 2009).

A transmissão da colibacilose ocorre principalmente pela via horizontal devido à contaminação por fezes na ração, água de bebida cama e equipamentos do aviário (DHO-MOULIN; FAIRBROTHER, 1999; FERREIRA; KNÖBL, 2009). Nas aves, a porta de entrada na infecção por APEC é o trato respiratório superior, ocorrendo a colonização e multiplicação do agente na traqueia, com posterior disseminação para os sacos aéreos e órgãos adjacentes (coração, pulmão e fígado) (DHO-MOULIN; FAIRBROTHER, 1999; BARNES; NOLAN; VAILLANCOURT, 2008).

Em infecções experimentais em galinhas, a aerossaculite pode começar a ser observada entre uma e duas horas após inoculação. O primeiro passo é o espessamento dos sacos aéreos e presença de exsudato caseoso. Após seis horas, a pericardite começa a ser observada e as lesões incluem o espessamento do

pericárdio e presença de exsudato fibrinoso. A pericardite-miocardite pode causar redução da pressão arterial sanguínea de 150mmHg para 40mmHg. O pico de bacteremia ocorre após 48 horas da inoculação, embora um quadro de septicemia aguda possa se instalar nas primeiras seis horas, causando a morte das aves com ausência de lesões (DEROSA; FICKEN; BARNES, 1992)

Aves jovens (entre quatro e nove semanas) são mais suscetíveis aos quadros respiratórios, enquanto as aves adultas são mais predispostas à ocorrência de salpingites (FERREIRA; KNÖBL, 2009). Infecções experimentais têm mostrado que a colonização do oviduto por *E. coli* é facilitada quando o nível de estrógeno está elevado, ou seja, durante a postura (FERREIRA; KNÖBL, 2009).

Os fatores que predisõem as aves à colibacilose estão relacionados com fatores estressantes do trato respiratório, sejam outros patógenos ou fatores ambientais (ANDREATTI FILHO, 2006; CUNHA et al., 2013). O tratamento com antibióticos e quimioterápicos é uma das formas de se diminuir o impacto da colibacilose. O sucesso do tratamento é maior quando a administração é feita na fase inicial da doença (FERREIRA; KNÖBL, 2009; CUNHA et al., 2013). As medidas de prevenção e controle baseiam-se em medidas inespecíficas de manejo, pois a ocorrência da doença apresenta aspectos multifatoriais como ventilação, nutrição das aves, imunossupressão, densidade de criação, concentração de amônia nos galpões, estresse, aplicação de vacinas vivas, entre outros (FERREIRA; KNÖBL, 2009). A prevenção e controle da colibacilose é tarefa de difícil controle devido à contínua incidência da doença (ANDREATTI FILHO, 2006).

2.2.3 *Escherichia coli*

Escherichia coli é um bastonete curto, não esporulado, de coloração Gram negativa e pertencente à família Enterobacteriaceae. São mesófilos, crescendo de 18°C a 44°C, com temperatura ótima a 37° e 40°. É anaeróbio facultativo, possuindo metabolismo respiratório e fermentativo, e seu tamanho varia de 1,1 a 1,5 µm por 2-6 µm, podendo ser móvel ou imóvel (SUSSMAN, 1997). Algumas características bioquímicas estão listadas no quadro 1. Foi inicialmente denominado *Bacterium*

(*Bacillus coli commune* em 1885 pelo pediatra alemão Theodor Von Escherich, que relacionou a presença dessa bactéria à microbiota entérica de crianças saudáveis (SUSSMAN, 1997). Em 1919 a espécie foi renomeada *Escherichia coli* por Castellani e Calmers, em homenagem ao Dr. Von Escherich (BARNES; NOLAN; VAILLANCOURT, 2008). Pertencem a esta espécie o ser vivo mais conhecido e estudado, a cepa *E. coli* K12, e muitos dos patógenos mais importante para o homem e animais (TRABULSI; ORDOÑEZ; MARTINEZ, 2005).

Quadro 1 - Algumas características bioquímicas e de diagnóstico da espécie *Escherichia coli* segundo Barnes, Nolan e Vaillancourt (2008)

Ágar MacConkey	(+)	Lactose	(+) (em 90%)
Oxidase	(-)	Glicose	(+) (ácido e gás)
Indol	(+)	Manitol	(+)
Vermelho de metila	(+)	Dulcitol	(v)
Catalase	(+)	Sacarose	(v)
Gás Sulfídrico (H ₂ S)	(-)	Salicina	(v)
Motilidade	(v)	Adonitol	(-)
Nitrato > nitrito	(+)	Inositol	(-)
Ágar tergitol	(+)	Sorbitol	(+)
Voges-proskauer	(-)	Malonato	(-)
Citrato (Simmons)	(-)	Celobiose	(-)
Urease	(-)	Meio com KCN	(-)
Lisina descarboxilase	(+)	Agar EMB	(+)
Ornitina descarboxilase	(v)	Fenilalanina desaminase	(-)

(+) crescimento ou reação positiva

(-) crescimento ou reação negativa

(v) reação ou característica variável

E. coli é um dos principais comensais do trato gastrointestinal de mamíferos e algumas espécies de aves, nicho que colonizam poucas horas após o nascimento do animal (SUSSMAN, 1997). No entanto, algumas linhagens de *E. coli* diferem das estirpes comensais. Essas cepas apresentam atributos de virulência característicos, o que lhes permite causar doença. Devido ao comportamento biológico distinto das cepas comensais, essas linhagens foram classificadas em patotipos, conforme o sítio ou tipo de infecção que são capazes de causar (CROXEN; FINLAY, 2010).

Todos os patótipos de *E. coli* podem ser classificados em dois grandes grupos: as linhagens diarreio gênicas, que causam infecção intestinal; e as linhagens extra-intestinais (ExPEC), que ocasionam um amplo espectro de doenças fora do ambiente intestinal. Dentro do grupo diarreio gênico, os patótipos são bem definidos pelas combinações distintas de fatores de virulência, sendo subdivididos nas classes: EHEC (*E. coli* enterohemorrágica); EPEC (*E. coli* enteropatogênica); ETEC (*E. coli* enterotoxigênica); EAEC (*E. coli* enteroagregativa); EIEC (*E. coli* enteroinvasora); DAEC (*E. coli* de aderência difusa) (Figura 2) (CROXEN; FINLAY, 2010).

Figura 2 - Distribuição dos patótipos de *Escherichia coli*

Fonte: (CUNHA et al., 2013)

Já os patótipos extra-intestinais possuem fatores de virulência e características genotípicas e fenotípicas tão próximas que ainda não é possível a classificação pela posse fatores de virulência ou de características biológicas. Os patótipos ExPEC podem ser divididos em: UPEC (*E. coli* uropatogênica), NMEC (*E. coli* associada a meningite neonatal), SEPEC (*E. coli* septicêmica) e alguns autores incluem o patótipo extra-intestinal que afeta as aves, APEC (*E. coli* patogênica para aves (Figura 2) (SMITH; FRATAMICO; GUNTHER, 2007; PITOUT, 2012).

2.2.3.1 *Escherichia coli* patogênica para aves (APEC)

Algumas cepas de *Escherichia coli* possuem atributos de virulência específicos e são capazes de ocasionar doença extra-intestinal (colibacilose) em aves. Essas cepas são denominadas *Escherichia coli* patogênica para aves (APEC). Infecções por APEC resultam em significativa morbidade e mortalidade na indústria de produção de aves em todo mundo e resultam em perdas multimilionárias em todas as áreas de criação de aves (DHO-MOULIN; FAIRBROTHER, 1999; BARNES; NOLAN; VAILLANCOURT, 2008). Normalmente outros agentes infecciosos e fatores não infecciosos, como o ambiente, predispõem as aves à infecção por APEC ou contribuem para a severidade da doença (BARNES; NOLAN; VAILLANCOURT, 2008).

A via natural da infecção por APEC não está totalmente definida, embora as vias orais e respiratórias pareçam ser importantes rotas de entrada. Estima-se que entre 10% e 15% de coliformes do trato digestório das aves de produção pertencem a sorotipos potencialmente patogênicos de APEC (DZIVA; STEVENS, 2008). Isolados APEC pertencem normalmente a certos sorogrupos, particularmente O1, O2, O6, O8, O18, O35, O78, O109 e O115 (DHO-MOULIN; FAIRBROTHER, 1999). No entanto, três desses sorogrupos, O1, O2 e O78, são os mais frequentemente isolados de colibacilose em aves de produção em todo mundo (DHO-MOULIN; FAIRBROTHER, 1999; DZIVA; STEVENS, 2008; NAKAZATO et al., 2009). No Brasil os sorogrupos mais prevalentes em isolados de APEC são: O2, O21, O36, O50, O78, O88, O119 e O152 (FERREIRA; KNÖBL, 2009).

Além da classificação pela estrutura antigênica (O:K:H), várias técnicas fenotípicas como hemaglutinação, ensaio de aderência em cultura de células, ensaio para detecção de hemólise, dentre outras, podem ser utilizadas para caracterização de APEC (BARNES; NOLAN; VAILLANCOURT, 2008). Técnicas que envolvem biologia molecular têm sido desenvolvidas e empregadas com frequência para a caracterização de virulência de amostras APEC (EWERS et al., 2004; JOHNSON et al., 2008b; SCHOULER et al., 2012a).

Não há um consenso na literatura em relação à quais genes seriam os marcadores de virulência ideais. Diferentes autores propõem métodos com base na posse de alguns genes de virulência. Ewers et al. (2005) propuseram que uma amostra seja considerada patogênica para aves quando apresenta pelo menos 4 dos seguintes genes: *papC* (fímbria P), *iucD* (aerobactina), *irp2* (proteína repressora de ferro, envolvida na síntese de yersiniabactina), *tsh* (hemaglutinina termo sensível), *vat* (toxina vacuolizante), *astA* (EAST1- toxina termo lábil de *E. coli* enteroagregativa), *iss* (proteína de aumento da resistência ao sistema complemento), *cva/cvi* (operons relacionados ao plasmídio de colicina - pColV) (EWERS et al., 2005). A combinação de alguns destes genes tem sido correlacionada à virulência da amostra e o genótipo *iss*, *tsh* e *iucD* tem sido apontado como um possível marcador de virulência de APEC (KNÖBL, 2005). Segundo Tivendale et al. (2004), a presença dos genes *iss* e *iuc* é fundamental para a ocorrência de níveis mais elevados de virulência em cepas isoladas de aves.

Já a proposta de Johnson e colaboradores (2008), é que a amostra seja classificada como APEC conforme a posse de cinco genes plasmidiais: *iutA*, *hlyF*, *iss*, *iroN* e *ompT*. Segundo o estudo desses autores, esses genes são comuns às cepas de APEC com alta patogenicidade. Através da presença desses marcadores, chamados preditores mínimos de virulência para aves, cepas comensais foram distinguidas de isolados de APEC altamente patogênicos (JOHNSON et al., 2008b).

Outro trabalho estabelece como estratégia de diagnóstico de APEC a caracterização de amostras aviárias com base em quatro padrões de virulência utilizando alguns genes de virulência (*iutA*, F(11), *sitA*, *aec26*, *aec4*), o sorogrupo O78 e um *orf* encontrado no genoma de algumas APEC (SCHOULER et al., 2012b). Nesse trabalho os autores discriminaram mais de 90% de cepas APEC de cepas apatogênicas utilizando essa técnica.

2.2.3.1.1 Fatores de virulência de APEC

Acredita-se que a colibacilose aviária é uma doença secundária a outros agentes (infecciosos ou ambientais) e que cepas APEC são oportunistas. No entanto,

existem evidências que mostram que alguns clones APEC são especialmente bem adaptados a um estilo de vida como patógenos, o que sugere que as infecções por APEC nem sempre são oportunistas ou secundárias a alguma condição predisponente (BARNES; NOLAN; VAILLANCOURT, 2008).

Assim como as outras variantes das ExPEC, as APEC apresentam um amplo repertório de fatores de virulência (SMITH; FRATAMICO; GUNTHER, 2007). A presença de vários genes de virulência está positivamente relacionada com a patogenicidade desse patótipo (DHO-MOULIN; FAIRBROTHER, 1999). Os fatores de virulência apresentados por APEC incluem: a capacidade de aderência no trato respiratório e subsequente colonização de órgãos internos, mediada por fímbrias; a resistência de bactérias às defesas imunológicas; a multiplicação de bactérias nos líquidos fisiológicos do hospedeiro através da expressão de sideróforos de ferro; e a capacidade de produzir efeitos citopáticos (DHO-MOULIN; FAIRBROTHER, 1999). No entanto, a presença de um único fator raramente torna um organismo virulento, uma combinação de fatores irá determinar se a bactéria pode causar infecção (PITOUT, 2012). Além disso, o fator determinante não é apenas a presença ou a ausência de genes de virulência, mas os níveis de expressão do(s) gene(s), que pode variar entre uma amostra patogênica e uma amostra não patogênica (PITOUT, 2012).

2.2.3.1.1.1 Adesinas

A habilidade de aderir e colonizar vários tipos de superfície é considerado aspecto fundamental na patogenia das infecções bacterianas (KLEMM, 1994). Adesão é a estratégia que as bactérias utilizam para se fixar nas células e tecidos do organismo e causar infecção (SIRLICI; TRABULSI, 2005). Os fatores de colonização chamados de adesinas são moléculas de natureza proteica que cobrem a superfície bacteriana e são capazes de reconhecer receptores nas células eucarióticas (SIRLICI; TRABULSI, 2005). Estudos dos últimos 50 anos mostraram que muitas bactérias saprófitas, comensais ou patogênicas possuem um ou mais tipos de fatores de

aderência, ou adesinas, que lhes permite se ligar a vários substratos orgânicos ou inanimados (KLEMM, 1994).

Quando foram observadas pela primeira vez em microscopia eletrônica, as adesinas foram chamadas de “fios”, “filamentos” e “fibras”, sendo mais tarde denominadas de fímbrias (do latim: linhas, fibras; ou no coletivo: franja) e também pili (do latim: pelos, cabelos). Mais tarde, unidades de polímeros polipeptídeos com um arranjo que permitia a formação de um canal central para conjugação de material genético foi denominado “pili sexual” (KLEMM, 1994).

As fímbrias primárias associadas com APEC pertence à classe *chaperone/usher* e inclui a Fímbria tipo 1, Fímbria P, Fímbria S e F1C. Estas fímbrias têm em média 7 nm de largura e cerca de 1 µm de comprimento de polímeros de superfície. A massa de uma organela fimbrial é um polímero composto por cerca de 1000 subunidades de um elemento de construção, por exemplo, as proteínas PapA, FimA ou SfaA para fímbrias P, tipo 1 e S respectivamente. Além disso, algumas cópias de componentes menores são partes integrantes da fímbria, e atuam como adaptadores para a adesina localizada na ponta, por exemplo, FimH no caso de fímbrias de tipo 1 (KLEMM; HANCOCK; SCHEMBRI, 2010).

Trabalhos que utilizam infecções experimentais como modelo de estudo evidenciam o papel das adesinas no estabelecimento da colibacilose, sugerindo que receptores para as fímbrias do tipo 1 são expressos no trato respiratório, enquanto receptores para fímbrias P e S são expressos nos órgãos internos de frangos infectados (DHO-MOULIN; FAIRBROTHER, 1999). A expressão do operon *fim* (fímbria do tipo 1) é regulada por um elemento chave que pode se inverter, a regulação deste elemento pode influenciar tanto a patogenicidade quanto o tropismo pelo sítio anatômico (GUNTHER IV et al., 2001).

A fímbria P foi primeiramente associada a infecções do trato urinário em humanos, mas também pode ser encontrada em cepas APEC. O operon cromossomal *pap*, responsável pela codificação dessa fímbria, é composto por 11 genes, sendo que seis desses genes estão relacionados com as proteínas estruturais PapA, PapE, PapF, PapG, PapH e PapK (Figura 3) (NAKAZATO et al., 2009).

A fímbria S é uma adesina codificada pelo operon *sfa* e possui afinidade em se ligar a receptores contendo ácido siálico (KLEMM, 1994). Essa fímbria está relacionada com a habilidade de UPEC e NMEC causarem doença extra-intestinal humana, no entanto algumas amostras de aves podem portar o gene *sfa* (KLEMM; HANCOCK; SCHEMBRI, 2010). Em 2012, Knöbl et al. demonstraram que um clone APEC de alta patogenicidade que porta o gene *sfa* circula nas criações de aves de vários estados do Brasil causando colibacilose (KNÖBL et al., 2012).

Figura 3 - Organização dos operons fimbriais: *fim* (azul), *pap* (verde) e *sfa* (laranja)

Fonte: (KLEMM, 1994; SUSSMAN, 1997 adaptado por CUNHA, 2014)

Uma proteína que apresentou atividade hemaglutinante em eritrócitos de frangos a 26°C e teve essa atividade reprimida a 42°C, foi descrita por Provence e Curtiss III em 1994. Essa proteína, denominada hemaglutinina termo-sensível (Tsh), mostrou homologia com proteases de imunoglobulina a partir de *Haemophilus influenzae* e *Neisseria gonorrhoeae*, bem como com a proteína do SepA de *Shigella flexneri*, e com as proteínas EspC e EspP presentes em amostras de EPEC e EHEC (PROVENCE; CURTISS, 1994; DHO-MOULIN; FAIRBROTHER, 1999). Essa homologia sugere que os sistemas de secreção dessas proteínas sejam semelhantes (DHO-MOULIN; FAIRBROTHER, 1999). Desde então, o gene *tsh* tem

sido correlacionado com a com a patogenicidade de amostras APEC. Dozois et al. (2000) demonstraram que a proteína Tsh contribui para lesões nos sacos aéreos das aves, porém não é essencial para causar posterior infecção generalizada, peri-hepatite e pericardite (DOZOIS et al., 2000). Outro trabalho demonstrou que *tsh* tem uma atividade mucinolítica que pode ser importante para a colonização da traqueia das aves e causar colibacilose (KOBAYASHI; GAZIRI; VIDOTTO, 2010).

Outras adesinas são achados menos relevantes em APEC, já que a virulência de cepas APEC não é correlacionada com outras adesinas que não as já mencionadas acima (*fim*, *pap*, *sfa* e *tsh*). O papel da adesina *curli* no processo patogênico da colibacilose não é completamente elucidado, mas algumas propriedades apresentadas, como capacidade de se ligar às moléculas MHC de classe I e às proteínas da matriz extracelular e do soro, podem contribuir para a adesão bacteriana, colonização nos estágios iniciais de uma infecção por APEC e formação de biofilme (DHO-MOULIN; FAIRBROTHER, 1999).

2.2.3.1.1.2 Invasinas

Patógenos Gram negativos desenvolveram diversos mecanismos distintos de secreção para a eficaz exposição da superfície dos domínios de ligação que interagem especificamente com os seus receptores complementares na superfície das células hospedeiras (TSAI et al., 2010). As invasinas, proteínas da família das adesinas, consistem em proteínas de membrana externa (OMP) que mediam a invasão das células do hospedeiro (OELSCHLAEGGER, 2001). Basicamente, as bactérias penetram nas células por fagocitose, no entanto algumas invasinas podem induzir a célula eucariótica a fagocitar. Já dentro da célula, a bactéria pode romper o vacúolo, passando para o citoplasma e se disseminar de uma célula a outra; ou permanecer dentro do vacúolo que as transporta para o tecido subepitelial (SIRLICI; TRABULSI, 2005).

Uma invasina descrita como essencial na patogenia da meningite neonatal em humanos, denominada IbeA, também é encontrada em cepas ExPEC isoladas de aves (GERMON et al., 2005). Em APEC, a invasina IbeA é associada a alta

patogenicidade de cepas aviárias em diversos trabalhos (GERMON et al., 2005; MOULIN-SCHOULEUR et al., 2006; VIDOTTO et al., 2007; CORTES et al., 2008; MORA et al., 2010; WANG et al., 2011, 2012; JOHNSON et al., 2012a; BARBIERI et al., 2013).

O gene *ibeA* está localizado nem uma ilha de patogenicidade de 20,3 Kb, denominada GimA. *ibeA* está inserido entre *yjiD* e *yjiE* e contém quatro operons, alguns dos quais são potencialmente envolvidos no metabolismo de energia (WANG et al., 2011). O gene *ibeA* codifica uma proteína que desempenha um papel importante na invasão de ExPEC em células epiteliais microvasculares do cérebro (BMEC). A inativação de *ibeA* tanto em cepas NMEC, quanto APEC, resultou em falhas de invasão em BMEC tanto *in vitro* como *in vivo* (GERMON et al., 2005; WANG et al., 2011, 2012). Outro estudo demonstrou que a deleção de *ibeA* causa um decréscimo na expressão da fímbria do tipo 1 (*fimH*), sugerindo uma ação em sinergismo desses dois componentes e a modulação de *fimH* por *ibeA* (CORTES et al., 2008). Um trabalho que utilizou um modelo *in vivo* para avaliar a expressão de *ibeA* durante a infecção demonstrou que a expressão de *ibeA* aumentou nove vezes durante a colonização dos sacos aéreos das aves (CHOUIKHA et al., 2008).

2.2.3.1.1.3 Evasinas

Evasinas são fatores de virulência usados para contornar ou vencer as defesas inatas ou adquiridas do organismo. Estas defesas são representadas por fagocitose, sistema complemento, citocinas, linfócitos e anticorpos (SIRLICI; TRABULSI, 2005). A habilidade de resistir ao complemento é uma característica comum das APEC, independentemente da doença, sinal clínico ou a espécie aviária acometida (BARNES; NOLAN; VAILLANCOURT, 2008). A resistência ao complemento apresentada por *E. coli* está relacionada com vários fatores estruturais incluindo cápsula K1 (antígeno capsular 1), outros tipos de cápsula, a camada de lipopolissacarídeo que recobre a bactéria (LPS), alguns tipos de proteínas de membrana externa (OMP), as proteínas TraT, Iss e OmpA (NOLAN et al., 2003; BARNES; NOLAN; VAILLANCOURT, 2008).

O gene que confere resistência às propriedades líticas do soro, *iss*, é apontado como crucial na patogenia das infecções por APEC e também encontrado em cepas NMEC, em contrapartida, não é um fator de virulência relacionado com as UPEC (NOLAN et al., 2003; EWERS et al., 2007; JOHNSON; WANNEMUEHLER; NOLAN, 2008). Existem três alelos de *iss* que ocorrem entre os isolados de *E. coli*, e todos parecem ser originados de um precursor comum, o gene λ *bor*, comumente encontrado em bacteriófagos do tipo λ (JOHNSON; WANNEMUEHLER; NOLAN, 2008). O alelo de *iss* que é altamente prevalente em cepas APEC é denominado tipo 1, e geralmente é encontrado inserido em plasmídeos ColV e ColBM (JOHNSON; WANNEMUEHLER; NOLAN, 2008).

Iss é uma lipoproteína de aproximadamente 10-11 kDa que se localiza na membrana externa da bactéria, onde existem mais ou menos 2000 moléculas de *Iss* por célula bacteriana (NOLAN et al., 2003). A proteína *Iss* foi isolada de cepas APEC, purificada e expressa, teve anticorpos monoclonais produzidos contra ela e foi capaz de proteger aves em desafios homólogos e heterólogos (LYNNE; FOLEY; NOLAN, 2006; LYNNE et al., 2012).

Algumas estruturas podem recobrir a superfície bacteriana, impedindo a fixação do complemento. Estas estruturas de proteção podem estar na forma de cadeias de hidratos de carbono, com um comprimento suficiente para formar uma barreira estereoquímica, agindo contra a fixação do sistema complemento (BIDET; BONARCORSI; BINGEN, 2012). Este é o caso da cápsula K1 (antígeno capsular 1), presente em algumas cepas de ExPEC. A cápsula K1 está associada com infecções invasivas e meningite neonatal (NMEC), e pode ser encontrada em cepas APEC virulentas, como as cepas de filogenia B2 (MOULIN-SCHOULEUR et al., 2006). A baixa imunogenicidade conferida à *E. coli* pela cápsula K1 permite que as cepas portadoras dessa cápsula sejam extremamente resistentes a fagocitose (BIDET; BONARCORSI; BINGEN, 2012). Em adição ao seu papel fundamental na sobrevivência e multiplicação das bactérias no sangue, o antígeno capsular 1 exerce um papel importante na patogenia da meningite neonatal, auxiliando na passagem pela barreira hematoencefálica e chegando às meninges (EWERS et al., 2007; BIDET; BONARCORSI; BINGEN, 2012).

2.2.3.1.1.4 Sideróforos

A habilidade dos patógenos de se multiplicar nos tecidos do hospedeiro é afetada pela disponibilidade de ferro, essencial para o crescimento bacteriano (SUSSMAN, 1997). Em resposta à deficiência de ferro, que é escasso em sua forma livre no organismo dos animais, muitas bactérias sintetizam e secretam sideróforos, pequenas moléculas com alta afinidade por ferro. Embora exista um grande número de diferentes sideróforos, todos eles pertencem a algumas classes estruturais, incluindo catecolato, carboxilato, hidroxamato e sideróforos ligantes mistos (ADLER et al., 2012).

A capacidade de APEC obter ferro é muito bem documentada devido aos vários sistemas de captação e transporte de ferro presentes nesse patotipo. Embora a expressão bacteriana de um único tipo de sideróforo seja suficiente para a aquisição de ferro *in vitro*, a maioria das cepas APEC expressam vários tipos de sideróforos, incluindo aerobactina (*iuc*), yersiniabactina (*fyu* e *irp2*), salmochelina (*iro*) e o sistema *sitABC* (EWERS et al., 2005, 2007; BARNES; NOLAN; VAILLANCOURT, 2008; JOHNSON et al., 2008a,b). Frequentemente as APEC contêm vários desses operons, e normalmente estão localizados em plasmídeos de grande peso molecular, mas podem estar presentes no cromossomo bacteriano, o que é menos usual no caso de *iuc*, *iro* e *sit*. Essa aparente redundância em reunir vários sistemas de captação de ferro demonstra a importância dos sistemas de aquisição e transporte de ferro na patogenia da colibacilose aviária (BARNES; NOLAN; VAILLANCOURT, 2008). Os plasmídeos do tipo ColV frequentemente trazem os operons *iuc*, *sitABC* e *iro* localizados em uma PAI (ilha de patogenicidade) plasmidial. Já o operon que codifica yersiniabactina é encontrado em uma PAI cromossomal (SCHUBERT et al., 1998; JOHNSON; JOHNSON; NOLAN, 2006).

2.2.3.1.1.5 Toxinas

Cepas APEC tendem a ser menos toxigênicas que cepas de patotipos que afetam os humanos (BARNES; NOLAN; VAILLANCOURT, 2008). A prevalência de genes

que codificam toxinas como a toxina citoletal distensora (*cdt*), fator necrotizante citotóxico (*cnf*) e alguns tipos de hemolisinas (*hlyA*, *hlyD*, *hlyE*) costuma ser baixa em APEC (RODRIGUEZ-SIEK et al., 2005a,b.; EWERS et al., 2007; JOHNSON et al., 2008b)

Em contrapartida, alguns genes de toxinas ocorrem em um substancial número de cepas do patotipo aviário (BARNES; NOLAN; VAILLANCOURT, 2008). As genes que codificam a hemolisina aviária (*hlyF*) e a toxina vacuolizante (*vat*) são exemplos. O gene da suposta hemolisina aviária foi descrito em cepas APEC pela primeira vez em 2004 e possui homologia com o gene da hemolisina “silenciosa” *she* encontrada em *E. coli* K12 (MORALES et al., 2004). Esse gene está amplamente distribuído e cepas APEC e é encontrado em uma PAI inserida em plasmídeos ColV e ColBM (JOHNSON; JOHNSON; NOLAN, 2006; JOHNSON et al., 2006, 2008b).

Já a toxina vacuolizante Vat ocorre comumente em APEC e ExPEC humanas. Em ensaios *in vitro*, o sobrenadante de cepas expressando Vat, ou a proteína clonada e purificada, causa lesões vacuolares de células HeLA e Vero em cultura (PARREIRA; GYLES, 2003). Assim como *tsh*, *vat* é membro da família das proteínas SPATE (serina-proteases autotransportadoras produzidas por Enterobacteriaceae) e está localizado em uma ilha de patogenicidade cromossomal denominada VAT-PAI (PARREIRA; GYLES, 2003). A deleção do gene *vat* resulta em atenuação da virulência em APEC (PARREIRA; GYLES, 2003).

2.2.3.1.1.6 Grandes plasmídeos de virulência

Grandes plasmídeos de virulência, com no mínimo 80 kb, são normalmente encontrados em cepas APEC (DOETKOTT et al., 1996). Tais plasmídeos estão fortemente ligados ao grau de patogenicidade da cepa (JOHNSON; NOLAN, 2009). Considerado o protótipo de plasmídeo de virulência em APEC, o plasmídeo ColV, que tem essa denominação por ter entre suas características a produção de colicina V, porta inúmeros genes de virulência (WATERS; CROSA, 1991; DOETKOTT et al., 1996;). Uma curiosidade sobre esses plasmídeos é o fato de sua característica

homônima, a produção de colicina V, não contribuir para a virulência de APEC (JOHNSON et al., 2006).

Outros plasmídeos de virulência também são descritos em APEC, como o ColBM, que difere do ColV pela produção de colicina B e M, mas ambos plasmídeos mantêm os mesmos genes de virulência (JOHNSON; JOHNSON; NOLAN, 2006). Estes dois plasmídeos já tiveram seu genoma completamente sequenciado e foi observado que o plasmídeo ColBM (pAPEC-O1-ColBM), que tem 174 Kb, possui uma região conservada que contém os genes *sitABCD*, o operon *iuc/iuTA* completo, *hlyF*, *iss*, *tsh*, *eitABCD*, *iroBCDN* e *ompT*, idêntica ao plasmídeo ColV (pAPEC-O2-ColV) de 94 Kb (JOHNSON; JOHNSON; NOLAN, 2006). Desde o sequenciamento completo de pAPEC-O2-ColV em 2006, três sequências adicionais plasmídeos ColV tornaram-se disponíveis no GenBank. Diferente do plasmídeo pAPEC-O2-ColV, o plasmídeo pAPEC-1 foi isolado a partir de uma cepa APEC pertencente ao sorogrupo O78 (MELLATA; TOUCHMAN; CURTISS, 2009). Já o plasmídeo pS88 é originário de uma cepa ExPEC do grupo clonal O45:K1:H7 causadora da meningite neonatal (PEIGNE et al., 2009; LEMAÎTRE et al., 2012). O terceiro é o plasmídeo pCVM29188_146 encontrado em uma cepa de *Salmonella* Kentucky isolada de carne de frango (FRICKE et al., 2009). Apesar das diversas fontes de onde se originaram estes plasmídeos, a constituição genética é notavelmente conservada.

Um dado que enfatiza a ideia do potencial zoonótico de APEC é a homologia apresentada pelo plasmídeo pS88, isolado de uma cepa NMEC do grupo filogenético B2, com os plasmídeos pAPEC-O2-ColV e pAPEC-O1-ColBM (PEIGNE et al., 2009). Além disso, plasmídeos idênticos ao pS88 de NMEC foram encontrados em cepas APEC e UPEC humanas, reforçando ainda mais a inespecificidade de hospedeiro pelos patótipos ExPEC (PEIGNE et al., 2009; LEMAÎTRE et al., 2012).

A habilidade de exibir um fenótipo de resistência múltipla aos antimicrobianos (MDR) não é uma característica comum desses plasmídeos, que normalmente são associados à multivirulência (JOHNSON et al., 2006). No entanto, em 2010 Johnson et al. descreveram um plasmídeo ColBM, isolado de uma cepa APEC do sorogrupo O103, que portava tanto genes de resistência quanto genes de virulência. Esse plasmídeo híbrido carregava genes de resistência a β -lactâmicos, tetraciclina, sulfas,

aminoglicosídeos e trimetropim (JOHNSON et al., 2010). Ligações entre regiões MDR e PAIs plasmidiais são particularmente preocupantes, já que o uso de antibióticos pode estar selecionando cepas altamente virulentas e multirresistentes.

2.2.4 Resistência aos antimicrobianos

Desde a descoberta dos primeiros antibióticos na primeira metade do século XX, penicilina e sulfonamidas, uma revolução na maneira de tratar doenças infecciosas foi estabelecida (BOERLIN; WHITE, 2006; GUARDABASSI; KRUSE, 2008). No entanto, foi observado que logo após a introdução de uma nova droga, algumas cepas podiam tornar-se resistentes (GUARDABASSI; KRUSE, 2008). Resistência a um antimicrobiano pode ser definida como a capacidade de um micro-organismo resistir ao efeito de uma concentração geralmente ativa de um antimicrobiano (BOERLIN; WHITE, 2006). Esse fenômeno biológico, que tem sido observado desde a introdução dos antibióticos na prática médica humana e veterinária, vem se agravando com maior rapidez, se comparado ao ocorrido em décadas anteriores (ALMEIDA; PALERMO-NETO, 2005). Um exemplo que ilustra essa afirmação é o rápido aumento dos níveis de resistência a cefalosporinas de terceira geração e a fluorquinolonas no contexto tanto da medicina humana e veterinária (VAN DEN BOGAARD; STOBBERINGH, 2000; ALMEIDA; PALERMO-NETO, 2005).

Essencialmente, a resistência a antibióticos é resultado de mudanças genéticas no micro-organismo, seja por mutação (alteração no cromossomo) ou transferência genética (aquisição de genes de resistência por conjugação, transformação ou transdução). Os resultados dessas alterações são denominados resistência intrínseca e resistência adquirida, respectivamente. (WALSH, 2003). A resistência intrínseca é definida por Boerlin e White (2006) como resistência natural de todos os membros de um grupo taxonômico (gênero, espécie e subespécie) a um antibiótico e resulta de características estruturais e bioquímicas inerentes aos micro-organismos selvagens.

A resistência a um agente antimicrobiano pode ser selecionada por outro antibiótico, por dois mecanismos: seleção cruzada e cosseleção (GUARDABASSI; KRUSE,

2008). A seleção cruzada deve-se à presença de um único gene ou mutação conferindo resistência a dois ou mais agentes, também chamada de resistência cruzada. Já a cosseleção refere-se à coexistência de distintos genes ou mutações na mesma estirpe bacteriana que confere a resistência a diferentes classes de drogas. (GUARDABASSI; KRUSE, 2008).

Bactéria resistentes a um ou mais antimicrobianos (≥ 1) em três ou mais (≥ 3) classes de antimicrobianos são definidas como multirresistentes (MAGIORAKOS et al., 2011).

O uso de antibióticos é responsável por um fenômeno denominado “pressão seletiva”, no qual uma população heterogênea de bactérias quando expostas a um antibiótico, leva a eliminação das cepas suscetíveis e homólogos resistentes sobrevivem. Por causa da habilidade de multiplicar-se exponencialmente, os clones resistentes geram milhões de células bacterianas, todas com o mesmo genótipo que confere resistência (KLEIN; FRANZ, 2005). Esses genes podem conferir resistência cruzada, mencionada anteriormente, contexto que favorece a aquisição de mais genes de resistência. O resultado dessa seleção é uma população homogênea e resistente (KLEIN; FRANZ, 2005).

Atualmente o conhecimento sobre os mecanismos de resistência bacteriana é amplo e a abordagem molecular desenvolvida e utilizada nas últimas décadas tem contribuído para o conhecimento sobre a mobilização de elementos genéticos intra e interespecies, que é crucial para o entendimento e vigilância da multirresistência.

2.2.4.1 Produção animal e a resistência aos antibióticos

Os níveis de resistência em bactérias isoladas em diferentes fases da produção animal têm atingido níveis alarmantes nos últimos anos, pelo uso de antibióticos em doses subterapêuticas, como promotores de crescimento, e terapêuticas (MCEWEN; FEDORKA-CRAY, 2002). Entretanto, a preocupação acerca da resistência gerada no contexto da criação animal não é recente, iniciaram com a criação de um Comitê Misto sobre a utilização de antibióticos na pecuária e Medicina Veterinária na Grã-

Bretanha em 1968 (BOERLIN; WHITE, 2006; GUARDABASSI; KRUSE, 2008). O objetivo dessa comissão, presidida por M. M. Swann, era obter informações sobre a utilização e potencial dos antimicrobianos utilizados em medicina veterinária, com especial atenção à resistência aos antimicrobianos e implicações à saúde pública (GUARDABASSI; KRUSE, 2008). Foi então criado o “relatório de Swann” (*Swann report*, 1969), que trazia recomendações quanto ao uso racional de agentes antimicrobianos, incluindo orientações em relação a evitar resistência cruzada. Este documento foi o fundamento para o desenvolvimento da política sobre utilização prudente de agentes antimicrobianos em todo mundo (KLEIN; FRANZ, 2005; GUARDABASSI; KRUSE, 2008).

Embora a maior parte de casos de infecções por agentes multirresistentes em humanos possa ser atribuída à seleção ocorrida no próprio ambiente humano, há uma forte discussão sobre o papel da criação animal na seleção e disseminação de bactérias resistentes (VAN DEN BOGAARD; STOBBERINGH, 2000; BOERLIN; WHITE, 2006). Alimentos de origem animal são associados à transferência de resistência à antibióticos para humanos, como também são descritos na literatura vários casos de transmissão de bactérias resistentes entre animais e humanos de risco, como agricultores e funcionários de abatedouros (VAN DEN BOGAARD; STOBBERINGH, 2000; KLEIN; FRANZ, 2005; BOERLIN; WHITE, 2006).

Além da proximidade e contato direto com animais, existem três rotas básicas para transferência de resistência a antibióticos e quimioterápicos via alimentos de origem animal (Figura 4). Primeiro é a direta contribuição via resíduos de antibióticos na carne, ovos, leite, entre outros. Segundo, é pela ingestão de bactérias comensais selecionadas por promotores de crescimento nos animais, que podem transferir a resistência para patógenos no trato gastrointestinal humano. A terceira rota é a ingestão de patógenos resistentes, como *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. e *Campylobacter* spp. (WALSH, 2003; KLEIN; FRANZ, 2005). A maior parte dos genes de resistência está situada em elementos genéticos móveis, como plasmídeos, transposons e integrons o que facilita ainda mais a transferência da resistência entre gêneros e entre as espécies bacterianas (JENSEN et al., 2008).

As principais classes de antimicrobianos utilizados em animais de produção apresentam análogos de uso humano e, portanto, induzem resistência cruzada aos antibióticos humanos (BOERLIN; WHITE, 2006).

Figura 4 - Elementos e rotas de transferência de resistência aos antimicrobianos entre animais de produção, humanos e alimentos

Fonte: (KLEIN; FRANZ, 2005 adaptado por CUNHA, 2014)

Apesar da seleção de bactérias resistentes pelo uso de antibióticos em animais, da transferência horizontal de genes de resistência e da transmissão zoonótica ser documentada em vários trabalhos publicados, a quantificação da ocorrência desses eventos é muito difícil (JENSEN et al., 2008). Isso só reitera a importância do uso controlado de antimicrobianos em animais de produção e a vigilância pela saúde pública, o que continua sendo assunto de intenso debate.

2.2.4.2 Resistência aos antimicrobianos em APEC

O tratamento de infecções causadas por cepas ExPEC, tanto em humanos, quanto em animais, tem sido agravado pela emergência de resistência aos antibióticos, principalmente a partir do final da década de 1990 (PITOUT, 2012). Em cepas APEC o problema parece ser ainda maior, pois os índices de resistência apresentados por essas cepas isoladas de aves são maiores que de outras ExPEC (MANGES; JOHNSON, 2012; MELLATA, 2013). Uma hipótese para esses níveis alarmantes de

resistência seria o uso indiscriminado de antibióticos como promotores de crescimento ou como terapêuticos na cadeia de produção de aves (MANGES; JOHNSON, 2012; PITOUT, 2012; MELLATA, 2013; SZMOLKA; NAGY, 2013).

Vários trabalhos realizados em diferentes partes do mundo relatam níveis fenotípicos de multirresistência em APEC acima de 90%, e resistência a todas as classes de antimicrobianos (ZHAO et al., 2005; WANG et al., 2010; AHMED; SHIMAMOTO; SHIMAMOTO, 2013; MELLATA, 2013).

Em relação à epidemiologia molecular dos genes de resistência, vários trabalhos demonstraram a presença de integrons de classe 1 e 2 em cepas isoladas de frangos e perus de produção, geralmente multirresistentes e associados a genes de resistência a quinolonas, aminoglicosídeos, sulfas, fenicóis, macrolídeos e/ou a genes que codificam β -lactamases (KANG et al., 2005; KHAITSA et al., 2008; VASILAKOPOULOU et al., 2009; SOUFI et al., 2009, 2013; PONCE-RIVAS; MUÑOZ-MÁRQUEZ; KHAN, 2012; AHMED; SHIMAMOTO; SHIMAMOTO, 2013).

Cepas APEC que portam genes de β -lactamases, inclusive as de espectro estendido (ESBL), já foram identificadas em várias partes do mundo. Algumas β -lactamases já descritas em APEC foram: TEM-1, TEM-104, SHV-2, CMY-2, OXA-30, CTX-M-2, CTX-M-9, CTX-M-14, CTX-M-15, CTX-M-24 e CTX-M-32 (MORA et al., 2010; ASAI et al., 2011; SUN et al., 2012; AHMED; SHIMAMOTO; SHIMAMOTO, 2013).

Relacionado com a produção de CTX-M-15, o grupo clonal O25b:H4 ST131 B2 emergiu em 2008 como um nova linhagem patogênica de *E. coli* de distribuição mundial (COQUE et al., 2008). Amostras APEC multirresistentes pertencentes a esse clone foram isoladas na Europa, América do Norte e África (JOHNSON et al., 2009b; MORA et al., 2010; VINCENT et al., 2010; PLATELL et al., 2011; AHMED; SHIMAMOTO; SHIMAMOTO, 2013). Ainda não se tem registros desse grupo clonal em cepas APEC no território nacional. No entanto, Dhanji et al. (2010) isolaram 210 cepas de *E. coli* de carne de frango importada da América do Sul para o Reino Unido em 2008, e encontraram várias cepas produtoras de ESBL, incluindo uma cepa O25:H4 ST131 da carne de frango originária do Brasil. Mora et al. (2010) demonstraram sobreposição de genes de virulência e relação clonal entre um isolado APEC e um isolado de UPEC de origem humana, ambos O25b:H4 ST131, ratificando o potencial zoonótico desse clone patogênico e multirresistente.

Além do consagrado grupo O25b:H4 ST131, outros grupos clonais que são conhecidos por combinar multirresistência e alta patogenicidade para humanos, como O11/O17/O77:K52:H18-D-ST69 (também chamado CgA, ou “grupo clonal A”), vários sorotipos-A-ST10, vários sorotipos-D-ST117, O1/O2/O18:K1:H7-B2-ST95 e O111:H4-D-ST2085 são conhecidos pelo potencial zoonótico e já foram identificados entre isolados APEC (MANGES; JOHNSON, 2012; MORA et al., 2012).

Além das ESBLs, cepas APEC também já foram descritas como carreadoras de plasmídeos de resistência às (fluoro)quinolonas (PMQR) (THORSTEINSDOTTIR et al., 2010; LITERAK et al., 2013). Os mecanismos de resistência às quinolonas mediado por plasmídeos podem ser do tipo Qnr, proteínas que se ligam à DNA girase, impedindo ação das quinolonas; por dois tipos de bomba de efluxo, *qepA* ou *oqxAB*; ou por ação de uma acetiltransferase de aminoglicosídeos, capaz de reduzir a atividade do ciprofloxacino e codificada pelo gene *aac(60)-Ib-cr* (POIREL; CATTOIR; NORDMANN, 2012). Apesar do clássico mecanismo de mutação no DNA girase (*gyrA*) e topoisomerase IV (*parC*) como responsável pela resistência às quinolonas, predominarem em cepas APEC, a resistência às quinolonas mediada por plasmídeos PMQR tem sido cada vez mais reportada. Dentre os PQMR, a variante *qnrS* parece ser a mais frequentemente relatada e mundialmente difundida em animais e fontes humanas (STRAHILEVITZ et al., 2009). Estudos apontam frangos e suínos da Europa e China como reservatório de *E. coli* que portam genes de resistência às quinolonas, principalmente das variantes *qnrB* e *qnrS* (HUANG et al., 2009; PONCE-RIVAS; MUÑOZ-MÁRQUEZ; KHAN, 2012; LITERAK et al., 2013; SZMOLKA; NAGY, 2013). Fortalecendo essa ideia, amostras comensais positivas para *qnrB* têm sido frequentemente isoladas de perus na Europa (VELDMAN et al., 2011). Para agravar ainda mais o problema, os genes de resistência às quinolonas encontrados em cepas isoladas de animais de produção são geralmente associados a genes de resistência aos β -lactâmicos, aminoglicosídeos, cloranfenicol e tetraciclina (POIREL; CATTOIR; NORDMANN, 2012).

No Brasil os estudos sobre resistência em APEC são escassos, mas trabalhos envolvendo análise fenotípica de resistência de cepas aviárias demonstram um panorama parecido com o de outros países. Em trabalhos realizados em 2002, 2004 e 2010, cepas APEC apresentaram resistência a todas as classes de drogas. A resistência a sulfonamidas e tetraciclina apresentam os maiores índices, variando

entre 90% e 50%, enquanto os índices a fluorquinolonas, β -lactâmicos e aminoglicosídeos apresentaram índices abaixo de 50% (CARDOSO et al., 2002; ZANATTA et al., 2004; MARIETTO GONÇALVES; ANDREATTI FILHO, 2010).

2.3 OBJETIVOS

Considerando a importância econômica e o potencial zoonótico de APEC, o objetivo desse trabalho foi caracterizar cepas de APEC isoladas de perus condenados por aerossaculite em abatedouros em relação ao genótipo de virulência, determinação dos grupos filogenéticos e resistência antimicrobiana.

2.4 MATERIAIS E MÉTODOS

2.4.1 Amostras de APEC

Um total de 225 cepas não duplicadas de *Escherichia coli* foram isoladas do saco aéreo de 300 perus condenados por aerossaculite em abatedouros, as aves eram provenientes de 8 diferentes granjas. As amostras foram colhidas durante a linha de abate, com suabes estéreis com meio de transporte (Meio de Stuart) mantidos sob refrigeração até o momento do processamento. As aves foram abatidas em frigorífico comercial inspecionado pelo SIF, segundo recomendação do Ministério da Agricultura, sendo insensibilizados por eletronarcore e submetidos à sangria. Foram realizadas nove coletas, sendo selecionados de sete a 45 animais com aerossaculite por coleta, de acordo com a frequência de lesões observadas no lote abatido no dia.

Os suabes coletados foram transportados até o Laboratório de Sanidade Suína e Virologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (LSSV/VPT/FMVZ – USP). As amostras foram coletadas nos meses de maio, junho e novembro de 2009. A cultura foi realizada em caldo BHI por 18 a 24 horas seguida de plaqueamento em ágar MacConkey e incubadas a 37°C por 24 horas. As

colônias foram confirmadas por testes bioquímicos (EPM, MiLi e Citrato de Simmons) e armazenadas a - 80°C em caldo Luria bertani adicionados a 30% glicerol.

2.4.2 Determinação do fenótipo de resistência aos antimicrobianos

O perfil de resistência dos 225 isolados foi determinado utilizando com o teste de difusão em disco de acordo com o protocolo descrito no documento M31-A3 do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (CLSI, 2008). Os agentes antimicrobianos testados foram ácido nalidixico, amoxicilina, cefotaxima, ceftiofina, ceftiofur, enrofloxacino, eritromicina, gentamicina, norfloxacino, estreptomicina, sulfonamidas, tetraciclina e trimethoprim-sulfametoxazol. A cepa de referência *Escherichia coli* ATCC 25922 foi utilizada como controle.

2.4.3 Determinação do Genótipo de virulência

Para a determinação do genótipo de virulência as amostras isoladas foram submetidas a extração de DNA pelo método descrito por Boom (BOOM et al., 1990). Após a extração as amostras foram submetidas à técnica de PCR (reação em cadeia pela polimerase – *polymerase chain reaction*) monoplex. A mistura para as reações continham: 2,5 µL do DNA, tampão para PCR 1X, MgCl² (1,5 mM), 100 mM de cada desoxiribonucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 25 pmol de cada primer (listados na tabela 3), 1 U da enzima Taq polimerase (Fermentas®) e água ultrapura autoclavada totalizando 25 µL por reação. Os ciclos de amplificação consistiam de um ciclo de desnaturação inicial de 95°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos de 95°C por 60 segundos de desnaturação, ciclo de anelamento variável para cada par de primer (descritos na tabela 3) por 60 segundos, 72°C de extensão por 60 segundos e um ciclo final de extensão de 72°C por 10 minutos. Os produtos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5% (100V por 2 horas) corados com SyBR Safe® DNA gel stain (Invitrogen, São Paulo, Brasil).

Como marcador de peso molecular foi utilizado 100 bp DNA ladder (LGC, São Paulo, Brasil). As cepas padrão utilizadas como controle positivo pertencem ao Laboratório de Ornitopatologia I da FMVZ-USP e estão descritas no quadro 2. Os primers, descrição dos genes, temperatura de anelamento e referências estão descritos no quadro 3.

Quadro 2 - Amostras padrão utilizadas como controle na determinação dos genótipos de virulência das 225 amostras APEC

Identificação	Característica (genótipo/sorotipo)	Origem
EC460	<i>neuS, ibeA</i> (O6:K1)	Poedeira com salpingite (SP, Brasil)
EC1881	<i>cvi/cva, tsh, iucD, papc, irp2, ibeA</i> (O8:NT)	Intestino pintinho diarreia (GO, Brasil)
EC1884	<i>vat, tsh, iucD, irp2, iss</i> (NT)	Fígado frango corte (SP, Brasil)
EC1886	<i>vat, irp2, astA, iroN</i> (O112)	Fígado frango corte (SP, Brasil)
EC1890	<i>cvi/cva, vat, irp2, iroN</i> (O23)	Pericárdio frango corte (SP, Brasil)
042	<i>astA, aggR</i> (O44:H18)	Diarreia humana (Lima, Peru)
17-2	<i>astA, aggR</i> (O3:H2).	Diarreia humana (Chile)

Quadro 3 - Descrição dos genes, sequência dos primers, números de acesso GenBank, temperatura de anelamento e tamanho do amplicon dos genes pesquisados

Gene	Sequência dos Primers (5'- 3')	Descrição	Nº acesso GenBank	Temperatura anelamento	Amplicon (bp)	Referência
<i>papC</i>	TGATATCACGCAGTCAGTAGC CCGGCCATATTCACATAA	Fímbria P	Y00529	54°C	501	(JANß EN et al., 2001)
<i>tsh</i> ¹	GGGAAATGACCTGAATGCTGG CCGCTCATCAGTCAGTACCAC	Hemaglutinina termo-sensível	AF218073	57°C	420	(MAURER et al., 1998)
<i>iroN</i> ¹	AATCCGGCAAAGAGACGAACCGCCT GTTCCGGCAACCCCTGCTTTGACTTT	Salmochelina (receptor)	AAN76093	60°C	553	(JOHNSON et al., 2006)
<i>iucD</i> ¹	TACCGGATTGTCATATGCAGACCGT AATATCTTCCTCCAGTCCGGAGAAG	Aerobactina (síntese)	M18968	63°C	602	(YAMAMOTO et al., 1995)
<i>irp2</i>	AAGGATTGCTGTTACCGGAC TCGTCCGGGCAGCGTTTCTTCT	Yersiniabactina (síntese)	L18881	61°C	281	(SCHUBERT et al., 1998)
<i>iss</i> ¹	GTGGCGAAACTAGTAAAACAGC CGCCTCGGGGTGGATAA	Resistência ao soro	X52665	58°C	760	(HORNE et al., 2000)
<i>cvi/cva</i> ¹	TCCAAGCGGACCCCTTATAG CGCAGCATAGTTCCATGCT	Genes estruturais do operon ColV	AJ223631	57°C	598	(EWERS et al., 2007)
<i>neuS</i>	TATAATTAGTAACCTGGGGC GGCGCTAATGAATAAGACTG	Cápsula K1	M76370	55°C	927	(TSUKAMOTO, 1997)
<i>ibeA</i>	TGGAACCCGCTCGTAATATAC CTGCCTGTTCAAGCATTGCA	Invasão do endotélio cerebral	YP_543969	59°C	342	(EWERS et al., 2007)
<i>vat</i>	TCCTGGGACATAATGGTCAG GTGTCAGAACGGAATTGT	Toxina vacuolizante	AY181282	56°C	981	(EWERS et al., 2004)
<i>astA</i>	TGCCATCAACACAGTATATCC TAGGATCCTCAGGTCGCGAGTGACGGC	EAST1- toxina termolábil de EAEC	AF143819	51°C	116	(YAMAMOTO; ECHEVERRIA, 1996)
<i>aggR</i> ²	GTATACACAAAAGAAGGAAGC ACAGAATCGTCAGCATCAGC	Ativador transcricional de AAFs em EAEC	13877411	58°C	254	(TOMA et al., 2003)

¹ Genes relacionados com plasmídeos de virulência de grande peso molecular como pColV, pColBM e pTJ100

² Gene testado apenas nas 39 amostras positivas para *astA*.

2.4.4 Análise filogenética

As 225 cepas foram submetidas à análise filogenética segundo o método descrito por Clermont, Bonacorsi e Bingen (2000). Tal método consiste em um triplex PCR para classificar cada cepa em um dos quatro grupos filogenéticos (A, B1, B2 e D) baseado na presença de dois gene (*chuA* e *yjaA*) e um fragmento anômalo de DNA (TSPE4.C2) descritos na tabela 4.

Quadro 4 - Descrição dos genes utilizados para a classificação de grupos filogenéticos de *E.coli*, sequência dos iniciadores e tamanho do fragmento amplificado

Gene/ Fragmento	Descrição	Primer	Sequência (5' - 3')	Amplicon (pb)
<i>chuA</i>	Gene necessário para o transporte de heme em O157:H7	ChuA.1	GACGAACCAACGTCAGGA	279
		ChuA.2	TGCCGCCAGTACCAAAGACA	
<i>yjaA</i>	Gene identificado no genoma de <i>E. coli</i> K-12, com função desconhecida	YjaA.1	TGAAGTGTCTCAGGAGACGCTG	211
		YjaA.2	ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC	
TspE4.C2	Fragmento anômalo de DNA	TspE4C2.1	GAGTAATGTTCGGGGCATTCA	152
		TspE4C2.2	CGCGCCAACAAAGTATTACG	

2.4.5 Análise estatística

Para as comparações entre grupos filogenéticos, fatores de virulência e resistência antimicrobiana foi utilizado o teste exato de Fisher (duas caudas) or χ^2 com correção de Yates, quando apropriado. O nível de significância estatística foi estabelecido em valor de $p \leq 0.05$. O software utilizado foi BioStat® 5.3.5 (AnalystSoft).

2.5 RESULTADOS

Este estudo demonstrou que 92% (207/225) das cepas apresentaram fenótipo de multirresistência (resistência a ≥ 1 agente em ≥ 3 categorias de antimicrobianos). Os maiores índices de resistência foram a sulfonamidas 94,2% (212/225), tetraciclina 83,1% (187/225) e eritromicina 82,6% (186/225). Dos quatro β -lactâmicos testados, a resistência a amoxicilina foi a mais prevalente (53,7%), seguida da resistência à cefotaxima (10,2%), cefoxitina (5,7%) e ceftiofur (4,4%). Entre as quinolonas e fluorquinolonas a resistência ao ácido nalidíxico foi de 48%, seguido por enrofloxacino (19%) e norfloxacino (15,1%). Cepas resistentes à estreptomicina e gentamicina tiveram prevalência de 60,4% e 19,5%, respectivamente (Figura 5). Nenhuma cepa foi sensível a todos antibióticos (ATBs). As 225 cepas apresentaram em média resistência a 5,4 ATBs.

Figura 5 - Distribuição das 225 cepas APEC em relação à resistência antimicrobiana e grupos filogenéticos

NAL= Ácido Nalidíxico, ENO= Enrofloxacino, NOR=Norfloxacino, AMO=Amoxicilina, CXT=Cefotaxima, FOX=Cefoxitina, CTF=Ceftiofur, ERI=Eritromicina, GEN=Gentamicina, STR=Estreptomicina, FLO=Florfenicol, TET=Tetraciclina, SUL= Sulfonamidas, SXT=Sulfametoxazol/trimetropim.

Em relação aos perfis de resistência, 108 diferentes combinações de fenótipos de resistência entre os 14 ATB testados foram observadas, sendo a combinação de resistência à amoxicilina, eritromicina, estreptomicina, tetraciclina, sulfonamidas e sulfametoxazol/trimetopim o perfil de resistência mais prevalente (5,7%). O perfil de resistência a nove antibióticos (NAL, ENO, NOR, AMO, ERI, STR, TET, SUL, SXT) só esteve presente em cepas do grupo filogenético B1 (Quadro 5).

Quadro 5 - Distribuição das 225 cepas APEC em relação aos perfis de resistência apresentados

Perfil de resistência	Filogrupo (n)	Total n (%)
AMO, ERI, STR, TET, SUL, SXT	A (6), B1 (3), B2 (4)	13 (5,7)
NAL, ENO, NOR, AMO, ERI, STR, TET, SUL	A (3), B1 (8), D (1)	12 (5,3)
ERI, TET, SUL	A (4), B1 (3), B2 (2), D (1)	10 (4,4)
NAL, AMO, ERI, STR, TET, SUL, SXT	A (1), B1 (4), B2 (4)	9 (4)
ERI, SUL	B1 (1), B2 (6)	7 (3,1)
NAL, ENO, NOR, AMO, ERI, STR, TET, SUL, SXT	B1 (6)	6 (2,7)
AMO, ERI, STR, TET, SUL	A (1), B1 (1), B2 (4)	6 (2,7)
AMO, STR, TET, SUL, SXT	B1 (2), B2 (3), D (1)	6 (2,7)
ERI, STR, TET, SUL	B1 (1), B2 (4), (D1)	6 (2,7)
ERI, STR, TET, SUL, SXT	A (2), B1(1), B2 (1), D (1)	5 (2,2)
Outras 98 combinações	A (21), B1 (34), B2 (84), D (6)	145 (64,5)
≥ 3 Antibióticos	A (38), B1 (62), B2 (98), D (11)	209 (92,9)
≥ 5 Antibióticos	A (24), B1 (53), B2 (35), D (5)	117 (52)
≥ 8 Antibióticos	A (7), B1 (20), B2 (13), D (1)	41 (18,3)

NAL= Ácido Nalidíxico, ENO= Enrofloxacino, NOR=Norfloxacino, AMO=Amoxicilina, CTX=Cefotaxima, FOX=Cefoxitina, CTF=Ceftiofur, ERI=Eritromicina, GEN=Gentamicina, STR=Estreptomicina, FLO=Florfenicol, TET=Tetraciclina, SUL= Sulfonamidas, SXT=Sulfametoxazol/trimetopim.

A análise filogenética demonstrou que metade dos isolados pertenciam ao grupo filogenético B2 (112/225), seguido pelo grupo B1(64/225), grupo A (38/225) e grupo D (11/225). As cepas do filogrupo B2 estiveram associadas a um maior número de fatores de virulência, apresentando uma média de 6,5 fatores de virulência por cepa, enquanto que os demais grupos filogenéticos apresentaram mais ou menos 4,4 fatores de virulência por cepa (Tabela 1).

Tabela 1 - Distribuição das 225 cepas APEC em relação ao grupo filogenético e escore de virulência do total e de cada grupo

Grupo filogenético (n - %)	Média FV/cepa*
A (38 - 17,1%)	4,3
B1 (64 - 28,6%)	4,2
B2 (112 - 50%)	6,5
D (11 - 4,8%)	4,4
Total (225 - 100%)	5,4

*Representa a soma do total de fatores de virulência do grupo e divisão pelo número de cepas

O genótipo de virulência demonstrou que os genes plasmidiais *iroN* e *iss* estavam presentes em 214 (95%) e 211 (93%) dos isolados. Outros dois genes plasmidiais, *cvi/cva* e *iucD*, tiveram a mesma prevalência de 67%(152/225), seguidos pelo gene que codifica a hemaglutinina termo sensível (*tsh*) com prevalência de 56%. O gene *tsh* também esteve positivamente associado às cepas do grupo filogenético B2 ($p \leq 0.05$), assim como os genes *vat*, *irp2*, *ibeA* e *neuS* (Tabela 2). O gene *aggR* foi negativo em todas 39 cepas positivas para *astA*.

Tabela 2 - Distribuição de 225 cepas de APEC em relação grupo filogenético e prevalência dos fatores de virulência

Grupo (n)	Prevalência n (%)										
	<i>iroN</i>	<i>iss</i>	<i>cvi/cva</i>	<i>tsh</i>	<i>vat</i>	<i>iucD</i>	<i>irp2</i>	<i>neuS</i>	<i>ibeA</i>	<i>papC</i>	<i>astA</i>
A (38)	33 (87)	37 (97)	27 (71)	19 (48)	1 (2)	24 (63)	15 (38)	0 (0)	3 (8)	1 (2)	5 (13)
B1 (64)	62 (96)	59 (92)	38 (59)	24 (38)	1 (1)	43 (67)	14 (22)	2 (3)	16 (25)	8 (12)	8 (14)
B2 (112)	109 (97)	105(93)	81 (72)	80 (71)	52 (46)*	79 (70)	85 (75)*	40 (36) *	50 (45) *	24 (21)	24 (21)
D (11)	10 (90)	10 (90)	6 (54)	5 (45)	2 (18)	6 (54)	3 (27)	1 (9)	3 (27)	1 (9)	2 (18)
Total (225)	214 (95)	211(93)	152 (67)	128 (56)	56 (24)	152 (67)	116 (51)	43 (19)	71 (31)	34 (15)	39 (17)

*Indica associação positiva entre fator de virulência e grupo filogenético ($p \leq 0.05$). Valor-p foi determinado utilizando o teste exato de Fisher para comparações entre fatores de virulência e cada grupo filogenético, bem como comparação entre todos os grupos.

As cepas foram agrupadas em 96 distintos perfis de virulência, sendo a combinação de nove genes *vat*, *irp2*, *cvi/cva*, *neuS*, *iroN*, *iss*, *iucD*, *tsh*, *ibeA* a mais prevalente

(17,5%), pertencendo todas as cepas que apresentaram esse perfil ao grupo filogenético B2 (Quadro 6).

Quadro 6 - Distribuição das 225 cepas APEC em relação aos perfis de virulência apresentados

Perfis de virulência	Filogrupo (n)	Total n (%)
<i>vat, irp2, cvi/cva, neuS, iroN, iss, iucD, tsh, ibeA</i>	B2 (17)	17 (7,5)
<i>irp2, cvi/cva, iroN, iss, iucD, tsh</i>	A (12), B1 (2), B2 (2)	16 (7,1)
<i>cvi/cva, iroN, iss</i>	A (5), B1 (5), B2 (3), D (1)	14 (6,2)
<i>irp2, cvi/cva, neuS, iroN, iss, iucD, tsh, ibeA</i>	B2 (8)	8 (3,5)
<i>iroN, iss</i>	A (3), B1 (4), B2 (1)	8 (3,5)
<i>cvi/cva, iroN, iss, iucD, tsh</i>	A (2), B1 (4), B2 (1)	7 (3,1)
<i>cvi/cva, iroN, iss, iucD</i>	B1 (6)	6 (2,6)
<i>iroN, iss, iucD</i>	B1 (3), B2 (1), D (1)	5 (2,2)
<i>irp2, iroN, iss, iucD</i>	B1 (4), B2 (1)	5 (2,2)
<i>vat, irp2, cvi/cva, iroN, iss, iucD, tsh, ibeA</i>	B2 (4), D (1)	5 (2,2)
Outras 86 combinações	A (16), B1 (36), B2 (74), D (8)	134 (59,5)
≥ 4 genes	A (24), B1 (45), B2 (99), D (8)	176 (78,3)
≥ 6 genes	A (14), B1 (13), B2 (79), D (2)	108 (48)
≥ 8 genes	B2 (43), D (1)	44 (19,6)

Relacionando a resistência antimicrobiana com os determinantes de virulência e grupos filogenéticos, foi demonstrado que as cepas suscetíveis às fluorquinolonas (enrofloxacino e norfloxacino) estiveram positivamente associadas ($p \leq 0.05$) a vários fatores de virulência (*vat, irp2, cvi/cva, neuS, ibeA* e *tsh*), ao grupo filogenético B2 e também ao grupo dos isolados que apresentavam mais de 5 fatores de virulência. Já as cepas resistentes às fluorquinolonas estiveram associadas ao filogrupo B1 e ao grupo de cepas com menos de cinco fatores de virulência. Esse link entre aumento de virulência associado à suscetibilidade antimicrobiana também foi observado em cepas suscetíveis à amoxicilina, estreptomicina, tetraciclina e sulfametoxazol/trimetropim. O grupo que apresentava um fenótipo de resistência associado à maior virulência e ao grupo filogenético B2 foram as cepas resistentes a gentamicina (Tabela 3).

Tabela 3 - Distribuição dos determinantes de virulência em relação ao fenótipo de resistência aos antimicrobianos das 225 cepas APEC

Fator de virulência	Antibiótico																									
	NAL ^a		ENO		NOR		AMO		CTX		FOX		CTF		ERI		GEN		STR		FLO		TET		SXT	
	R ^b	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S
<i>astA</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-
<i>vat</i>	-	-	-	+	-	+	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	++	-	-	-	++	-	+
<i>irp2</i>	-	-	-	+	-	++	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+
<i>cvi/cva</i>	+ ^c	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+
<i>neuS</i>	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>iroN</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>iss</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>papC</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>ibeA</i>	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>iucD</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>tsh</i>	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
MV ^d (≥ 5 VF)	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Não-MV (<5)	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
Filogrupo																										
A	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B1	+	-	++	-	++	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
B2	-	-	-	++	-	++	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Escore de virulência	5,5	5,2	4,3	5,6	4,1	5,6	5	5,9	5,4	5,4	5,7	5,3	6,6	5,3	5,3	5,8	6,7	5	5,2	5,6	6,1	5,3	5,1	6,5	4,8	5,7

Sulfonamidas não estão representadas na tabela porque não estiveram associadas com nenhum determinante de virulência ou grupo filogenético.

^a NAL= Ácido Nalidíxico, ENO= Enrofloxacino, NOR=Norfloxacino, AMO=Amoxicilina, CTX=Cefotaxima, FOX=Cefoxitina, CTF=Ceftiofur, ERI=Eritromicina, GEN=Gentamicina, STR=Estreptomicina, FLO=Florfenicol, TET=Tetraciclina, SXT=Sulfametoxazol/trimetropim.

^b R= Resistente, S= Suscetível

^c Indica associação positiva entre virulência e resistência ou suscetibilidade (“+”= p <0.05; “++” =p <0.0001; “-” = indica valor sem significância estatística).

2.6 DISCUSSÃO

Nas últimas décadas, um grande número de pesquisas tem explorado a epidemiologia molecular de APEC na tentativa de elucidar os mecanismos de patogênese, determinar quais os marcadores moleculares ideais e contribuir para a diminuição das perdas geradas por esse patotipo na cadeia de produção de aves. Mais recentemente, os estudos envolvendo APEC têm se voltado para outras duas vertentes, o potencial zoonótico dessas cepas, já que muitos isolados APEC são estreitamente relacionadas com ExPEC humanas (NMEC e UPEC), e o problema da multirresistência aos antibióticos.

Com o objetivo de traçar o perfil molecular de virulência, *background* filogenético e o perfil fenotípico de resistência antimicrobiana, este trabalho investigou cepas de *Escherichia coli* isoladas de perus condenados em abatedouros por aerossaculite.

A posse de plasmídeos ColV ou a presença de sequências associadas a esses plasmídeos tem sido correlacionada com a virulência de cepas APEC (JOHNSON et al., 2006, 2008b). No nosso estudo, os genes normalmente carregados por esses plasmídeos, como *iroN*, *iss*, *iucD*, *tsh* e *cvi/cva*, tiveram altas prevalências (Tabela 7), sendo que *iroN* e *iss* estiveram presentes em mais de 93% das cepas. Johnson et al. identificou cinco genes plasmidiais essenciais para cepas com alta patogenicidade, de maneira que, isolados fecais de *E. coli* foram distinguidos de isolados de APEC de alta patogenicidade pela presença desses genes, dentre os quais *iroN* e *iss* (JOHNSON et al., 2008b). Vários autores observaram que em plasmídeos ColV as sequências que codificam fatores de virulência normalmente tem uma organização conservada e genes como *iroN*, *iss*, *iucD* e *tsh* fazem parte dessas sequências conservadas nesses plasmídeos (JOHNSON; JOHNSON; NOLAN, 2006; JOHNSON et al., 2006; TIVENDALE; ALLEN; BROWNING, 2009). Em um estudo realizado na Coreia do Sul com cepas APEC isoladas entre 1985 e 2005 mostrou que a prevalência de *iroN* foi de 100% em cepas coletadas em de todos os períodos, já a prevalência do gene *iss* foi crescente conforme o passar dos anos (JEONG et al., 2012).

A fímbria P (*pap* - pyelonephritis-associated pilus) é um importante marcador de virulência de ExPEC, sendo associado a cepas UPEC humanas e de cães, e também a cepas APEC (RODRIGUEZ-SIEK et al., 2005b; SMITH; FRATAMICO; GUNTHER, 2007). Neste estudo, a prevalência do gene *papC* (15%) é menor quando comparada com estudos realizados com APEC na Alemanha (EWERS et al., 2004, 2007) e Estados Unidos (RODRIGUEZ-SIEK et al., 2005b; JOHNSON et al., 2008a), mas aproximada quando comparada com um trabalho realizado com cepas APEC isoladas de galinhas no Brasil (KNÖBL et al., 2012).

Os sistemas de captação e transporte de ferro são essenciais durante a patogênese das infecções por ExPEC e as cepas desse patotipo desenvolveram várias estratégias para sequestrar ferro do organismo do hospedeiro (GAO et al., 2012). Nesse estudo foram pesquisados três genes com a função de relacionadas à aquisição e transporte de ferro. Além do gene *iroN*, discutido anteriormente, foram pesquisados *iucD* e *irp2*, que estiveram presentes em 51% e 67% das cepas, respectivamente. Os dados de prevalência desses genes corroboram com trabalhos realizados na Ásia e Europa (JANSEN et al., 2001; EWERS et al., 2004, 2007; JEONG et al., 2012). Os genes de invasão *ibeA* e *neuC* são associados a cepas NMEC e representam importante papel na patogenia da meningite neonatal (GERMON et al., 2005; MOULIN-SCHOULEUR et al., 2006; EWERS et al., 2007; JOHNSON et al., 2008a).

Em três trabalhos que comparavam cepas APEC e NMEC, as cepas APEC que apresentavam esses dois genes pertenciam exclusivamente, ou na maior parte das vezes, ao grupo filogenético B2 e exibiam sobreposição de fatores de virulência e sorogrupos, estando estreitamente relacionadas com cepas NMEC (MOULIN-SCHOULEUR et al., 2006; EWERS et al., 2007; JOHNSON et al., 2008a). Germon et al. demonstraram que o gene *ibeA* tinha importante papel na patogenia da colibacilose aviária em uma cepa padrão utilizada em estudos de invasão. Após a deleção do gene *ibeA*, esses autores observaram decréscimo na virulência dessa cepa (GERMON et al., 2005). Em nosso trabalho, as cepas *ibeA* e *neuS* positivas, que tiveram prevalência de 31% e 19%, estiveram positivamente associadas ao filogrupo B2 ($p \leq 0.05$) (Tabela 2) e com cepas que apresentavam grande número de fatores de virulência associados (Quadro 6).

Vários trabalhos realizados em diversas localidades, inclusive no Brasil, classificaram a maioria das cepas APEC nos grupos filogenéticos A e D (EWERS et al., 2007; JOHNSON et al., 2008a,b; KOBAYASHI et al., 2011). Cepas ExPEC humanas pertencem quase que exclusivamente ao grupo B2, e uma fração menor ao grupo D (CLERMONT; BONACORSI; BINGEN, 2000; SMITH; FRATAMICO; GUNTHER, 2007). Nossos resultados mostraram que a maioria das cepas aqui pesquisadas pertencia ao grupo filogenético B2 (50%), seguida pelos grupos B1(28,5%), A (17%) e D (4,5%).

O grupo filogenético B2 é considerado mais virulento em infecções por ExPEC e normalmente porta um maior número de genes de virulência (SMITH; FRATAMICO; GUNTHER, 2007; MELLATA, 2013). As cepas pertencentes ao grupo filogenético B2 do presente estudo apresentaram média maior número de genes por cepa (6,5), quando comparado com o escore de virulência dos outros grupos (Tabela 1). Esses dados sugerem que essas cepas B2 associadas a fatores de virulência como *ibeA* e *neuS* e albergadas por essas aves podem representar um perigo à saúde pública.

As cepas B2 também estiveram associadas à suscetibilidade às fluorquinolonas, amoxicilina, tetraciclina e sulfamethoxazole/trimetropim, enquanto as cepas resistentes a esses antibióticos estiveram associadas ao grupo filogenético B1 (Tabela 3). Vários trabalhos demonstram que cepas ExPEC do filogrupo B2 são mais suscetíveis à antibióticos, especialmente quinolonas (JOHNSON et al., 2003; SKURNIK et al., 2009).

Alguns autores já discutiram a relação entre baixa virulência associada à resistência a quinolonas e fluorquinolonas em cepas ExPEC isoladas de humanos. Vários mecanismos hipotéticos têm sido atribuídos a essa característica como a perda ou supressão de ilhas de patogenicidade (PAIs) e plasmídeos ser induzida pela exposição à quinolonas e fluorquinolonas, a incompatibilidade de plasmídeos conjugativos levando à perda de plasmídeos de resistência quando adquirem plasmídeos de virulência e a predisposição de cepas com menor potencial de virulência ou não-B2 em adquirir resistência (VILA et al., 2002; SOTO; ANTA; VILA, 2006; STARCIC ERJAVEC et al., 2007). No entanto, Johnson et al. (JOHNSON et al., 2003, 2005a) atribuíram o fenômeno de algumas cepas ExPEC humanas apresentarem menor virulência associado à resistência à quinolonas/fluorquinolonas

à importação dessas cepas de um reservatório animal, que devido a pressões seletivas de antibióticos utilizados como promotores de crescimento, seleciona cepas resistentes, mas com características de baixa virulência.

Assim como nos resultados de associação entre fluorquinolonas-suscetíveis a um potencial de virulência mais alto, cepas suscetíveis a tetraciclina foram positivamente associadas ao filogruppo B2, e aos genes *vat*, *irp2*, *cvi/cva*, *neuS* e *ibeA* (Tabela 3). Starčič Erjavec et al. demonstraram que cepas UPEC resistentes à tetraciclina exibem potencial de virulência reduzido quando comparadas a cepas suscetíveis do mesmo patotipo e que cepas suscetíveis a esse antibiótico são positivamente associadas ao grupo B2, corroborando com nossos achados em APEC (STARCIC ERJAVEC et al., 2007).

Em contrapartida, as cepas que apresentaram fenótipo de resistência à gentamicina no nosso estudo estiveram positivamente associadas ao grupo B2 e a vários fatores de virulência (*vat*, *irp2*, *cvi/cva*, *neuS*, *iucD*, *tsh*) e ao grupo com mais de cinco fatores de virulência no genótipo, apresentando em média 6,7 genes de virulência (Tabela 3). Altekruuse et al. compararam cepas de *E. coli* isoladas de perus com colibacilose a isolados fecais de perus saudáveis e detectaram resistência a gentamicina em um nível muito superior nos isolados de doença (ALTEKRUSE et al., 2002). Em um estudo com cepas de *E. coli* isoladas de fezes de suínos saudáveis, Lay et al. (2012) observaram o mesmo fenômeno de associação entre cepas resistentes à gentamicina e estreptomicina a posse de alguns fatores de virulência (LAY et al., 2012). Esses autores atribuíram essa característica à hipótese de coexistência de genes de virulência e resistência aos aminoglicosídeos no mesmo elemento genético, como plasmídeos ou transposons (LAY et al., 2012). Relacionando nossos achados aos resultados desses autores, sugerimos que o uso de antibióticos na produção de aves pode estar selecionando cepas virulentas que portam genes de resistência a aminoglicosídeos associados.

Muitos estudos têm reportado o aparecimento e seleção de resistência em bactérias isoladas de animais pelo uso de antibióticos. Esses estudos demonstram que após a introdução de um antibiótico na prática veterinária, o nível de resistência das bactérias patogênicas e da microbiota fecal aumenta, assim como na medicina humana (VAN DEN BOGAARD; STOBBERINGH, 2000). O uso de antibióticos é

uma prática comum na indústria avícola, e pode ter favorecido o surgimento, disseminação e persistência de resistência antimicrobiana, que é um grave problema de saúde, tanto para os animais, quanto os humanos (MELLATA, 2013).

Em nosso estudo, o índice de isolados multirresistente foi de 92% (207/225). Essa foi a exata proporção de multirresistência encontrada por Zhao et al. em um estudo com 95 cepas APEC isoladas nos Estados Unidos (ZHAO et al., 2005). Curiosamente, os maiores níveis de resistência descrito no estudo de Zhao et al. (2005) foram a sulfas e tetraciclina, assim como no nosso estudo (Figura 5). Comparando nossos dados de resistência antimicrobiana com um estudo realizado com cepas APEC na China, altos níveis de resistência a tetraciclina também foram encontrados, mas quando comparamos a resistência a fluorquinolonas, o estudo chinês obteve níveis de 90% de resistência a enrofloxacino, enquanto nosso estudo obteve índices de 19% a esse mesmo antibiótico (YANG et al., 2004).

Já um estudo realizado na Austrália, o nível de multirresistência e resistência fenotípica a sulfa, tetraciclina, estreptomicina e florfenicol foi bem mais baixo se comparado aos nossos resultados (OBENG et al., 2012). Isso pode ser explicado pelo fato da legislação australiana ser mais rígida em relação ao uso de antimicrobianos em avicultura.

Em todo o mundo há uma crescente preocupação com o aumento da prevalência da resistência aos antibióticos (VAN DEN BOGAARD; STOBBERINGH, 2000). É inevitável que o uso de antibióticos como promotores de crescimento, ou como terapêuticos, leve ao surgimento e disseminação de bactérias resistentes e genes de resistência.

2.7 CONCLUSÃO

Os dados desse estudo revelaram uma alta prevalência de cepas APEC pertencentes ao grupo filogenético B2 e possuindo múltiplos genes de virulência, como a *ibeA* e *neuS*. A semelhança dessas cepas com genótipos de ExPEC isoladas de humanos servem como alerta para a possibilidade das aves de

produção servirem como reservatórios de bactérias patogênicas com potencial zoonótico e representam um perigo para a saúde pública. Outro fato importante é o elevado nível de resistência a múltiplas drogas, bem como a associação de genótipos potencialmente virulentos com o fenótipo de resistência à gentamicina. É necessário o uso racional de antimicrobianos na produção de perus, como a implementação de estratégias de monitorização e vigilância destas cepas que são potencialmente patogênicos para os seres humanos.

**3. CLONALIDADE E INTEGRONS DE CLASSE 1 EM CEPAS DE APEC
(*Escherichia coli* PATOGÊNICA PARA AVES) PERTENCENTES AO GRUPO
FILOGENÉTICO B2**

3.1 INTRODUÇÃO

Extraintestinal *Escherichia coli* (ExPEC) é uma classe heterogênea de patógenos envolvidos em inúmeros processos mórbidos em humanos e animais; e é subdividida em *E. coli* uropatogênica (UPEC), *E. coli* causadora de meningite neonatal (NMEC) e *E. coli* patogênica para aves (APEC) (SMITH; FRATAMICO; GUNTHER, 2007). As APEC representam grande importância na indústria de produção de aves (BARNES; VAILLANCOURT; GROSS, 2003), especialmente frangos e perus, por ocasionarem perdas econômicas que se estendem dos incubatórios ao abate, estando presente em todas as fases da cadeia de produção de aves.

Recentemente um grande número de trabalhos compararam isolados APEC com ExPEC humanas, sob o ponto de vista genético, e sugeriram que alguns clones que circulam entre as aves têm potencial zoonótico (EWERS et al., 2007; VINCENT et al., 2010; JAKOBSEN et al., 2012; KNÖBL et al., 2012). Trabalhos que demonstram a sobreposição de sorogrupos, fatores de virulência e grupos filogenéticos entre as APEC e NMEC/UPEC reforçam essa hipótese (EWERS et al., 2007; JOHNSON et al., 2008a). Dados de pesquisas experimentais *in vivo* demonstraram que ExPEC humanas quando inoculadas em aves causam colibacilose, assim como cepas aviárias causam UTI e meningite em modelos mamíferos de doença humana (ZHAO et al., 2009; TIVENDALE et al., 2010; JAKOBSEN et al., 2012).

Diante disso, muitos dados apontam para as aves de produção como reservatório de ExPEC, sugerindo que o consumo de carne de aves represente um importante papel na cadeia epidemiológica das infecções por ExPEC em humanos (VINCENT et al., 2010; BERGERON et al., 2012; JAKOBSEN et al., 2012+).

Nordstrom et al. (2013) verificaram que infecções do trato urinário (UTI) podem ser consideradas doenças veiculadas por alimentos de origem animal, uma vez que bactérias presentes nesses alimentos são capazes de colonizar o intestino humano. Em situações específicas essas bactérias podem provocar infecções em sítios distantes, incluindo vesícula urinária e rins (NORDSTROM; LIU; PRICE, 2013).

Esses autores propõem a denominação dessa situação de *Foodborne urinary tract infection* (FUTI).

Cepas UPEC e NMEC isoladas de humanos pertencem principalmente ao grupo filogenético B2 e ocasionalmente ao grupo D (CLERMONT; BONACORSI; BINGEN, 2000; SMITH; FRATAMICO; GUNTHER, 2007), sendo que o grupo B2 é mais virulento na maioria dos casos de infecções por ExPEC (MELLATA, 2013). Cepas de filogenia B2 representam uma linhagem divergente, altamente virulenta e com grande número de determinantes de virulência associados (PICARD et al., 1999).

Em contrapartida, isolados B2 de humanos tendem a apresentar um perfil de resistência de maior susceptibilidade aos antimicrobianos, especialmente às fluorquinolonas (JOHNSON et al., 2003; SKURNIK et al., 2009). Seguindo essa mesma tendência, a prevalência de integrons de classe 1 é relativamente menor em isolados B2, quando comparados com outros grupos filogenéticos (SKURNIK et al., 2005, 2009). Alguns autores relatam uma maior frequência de integrons em isolados comensais de humanos (SKURNIK et al., 2005, 2009), no entanto, trabalhos que relacionam grupos filogenéticos e elementos genéticos de resistência aos antimicrobianos em animais são escassos.

Cepas B2 isoladas de animais são consideradas pela literatura como potencialmente zoonóticas. No entanto, diversos estudos de várias partes do mundo, e com grande número de isolados, classificam a maioria das cepas APEC e cepas isoladas de carne de aves nos grupos A ou D, e as informações sobre cepas APEC B2 geralmente são generalistas (RODRIGUEZ-SIEK et al., 2005b; EWERS et al., 2007; JOHNSON et al., 2008a, 2009c; KOBAYASHI et al., 2011).

Aliado ao problema da potencial transmissão aos humanos, cepas isoladas de aves de produção apresentam altos níveis de resistência antimicrobiana (MANGES; JOHNSON, 2012). Muita atenção tem sido dada a produção de alimentos de origem animal devido ao uso de antibióticos em doses subterapêuticas como promotores de crescimento, que exercem pressão seletiva de bactérias resistentes, favorecendo a seleção de bactérias resistentes aos humanos (FLOREA; NIGHTINGALE, 2004). Além disso, carne de aves exibe altos níveis de contaminação por *E. coli* multirresistentes (MDR) em comparação com carnes de outros animais (MANGES; JOHNSON, 2012; MELLATA, 2013).

3.2 REVISÃO DE LITERATURA

3.2.1 Grupos filogenéticos

Em 1990, Herzer et al. conduziram um estudo sobre a distribuição, do então recém-descoberto msDNA (*multicopy single stranded-DNA*), em *Escherichia coli*. Até aquele momento, pouco se sabia sobre o msDNA, produzido por transcriptase reversa (RT) bacteriana, que consiste em tipo singular de DNA satélite, estrutura de fita simples e repetição em *tandem*. Para determinar a distribuição do msDNA em *Escherichia coli*, o grupo selecionou as 72 cepas da coleção de referência de *E. coli* (EcoR), a cepa de referência K12, 12 isolados clínicos de doença extra-intestinal (ExPEC) e outras 25 amostras isoladas de diversas fontes humanas e animais. A coleção EcoR de referência de *Escherichia coli* é a seleção de 72 cepas entre 2600 isolados de *E. coli* com base na distribuição geográfica, fontes de diferentes hospedeiros (humanas e animais), diversidade alélica examinada por perfil eletroforético em três diferentes subgrupos com base em testes realizados utilizando onze diferentes enzimas (OCHMAN; SELANDER, 1984). Após a tipificação por Ochman e Selander em 1984, a coleção então foi depositada na *American Type Culture Collection* (ATCC).

Tanto as cepas da coleção EcoR, quanto as outras amostras, foram submetidas à técnica de MLEE (*Multilocus enzyme electrophoresis*) utilizando 38 diferentes enzimas e as relações filogenéticas avaliadas pelo método de neighbor-joining (NJ). Apesar dos pesquisadores estarem focados na distribuição filogenética das cepas produtoras de msDNA, os resultados demonstraram que todas as amostras da coleção EcoR podiam ser agrupadas em 4 principais clados: A, B1, B2 e D. Um dado interessante foi o agrupamento de todas as amostras ExPEC no clado B2, grupo que também agrupou a maioria das cepas de origem humana e de primatas. Amostras não patogênicas, como a cepa de referência K12, foram agrupadas nos grupos A e B1.

O estudo de Herzer et al. (1990) foi um marco na pesquisa das relações filogenéticas entre cepas *E. coli*. Usando como referência esse estudo, vários outros trabalhos foram publicados utilizando a técnica de MLEE para discriminar amostras

nos quatro grupos filogenéticos distintos. A partir daí, a hipótese de que amostras patogênicas de ExPEC poderiam ser discriminadas de amostras apatogênicas e de que cepas B2 pertenciam a um grupo mais virulento foi sendo evidenciada pela publicação de outros trabalhos (BINGEN et al., 1998; BOYD; HARTL, 1998; DESJARDINS et al., 1995; PICARD et al., 1999).

Nessa altura já estava bem estabelecido que amostras patogênicas extra-intestinais pertenciam quase que exclusivamente aos grupos filogenéticos B2 e, e em menor proporção ao grupo D, enquanto que amostras comensais eram classificadas na grande maioria das vezes nos grupos A e B1. Outro dado constante nos estudos sobre filogenia em *E. coli* entre os anos 1990 e 2000, era o fato do grupo filogenético B2 apresentar virulência intrínseca, apesar da transferência horizontal de genes de virulência (BINGEN et al., 1998; BOYD; HARTL, 1998; PICARD et al., 1999). O estabelecimento de uma posição filogenética de clones virulentos dentro da diversidade da espécie *E. coli* encontrou suporte nessa hipótese (PICARD et al., 1999).

Certos grupos clonais de ExPEC, como O18:K1:H7 e O6:K2:H1, presentes nos três principais patotipos de ExPEC (APEC, UPEC e NMEC), são excessivamente representados por isolados clínicos quando comparados com isolados comensais (JOHNSON; RUSSO, 2005). Esses grupos clonais virulentos derivam primariamente do grupo B2, o que demonstra a predominância desse grupo filogenético entre os isolados clínicos de ExPEC (JOHNSON; RUSSO, 2005). Uma enorme gama de trabalhos demonstra que a maioria dos fatores de virulência extraintestinais (como *pap*, *sfa*, *hly* e *kps*) estão concentrados dentro de grupos clonais pertencentes ao filogruppo B2, e em menor frequência, ao grupo D (BINGEN et al., 1998; PICARD et al., 1999; JOHNSON; RUSSO, 2005; EWERS et al., 2007; ZHAO et al., 2009).

A ligação entre virulência e filogenia é explicada pela hipótese de que alguns determinantes de virulência necessitem de um fundo filogenético ideal para o surgimento de um clone virulento, com características específicas para expressão de patogenicidade e atividades metabólicas (PICARD et al., 1999).

Apesar do estabelecimento da ligação entre virulência, que se iniciou com o trabalho de Herzer et al. (1990), as técnicas para determinação filogenética de *Escherichia coli*, até então MLEE ou ribotipagem, eram onerosas, complexas e consumiam muito

tempo. Em 2000, Clermont, Bonacorsi e Bingen publicaram o desenvolvimento de um método simples e rápido que consiste na amplificação de dois genes, *chuA* e *yjaA*, e um fragmento de DNA anômalo, TSPE4.C2., para classificar as amostras em um dos 4 grupos principais: A, B1, B2 e D, conforme a presença ou ausência dos amplificadores (Figura 6). Os autores utilizaram 230 cepas de *E. coli* previamente identificadas por MLEE, incluindo as estirpes da coleção EcoR e demonstraram que o multiplex-PCR desenvolvido foi capaz de identificar 228 amostras com precisão (CLERMONT; BONACORSI; BINGEN, 2000). As duas cepas não classificadas corretamente pertenciam ao grupo B1 e foram classificadas no grupo A. Essa falha em classificar uma minoria de amostras pertencentes ao grupo B1 como filogrupo A pelo método de PCR desenvolvido por Clermont, Bonacorsi e Bingen (2000) foi assunto pesquisado e publicado pelos mesmos e por outros autores (CLERMONT et al., 2011, 2013; GORDON et al., 2008).

Figura 6 - Árvore de decisão dicotômica para determinar o grupo filogenético em amostras de *Escherichia coli* conforme resultados da amplificação de *chuA*, *yjaA* e TSPE4.C2 por PCR

Fonte: (CLERMONT; BONACORSI; BINGEN, 2000 adaptado por CUNHA, 2014)

Apesar dessa pequena adversidade, o PCR de Clermont é amplamente utilizado desde seu desenvolvimento, sendo que até abril de 2014, o trabalho de Clermont, Bonacorsi e Bingen (2000) havia sido citado por 927 trabalhos segundo o sistema

Web of Science™ (Thomson Reuters) e 1161 citações segundo métricas do sistema Scholar Google (acesso em 15/04/2014).

A utilização do multiplex PCR por pesquisadores do mundo todo tem sido uma ferramenta útil na tipagem molecular de cepas ExPEC. Mas uma controvérsia tem sido observada em relação à tipagem filogenética de APEC por esse método. Amostras APEC coletadas em todas os continentes geralmente são classificadas nos grupos A ou D, independente do grau de patogenicidade. Isso difere as APEC dos isolados humanos de ExPEC (UPEC e NMEC) ou isolados ExPEC de outros animais (mamíferos) (EWERS et al., 2007; MOULIN-SCHOULEUR et al., 2007; JOHNSON et al., 2009b; HARADA et al., 2012). Quando as amostras APEC pertencem a um grupo clonal virulento específico, a tendência é pertencer exclusivamente ao grupo B2. Por exemplo, o trabalho de Moulin-Schouleur et al (2006) utilizou cepas APEC do sorotipo O18:K1:H7 e todas APEC desse sorotipo foram classificadas no grupo filogenético B2 (MOULIN-SCHOULEUR et al., 2006). Outro exemplo são as APEC do famoso grupo clonal O25b:H4-ST 131, que independente da localização geográfica ou espécie do hospedeiro, pertencem ao filogruppo B2 (MANGES; JOHNSON, 2012). O quadro 7 apresenta dados publicados sobre a caracterização filogenética de APEC em vários países.

Quadro 7 - Frequência dos grupos filogenéticos em isolados de APEC ou RPEC contendo genes de virulência e tipados molecularmente como ExPEC em vários países

(continua)

País (Referência)	Fonte/Origem	Grupo Filogenético (%)
Canadá (BONNET et al., 2009)	Conteúdo cecal (triagem molecular APEC ¹)	A (2,3), B1 (13,6), B2 (9,1), D (75)
EUA (JOHNSON et al., 2008a)	APEC (Perus e frangos de produção)	A (36,9), B1 (15,9), B2 (17,3), D (29,9)
EUA (JOHNSON et al., 2005b)	RPEC (triagem molecular APEC)	Perus: B2 e D (48) Frangos: A e B1 (100)
EUA (JOHNSON et al., 2009a)	RPEC (triagem molecular APEC)	Perus: A (43), B1 (29), B2 (21), D (0) Frangos: A (29), B1 (30), B2 (9), D (31)
EUA (JOHNSON et al., 2009c)	APEC (Perus, poedeiras, frangos) RPEC (triagem molecular APEC)	A (38,8), B1 (14,4), B2 (17,8), D (29) A (29,5), B1 (24,5), B2 (12,5), D (31,5)
EUA (RODRIGUEZ-SIEK et al., 2005b)	APEC (Frangos)	A (38), B1 (15,5), B2 (18,5), D (28)
Alemanha (EWERS et al., 2007)	APEC (Aves de produção)	A (46,1), B1 (1,8), B2 (35,1), D (17)
Itália (GIUFRÈ et al., 2012)	APEC resistentes às quinolonas	A (39,4), B1 (36,4), B2 (3), D (21,2)
	APEC suscetíveis às quinolonas	A (32,4), B1 (26,5), B2 (10,3), D (30,9)
Itália (GRAZIANI et al., 2009)	APEC resistentes ao ciprofloxacino	A (27,4), B1 (19,4), B2 (9,7), D (43,5)
	APEC suscetíveis ao ciprofloxacino	A (25), B1 (8,3), B2 (27,1), D (39,6)
Dinamarca (PIRES-DOS-SANTOS et al., 2013)	APEC (salpingite e peritonite em poedeiras)	A (19,1), B1 (5,9), B2 (52,9), D (22,1)
China (WANG et al., 2010)	APEC	A (73), D (14)
China (XU et al., 2013)	RPEC (triagem molecular APEC)	A (63,75) B1 (22,5), B2 (0), D (13,75)
Brasil (BARBIERI et al., 2013)	APEC (isolados de celulite)	A (27,8) B1 (7,6), B2 (17,4), D (47,2)

Quadro 7 - Frequência dos grupos filogenéticos em isolados de APEC ou RPEC contendo genes de virulência e tipados molecularmente como ExPEC em vários países

(conclusão)

Brasil (KOBAYASHI et al., 2011)	APEC	A (27,6) B1 (30,8), B2 (26,0), D (15,6)
	RPEC (triagem molecular APEC)	A (35) B1 (15), B2 (21,2), D (28,75)
Brasil (MATURANA et al., 2011)	APEC (Septicemia)	A (45,8) B1 (8,3), B2 (0), D (45,8)
	APEC (Síndrome da cabeça inchada)	A (21,4) B1 (0), B2 (14,3), D (64,3)
	APEC (Onfalite)	A (72,7) B1 (9,1), B2 (0), D (18,2)

¹ Triagem molecular APEC: Nesses estudos as cepas não isoladas de doença foram consideradas APEC pelo perfil molecular de virulência

3.2.2 Potencial zoonótico de APEC

Recentemente o potencial zoonótico das ExPEC isoladas de aves tem sido assunto exaustivamente abordado nos trabalhos publicados sobre APEC. Em menos de dois anos, a publicação oficial do CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*), principal agência de saúde relacionada a doenças infecciosas dos Estados Unidos, liberou dois relatórios alertando sobre o potencial zoonótico de ExPEC e sua eventual transmissão através da carne de frango (VINCENT et al., 2010; BERGERON et al., 2012). O risco zoonótico de APEC foi inicialmente relacionado ao fato de algumas cepas aviárias apresentarem sobreposição de fatores de virulência, grupos filogenéticos, sorogrupos e relação clonal com UPEC e NMEC humanas (RODRIGUEZ-SIEK et al., 2005b; MOULIN-SCHOULEUR et al., 2006, 2007; EWERS et al., 2007; JOHNSON et al., 2008a; MANGES; JOHNSON, 2012).

Em 2007, Manges et al., relacionaram surtos de infecção do trato urinário (ITU) com consumo de carne de frango, sugerindo que esse o alimento pode ser uma importante via de transmissão de *Escherichia coli* para mulheres que desenvolvem ITU recorrente. Já em outro trabalho, autores denominaram essa condição clínica de FUTI (do inglês *Foodborne Urinary Tract Infection* – infecção urinária adquirida de fonte alimentar) e ainda alertam para o fato de que cepas isoladas dessas FUTI geralmente apresentarem fenótipo de multirresistência aos antimicrobianos (MDR), o que reforça ainda mais a origem aviária dessas cepas (NORDSTROM; LIU; PRICE, 2013).

Trabalhos que usam modelos experimentais mamíferos enfatizam a ideia de zoonose. Foi demonstrado que cepas aviárias podem causar infecção urinária, meningite neonatal e sepse em ratos, usados como modelos experimentais dessas doenças (ZHAO et al., 2009; TIVENDALE et al., 2010; JAKOBSEN et al., 2012). O relato de que APEC é capaz de invadir células epiteliais humanas (pneumócitos), e sobreviver por vários dias, também é descrito na literatura (CHANTELOUP et al., 2011). Pesquisas que demonstram a contraparte, ou seja, cepas humanas causando quadros clássicos de colibacilose, mostram que as ExPEC em geral compartilham muitas características, inclusive a mesma tendência de expressão de fatores de

virulência independente do hospedeiro ser mamífero ou ave (GERMON et al., 2005; MOULIN-SCHOULEUR et al., 2006, 2007; ZHAO et al., 2009).

Além de evidências epidemiológicas e dos testes em modelos animais, a biologia molecular tem contribuído para desvendar o papel das aves na cadeia epidemiológica das UPEC e NMEC (Figura 7). O sequenciamento completo do genoma da cepa APEC-O1:K1:H7 demonstrou grande similaridade com o genoma de UPEC humanas, como a clássica amostra protótipo de UPEC CFT073, sendo que apenas 4,5% do genoma da APEC 01 não é encontrado no genoma de outras três UPEC (CFT073, 563 e UTI89) (JOHNSON et al., 2007). Utilizando a comparação dos genomas, esse mesmo trabalho demonstrou que o genoma de algumas ExPEC têm mais similaridade com APEC-O1 do que outras ExPEC humanas quando comparadas (JOHNSON et al., 2007).

Figura 7 - Diagrama esquemático apresentando os principais patótipos de ExPEC e doenças em aves e humanos e a possibilidade das aves e seus produtos serem reservatórios de genes de virulência e resistência a antibióticos, assim como causar doenças zoonóticas.

Fonte: (MELLATA, 2013 adaptado por CUNHA, 2014)

A utilização da técnica de MLST (*Multilocus sequencing typing*) permitiu a comparação de grupos clonais de APEC e ExPEC humanas de todo o mundo. Grupos clonais como ST131, O45:K1:H7-B2-ST95, D-ST59, O25b:H4-B2 e outros citados já no primeiro capítulo deste trabalho apresentam representantes dentro das ExPEC humanas e APEC (MORA et al., 2009, 2010, 2013; PLATELL et al., 2011). Estes estudos mostram que alguns grupos clonais de ExPEC não exigem especificidade de hospedeiro, conclusões que destacam o papel das aves como reservatório de ExPEC patogênica para humanos (PLATELL et al., 2011; MORA et al., 2013)

O potencial zoonótico de ExPEC parece estar relacionado com a posse de grandes plasmídeos carreadores de genes de virulência (MELLATA, 2013). Existem evidências que permitem afirmar que plasmídeos de APEC podem servir como uma fonte de genes de virulência para outras ExPEC (JOHNSON et al., 2012b). Isolados APEC e UPEC têm em comum a posse de grandes plasmídeos conjugativos, que portam genes como *iucD*, *iss*, *iroN* e *sitABCD* (RODRIGUEZ-SIEK et al., 2005b). Já com NMEC, as APEC compartilham a posse de plasmídeos do tipo ColV (EWERS et al., 2007; JOHNSON et al., 2008a).

3.2.3 Integrans

A utilização de antimicrobianos na cadeia de produção animal influencia a evolução de genes de resistência e sua agregação em elementos móveis, como plasmídeos, transposons e integrans (JENSEN et al., 2008). O papel dos plasmídeos e bacteriófagos na transferência de resistência aos antibióticos é bem conhecido e documentado, mas a participação de integrans na disseminação dessa característica é descoberta razoavelmente recente e ultimamente tem sido alvo de muitos estudos (STALDER et al., 2012). O termo “integron”, ou elemento de integração, foi proposto por Stokes e Hall em 1989 e a atual definição foi introduzida em 1995 por Hall e Collis (STOKES; HALL, 1989; HALL; COLLIS, 1995). Integrans são elementos genéticos móveis presentes em plasmídeos ou, em menor proporção, no cromossomo bacteriano, e podem capturar, trocar e expressar genes contidos em

cassetes móveis (STOKES; HALL, 1989; HALL; COLLIS, 1995; HALL, 2012). Integrons são encontrados em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, no entanto, são mais frequentes em isolados clínicos de Enterobacteriaceae e Vibrionaceae (FLUIT; SCHMITZ, 1999). Um dado preocupante e uma questão em saúde pública é a associação frequente de integrons com outros elementos móveis, como plasmídeos e transposons, o que leva a uma disseminação ainda maior dos genes de resistência (STALDER et al., 2012).

Existem várias classes de integrons, mas apenas cinco tem um papel na expressão e disseminação de genes de resistência a antibióticos, e são denominados por algarismos arábicos de 1 a 5. Todas as cinco classes estão fisicamente ligadas a elementos móveis de DNA, tais como sequências de inserção (IS), transposons e plasmídeos conjugativos, todos os quais podem servir como veículos para transmissão de material genético intra e interespecíes (MAZEL, 2006). Integrons de classe 1 são amplamente distribuídos entre isolados clínicos e a maior parte dos cassetes de resistência a antibióticos conhecidos pertencem a esta classe (MAZEL, 2006; CAMBRAY; GUEROUT; MAZEL, 2010). Até o momento, mais de 80 diferentes genes cassetes em integrons classe 1 foram descritos, enquanto que em integrons de classe 2 são encontrados apenas seis tipos de cassetes (MAZEL, 2006).

Todos os integrons são compostos por uma plataforma estável, e conservada, de três elementos funcionais essenciais, também chamada de segmento conservado 5' ou 5'CS: (i) o gene *intI*, (ii) um local de recombinação específica denominado *attI* e (iii) um promotor (P_c ou P_{ant}) (Figura 8) (HALL; COLLIS, 1995; LÉVESQUE et al., 1995; MAZEL, 2006; HALL, 2012).

O principal componente dessa plataforma é o gene *intI*, que codifica a enzima integrase IntI, da classe das tirosina-recombinases (ROWE-MAGNUS; MAZEL, 2002; CAMBRAY; MAZEL, 2006; GUEROUT; MAZEL, 2010). Essa enzima cataliza, integra ou faz a excisão dos genes cassetes (HALL; COLLIS, 1995; HALL et al., 1999; CAMBRAY; GUEROUT; MAZEL, 2010). A integração do cassete gênico, após a mobilização pela integrase, ocorre essencialmente em um locus específico adjacente a *intI*, referido como local de recombinação primária, denominado *attI* (Figura 8) (MAZEL, 2006; HALL, 2012). A expressão dos genes integrados à plataforma é assegurada por um promotor (P_c), que está incorporado no gene *intI* ou no local *attI* e orientados para o ponto de inserção dos cassetes (Figura 8) (MAZEL,

2006; HALL, 2012). A sucessiva integração de genes cassetes no locus *attI* pode resultar em diferentes arranjos de genes cassetes (LÉVESQUE et al., 1995; FLUIT; SCHMITZ, 1999; CAMBRAY; GUEROUT; MAZEL, 2010; HALL, 2012). Apesar do segmento 5'CS (*intI-attI-Pc*) ser conservado, essa união matriz-cassete constitui uma região variável dos integrons (HALL et al., 1999; CAMBRAY; GUEROUT; MAZEL, 2010).

Genes cassetes são elementos funcionais mínimos destinados a serem mobilizados pela integrase dos integrons. Eles são imediatamente seguidos por um locus de recombinação denominado *attC* (anteriormente chamado de elemento base 59), que é especificamente reconhecido pelo *intI* (CAMBRAY; GUEROUT; MAZEL, 2010). A maioria dos loci *attC* dos cassetes são únicos, sendo o comprimento e a sequência altamente variáveis (entre 57 e 114 bp) (ROWE-MAGNUS; MAZEL, 2002).

Integrons pertencentes à classe 1 geralmente contêm uma região conservada denominada 3'CS. Essa região conservada contém um gene de resistência às sulfonamidas (*sul1*), o gene *qacEΔ1* que confere resistência a amônia quaternária e um ORF5, que codifica uma proteína de função desconhecida (LÉVESQUE et al., 1995; MAZEL, 2006; HALL, 2012). Integrons de classe I que apresentam o gene *sul1* também são chamados de “complexo integron do tipo I” (LÉVESQUE et al., 1995; QUIROGA et al., 2013). Esse tipo de integrons são os mais prevalentes em isolados clínicos de humanos e animais (HALL; COLLIS, 1998). Devido a isso, muitos autores os denominam de “integrons clínicos” (STALDER et al., 2012).

Figura 8 - (1) Representação da estrutura de um Integron de classe 1. (2) Mecanismo de recombinação de um gene cassette (GC).

A proteína *IntI1* catalisa a inserção (A) e excisão (B) do GC no integron, com integração GC ocorrendo em local de recombinação *attI*. No exemplo (A), o GC3 circularizado é integrado de forma linear no interior da plataforma através de um mecanismo específico de recombinação entre o local *attI* e o local *attC3* do GC3. A excisão do GC ocorre preferencialmente entre dois locais *attC*. No exemplo (B), o GC1 é retirado após a recombinação entre os dois locais *attC1* e *attC3*.

Fonte: (STALDER et al., 2012 adaptado por CUNHA, 2014)

Os genes cassetes encontrados em integrons, principalmente os de classe 1, codificam genes de resistência à quase todas as classes de antimicrobianos (FLUIT; SCHMITZ, 1999; STALDER et al., 2012). Os genes mais prevalentes em integrons de classe I são: *aad* e *aac* (aminoglicosídeos); *bla_{CARB2}*, *bla_{OXA}*, *bla_{P1}*, *bla_{IMP}*, *bla_{GES}* (β -lactâmicos); *drf* (trimetropim), *catB* (cloranfenicol), *ereA* (eritromicina), *arr* (rifamicina), *sul* (sulfas) e *qac* (amônia quaternária) (FLUIT; SCHMITZ, 1999; STALDER et al., 2012). Apesar de não ser usual, já existem relatos de genes de resistência às quinolonas (*qnr*) associados a complexos integrons de classe 1 (QUIROGA et al., 2013).

O número de genes cassetes alocados dentro de um integron pode variar de nenhum (integron vazio) até centenas de cassetes, como no caso de integrons encontrados em *Vibrio cholerae* e outras espécies do gênero *Vibrio* (HALL, 2012).

3.3 OBJETIVOS

Diante desse contexto, o objetivo foi pesquisar a presença de integrons de classe 1, as relações clonais e o fenótipo de produção de hemolisinas em cepas APEC pertencentes ao grupo filogenético B2 isoladas de perus com doença respiratória e caracterizadas na primeira parte desse trabalho em relação ao genótipo de virulência e resistência antimicrobiana.

3.4 MATERIAIS E MÉTODOS

3.4.1 Amostras bacterianas

Para essa etapa do trabalho foram selecionadas as 112 cepas APEC classificadas no grupo filogenético B2 na primeira parte deste trabalho.

3.4.2 Pesquisa de Integrans de classe 1 por CS-PCR

As 112 cepas B2 foram submetidas à técnica de CS-PCR (*Conserved Segment PCR*) para detecção e determinação do tamanho da região variável entre 5'CS e 3'CS. Os primers utilizados foram 5'CS (GGC ATC CAA GCA GCA AG) e 3'CS (AAG CAG ACT TGA CCT GA) conforme protocolo descrito por Lévesque et al. (1995). Os ciclos de amplificação consistiam de um ciclo de desnaturação inicial de 95°C por 10 minutos, seguido de 35 ciclos de 95°C por 60 segundos de desnaturação, ciclo de anelamento de 55°C por 90 segundos, 72°C de extensão por 60 segundos e um ciclo final de extensão de 72°C por 10 minutos. Os produtos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose 1% (60V por 3 horas) corados com SyBR Safe® DNA gel stain (Invitrogen, São Paulo, Brasil). Como marcador de peso molecular foi utilizado 100 bp DNA ladder (LGC, São Paulo, Brasil) e 1 Kb DNA ladder (Axigen, São Paulo, Brasil).

3.4.3 ERIC-PCR

Para avaliar a estrutura clonal dos isolados de APEC B2, os padrões genotípicos obtidos por ERIC-PCR utilizando um primer único ERIC2 (5' AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG 3') (VERSALOVIC; KOEUTH; LUPSKI, 1991) foram comparados mediante a construção de dendrograma utilizando o software

Bionumerics® (Applied Maths, Bélgica). A similaridade das amostras foi estimada através do coeficiente de Dice. Com a matriz de similaridade gerada, os grupos foram determinados pelo método de *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Average* (UPGMA), sendo representado pelo dendrograma. Os perfis que apresentaram coeficiente de similaridade igual ou superior a 90% foram considerados clonais.

3.4.4 Detecção de α e β -hemolisinas

As 112 amostras foram semeadas em ágar sangue de carneiro a 5%(Base BHI) suplementado com CaCl_2 (10mM) e incubadas a 37° C por 24 horas. A presença de halo de hemólise opaco e esverdeado ou claro e mais amplo indica a produção de alfa ou beta hemolisina, respectivamente, conforme descrito por Rodriguez-Siek et al. (2005a).

3.4.5 Análise estatística

Para a determinação do valor-*p* foi utilizado o teste exato de Fisher para comparações entre fatores de virulência e perfil MDR e o teste U de Mann–Whitney para comparações entre escores de virulência. O software utilizado foi BioStat® 5.3.5 (AnalystSoft).

3.5 RESULTADOS

Neste estudo 95 cepas (85%) apresentaram fenótipo de multirresistência (resistência a 3 ou mais classes de antibióticos), os maiores índices de resistência foram a sulfonamidas 92,8% (104/112), eritromicina 79,5% (89/112) e tetraciclina 75% (84/112). Nenhuma cepa foi sensível a todos antibióticos, as 112 cepas

apresentaram em média resistência a cinco antibióticos. Todos os 17 isolados que não apresentaram perfil de multirresistência foram resistentes a dois antibióticos. A pesquisa de integrons de classe 1 (*int1*) mostrou que 107 (95,5%) portavam o integron, sendo que 85% (91/107) era multirresistente (Tabela 5). Pela CS-PCR foi possível encontrar regiões variáveis (RV) dos integrons de 23 diferentes tamanhos (Tabela 4). As RV variaram entre 600 e 4000 pares de bases (pb). Nenhuma amostra apresentou integron vazio (igual ou menor que 200 pb). Os tamanhos das RV mais prevalentes foram de 1000 pb (18/112 – 16,82), 700 pb (17/112 – 15,88%) e 750 pb (17/112 – 13,08%) (Figura 9 e Tabela 11).

Figura 9 - Eletroforese em gel de agarose de diferentes amostras mostram amplificadas da região variável dos integrons de classe 1.

1, 4, 5, 6, 8, 9, 11, 14 e 16 = RV de 1000 pb; 2 e 3 = RV de 1100 pb; 7 = 3000 pb; 10 = 1600 pb; 12 e 15 = 1500 pb; 13, 17 e 18 = 700 pb. 19 = Padrão de peso molecular de 100 bp; 20 = Padrão de peso molecular de 1 kb

Tabela 4 - Distribuição das 107 cepas positivas para *intl1* em função do tamanho da região variável

Região variável (bp)	N	%
600	1	1,07
650	3	2,80
680	1	1,07
700	17	15,88
750	14	13,08
800	4	3,73
850	1	1,07
900	5	4,67
950	4	3,73
1000	18	16,82
1100	3	1,07
1200	1	1,07
1300	2	1,86
1400	2	1,86
1500	4	3,73
1600	5	4,67
1700	2	1,07
1800	7	6,54
2000	8	7,47
2100	2	1,86
2200	1	1,07
3000	1	1,07
4000	1	1,07

Tabela 5 - Distribuição das cepas positivas e negativas para integrons de classe 1 em função do fenótipo de multirresistência (MDR)

	<i>intl1</i> positivo (107)	<i>intl1</i> negativo (5)
MDR (95)	91 (85%)	4 (80%)
Não MDR (17)	16 (15%)	1 (20%)

Em relação ao genótipo de virulência, as cepas foram distribuídas em 62 distintos perfis de virulência, sendo o perfil de nove genes *vat*, *irp2*, *cvi/cva*, *neuS*, *iroN*, *iss*, *iucD*, *tsh*, *ibeA* o mais prevalente (Quadro 8). As 112 amostras apresentaram em média 6,5 fatores de virulência por cepa (Tabela 6). No teste de α e β -hemólise nenhuma das amostras apresentou o fenótipo hemolítico.

Tabela 6 - Prevalência dos determinantes de virulência e distribuição em relação ao perfil de multirresistência (MDR)

Fatores de virulência	Prevalência n (%)			MDR vs Não MDR valor-p
	Total 112 (100)	MDR ¹ 95 (85)	Não MDR 17 (15)	
<i>papC</i>	24 (21,4)	24 (25,2)	0 (0)	NS ²
<i>tsh</i>	80 (71,4)	66 (69,5)	14 (82,3)	NS
<i>irp2</i>	84 (75)	69 (72,6)	15 (88,2)	NS
<i>iroN</i>	109 (97,3)	92 (96,8)	17 (100)	NS
<i>iucD</i>	79 (70,5)	66 (69,4)	13 (76,4)	NS
<i>cvi/cva</i>	81 (72,3)	64 (67,3)	17 (100)	0.0030
<i>neuS</i>	40 (35,7)	36 (37,8)	4 (23,5)	NS
<i>ibeA</i>	50 (44,6)	41 (43,1)	9 (52,9)	NS
<i>iss</i>	105 (93,7)	88 (92,6)	17 (100)	NS
<i>vat</i>	52 (46,4)	42 (44,2)	10 (58,8)	NS
<i>astA</i>	24 (21,4)	23 (24,2)	1 (5,8)	NS
Média de virulência³	6,5	6,4	6,8	NS

Valor-p foi determinado utilizando o teste exato de Fisher para comparações entre fatores de virulência e perfil MDR e o teste U de Mann-Whitney para comparações entre escores de virulência.

¹ MDR = amostra multirresistente.

² NS = não significante estatisticamente. Apenas diferenças significativas estatisticamente ($P < 0.05$) estão exibidas na tabela.

³ A média de virulência foi calculado para cada isolado utilizando a soma e de todos os fatores de virulência e divisão pelo número de cepas.

Quadro 8 - Prevalência dos perfis de virulência em 112 amostras de APEC B2.

Perfis de virulência	<i>n</i>	%
≥ 4 genes combinados	99	88,3
≥ 6 genes combinados	79	70,5
≥ 8 genes combinados	43	38,3
<i>vat, irp2, cvi/cva, neuS, iroN, iss, iucD, tsh, ibeA</i>	15	13,3
<i>irp2, cvi/cva, neuS, iroN, iss, iucD, tsh, ibeA</i>	8	7,14
<i>vat, irp2, cvi/cva, iroN, iss, iucD, tsh</i>	5	4,46
<i>irp2, cvi/cva, iroN, iss, iucD, tsh</i>	4	3,57
<i>vat, irp2, cvi/cva, iroN, iss</i>	4	3,57
<i>astA, irp2, cvi/cva, iroN, iss, papC, iucD, tsh</i>	3	2,67
<i>vat, irp2, cvi/cva, iroN, iss, tsh</i>	3	2,67
<i>iroN, iss, tsh</i>	3	2,67
<i>cvi/cva, iroN, iss</i>	3	2,67
Outras 53 combinações	64	57,2

A caracterização das amostras através do ERIC-PCR gerou 83 diferentes perfis com similaridade inferior a 90% (Figura 10). O cluster denominado A1.1.1, que agrupou 61 amostras com similaridade entre 62% e 100%, reuniu a maioria das cepas com o perfil *vat, irp2, cvi/cva, neuS, iroN, iss, iucD, tsh, ibeA* (13/15) (Figura 11). Nas amostras agrupadas nesse cluster a prevalência do gene *ibeA* foi de 60%(36/61), sendo que nos outros clusters (A1.1.2, A1.2, A2 e B) a frequência de *ibeA* foi de 27% (14/61). Todas as cepas negativas para integron de classe 1 foram agrupadas no cluster A.1.1.1 (Figura 11).

Figura 10 - Dendrograma das cepas APEC B2 com os resultados do ERIC-PCR baseado no coeficiente de Dice e UPGMA

Figura 11 - Dendrograma das amostras APEC B2 com os resultados do ERIC-PCR, virulência, resistência e região variável dos integrons de classe 1 baseado no coeficiente de Dice e UPGMA.

3.5 DISCUSSÃO

No mundo todo, trabalhos sobre epidemiologia molecular das ExPEC aviárias classificam a maioria das cepas APEC nos grupos filogenéticos A e D, dado que as diferencia das ExPEC humanas, geralmente pertencentes ao grupo B2 (SMITH; FRATAMICO; GUNTHER, 2007; MELLATA, 2013). Um estudo que utilizou apenas APEC do sorotipo O18:K1:H7, que é fortemente associado a cepas NMEC e amostras septicêmicas, demonstrou que 100% dos isolados desse particular sorotipo pertenciam ao grupo filogenético B2 (MOULIN-SCHOULEUR et al., 2006). Neste mesmo trabalho, cepas NMEC do mesmo sorotipo tinham um perfil genotípico muito próximo dos isolados APEC e se mostraram letais quando inoculadas em aves.

O predomínio de cepas APEC B2 em aves com doença respiratória não é relatado na literatura e motivou a elaboração do presente estudo. Levando-se em conta o grande número de trabalhos que explora e relaciona o fato de as cepas B2 apresentarem um fenótipo de resistência mais discreto em relação aos outros filogrupos, os dados apresentados no nosso trabalho mostram que a maioria das cepas APEC se mostrou multirresistente e portadoras de integrons de classe 1. No entanto, alguns autores alertam para o fato de que quando os isolados B2 são provenientes de fontes que sofrem frequentes pressões seletivas, como no contexto da produção animal e infecções nosocomiais em humanos, os isolados B2 podem apresentar perfis de multirresistência similares aos outros grupos filogenéticos (JOHNSON et al., 2003; SKURNIK et al., 2009).

O fato de a multirresistência estar associada a cepas menos virulentas depende do contexto ecológico, por exemplo, *E. coli* resistentes são selecionadas dentro do nicho intestinal de animais que recebem antibióticos na forma de promotores de crescimento (JOHNSON et al., 2003). Diante de fortes pressões seletivas de antibióticos, o fenômeno de resistência múltipla é altamente prevalente e generalizado, independentemente do grupo filogenético (SKURNIK et al., 2009).

Johnson et al. (2005) pesquisaram a prevalência de *E. coli* em produtos vegetais e carnes bovina, suína, de frango e perus comercializados em mercados e

encontraram uma alta prevalência de contaminação na carne de perus quando comparadas aos outros alimentos. As cepas isoladas da carne de perus apresentaram altos índices de resistência a sulfas e tetraciclina, sendo a única fonte de origem animal que apresentou cepas nos grupos filogenéticos B2 e D e associadas a um maior número de genes de virulência relacionados à ExPEC (JOHNSON et al., 2005b).

Os agentes antimicrobianos têm sido amplamente utilizados em aves de produção para tratamento de infecções causadas por uma variedade de agentes patogênicos bacterianos. O uso indiscriminado de antibióticos na indústria avícola pode ter levado ao surgimento, disseminação e persistência de cepas ExPEC multirresistentes na carne das aves, fato de grande importância para a saúde pública (AARESTRUP, 2012; MELLATA, 2013). As preocupações com o desenvolvimento da resistência antimicrobiana e transferência de genes de resistência a antibióticos levou à proibição de antibióticos como promotores de crescimento para aves na Europa (MILLET; MAERTENS, 2011). No Brasil o panorama é diferente e alguns antibióticos continuam sendo utilizados na produção de aves como agentes promotores de crescimento.

O aumento da incidência da resistência aos antibióticos despertou o interesse nos mecanismos de resistência desenvolvidos por estas bactérias para superar os efeitos de agentes antimicrobianos. Uma parte substancial dos genes de resistência estão presentes em elementos genéticos móveis, os integrons (MAZEL, 2006). Assim, integrons desempenham um papel crucial na disseminação de genes de resistência a antibióticos.

Neste estudo, os integrons de classe 1 estiveram presentes em 95,5 % dos isolados APEC B2. Em um trabalho recente realizado com cepas APEC septicêmicas, a prevalência dos integrons de classe 1 foi de 46,6% (AHMED; SHIMAMOTO; SHIMAMOTO, 2013). Um estudo realizado com carne de perus nos EUA detectou integrons de classe 1 em 42,1% das cepas *E. coli* recuperadas desse produto (KHAITSA et al., 2008). Já um trabalho realizado na Europa encontrou integrons de classe 1 em 49,2% (32/65) em cepas de *E. coli* isoladas de aves de produção. Nesse mesmo trabalho, os integrons apresentavam a região variável entre 663 a 2674 pares de bases.

Outro estudo realizado na Coréia do sul comparou a prevalência de integrons de classe 1 em cepas de *E. coli* isoladas de animais de produção e humanos (KANG et al., 2005). Esses autores concluíram que nas amostras isoladas de aves a frequência desse elemento era maior, em torno de 44%, quando comparado a cepas isoladas de humanos saudáveis (13%), isolados de doença em humanos (33%) e de suínos (23%) (KANG et al., 2005). Levando em conta a utilização de amostras exclusivamente B2, grupo que tende a ter um fenótipo de resistência mais limitado e menos associado a integrons, os dados apresentados aqui são alarmantes, principalmente quando se considera que as cepas utilizadas no nosso trabalho têm vários genes de virulência, inclusive alguns fatores de virulência relacionados a ExPEC humanas, como *ibeA* e *neuS*.

Os genes cromossomais *ibeA* e *neuS* são associados a cepas NMEC e desempenham importante papel na patogenia da meningite neonatal (EWERS et al., 2007; JOHNSON et al., 2008a). A prevalência dos mesmos no nosso estudo foi 44,6% (*ibeA*) e 35,7% (*neuS*) (Tabela 6). Ambos genes estiveram fortemente associados a isolados com perfil de virulência composto por 6 genes ou mais (Quadro 8).

Em relação à outros fatores de virulência, os genes *iroN* e *iss*, relacionados a plasmídeos ColV (JOHNSON et al., 2006), foram os mais prevalentes, presentes em 97,3% e 93,7% cepas, respectivamente. Esses plasmídeos são associados com cepas APEC e alguns autores sugerem que eles exerçam importante papel na patogenia da colibacilose aviária (JOHNSON et al., 2006). Johnson et al. (2009) comparando cepas APEC, cepas de origem fecal de frangos (AFEC) e cepas isoladas de carne de frango (RPEC) concluíram que as cepas da carne de frango contaminada tinham perfil genético muito similar às cepas APEC e diferentes dos isolados fecais, estando esses dois genes, *iroN* e *iss*, relacionados a cepas APEC e RPEC. Nesse mesmo estudo, outros genes plasmidiais como *tsh*, também tiveram maior prevalência nos isolados APEC e RPEC quando comparados a isolados fecais (JOHNSON et al., 2009c).

Um trabalho que comparou o potencial de virulência de RPEC e APEC realizado no Brasil mostrou que esses dois genes, *iroN* e *iss*, eram mais prevalentes em APEC do que em RPEC. O mesmo estudo mostrou que quando comparados em relação ao grupo filogenético, as cepas APEC do grupo B2 apresentaram prevalência similar ao

nosso trabalho (KOBAYASHI et al., 2011). Cepas com filogenia B2 e portando plasmídeos ColV têm maior capacidade de provocar doença e sobreviver a diversos ambientes e frente a múltiplas pressões (JOHNSON et al., 2008a). Cepas APEC e NMEC partilham muitas semelhanças de fundo cromossomal e plasmidial, sendo que o plasmídeo ColV está mais relacionado a esses dois patotipos do que a UPEC (JOHNSON et al., 2008a). O único gene deste estudo que apresentou diferença estatística significativa ($p=0.003$) na comparação dos isolados em relação ao fenótipo de multirresistência foi o marcador do plasmídeo ColV (*cvi/cva*), que esteve associado positivamente às cepas não-MDR (Tabela 6). Apesar de existirem plasmídeos que codifiquem tanto genes que conferem multirresistência, quanto genes associados à virulência, essa não é uma característica de plasmídeos ColV, que tendem a estarem associados exclusivamente à genes de virulência (JOHNSON et al., 2010). Existe na literatura a descrição um plasmídeo isolado de APEC que porta tanto genes de virulência quanto genes de resistência. No entanto esse plasmídeo produz colicina B e M, e é classificado como ColBM (JOHNSON et al., 2010).

Nossos resultados de detecção de α e β -hemólise corroboram com os achados de Rodriguez-Siek et al (2005a), que também não encontraram atividade hemolítica em 451 isolados APEC. Diferentes de UPEC, isolados APEC não costumam apresentar fenótipo hemolítico, sendo essa característica um possível marcador de diferença entre esses dois patotipos (RODRIGUEZ-SIEK et al., 2005a, 2005b).

A análise da clonalidade por ERIC-PCR permitiu classificar as amostras em 4 clusters principais. Em um cluster que reuniu 61 amostras (54,5%), denominado A1.1.1, foram agrupadas a maioria das cepas positivas para *ibeA* e um amostras com o perfil de nove genes (*vat*, *irp2*, *cvi/cva*, *neuS*, *iroN*, *iss*, *iucD*, *tsh*, *ibeA*) que foi o mais prevalente. Esse cluster diverge dos outros consideravelmente, sugerindo uma origem comum. Esses dados sugerem uma possível correlação entre virulência e origem clonal.

Informações sobre a clonalidade das cepas B2 APEC são importantes para entender a dinâmica das infecções por *E. coli* em aves e qual o papel do filogruppo B2 na epidemiologia das infecções por APEC.

3.6 CONCLUSÃO

Os resultados mostram um elevado nível de multirresistência mediada por integrons de classe 1 associado à cepas multivirulentas. As complexas interações entre o ambiente e as características genéticas das cepas APEC podem levar à seleção e disseminação da preocupante coexistência de virulência e resistência.

Novos trabalhos na cadeia de produção de perus são necessários para investigar se o perfil de resistência e virulência detectado neste trabalho se deve a pressão seletiva exercida pelos antibióticos utilizados na produção destas aves.

A caracterização das amostras de APEC B2 permitiu uma melhor compreensão do papel do grupo filogenético B2 na epidemiologia das infecções por APEC em perus, contribuindo também para a análise dos riscos que esse patótipo representa para a saúde pública.

4. CONCLUSÃO GERAL

O estudo revelou uma alta prevalência de cepas APEC pertencentes ao grupo filogenético B2 e possuindo múltiplos genes de virulência, inclusive relacionados com cepas ExPEC humanas. A semelhança genotípica dessas cepas com amostras isoladas de humanos serve como alerta para a possibilidade das aves de produção servirem como reservatórios de bactérias multirresistentes com potencial zoonótico, representando um perigo para a saúde pública.

Levando em conta nossos resultados e o preocupante dado que ExPEC são a principal causa de infecções em aves e humanos, ratificamos a necessidade da uso racional de antimicrobianos na produção de aves, assim como a implementação de estratégias de monitorização e vigilância destas cepas. Uma vez que o aumento dos níveis de resistência múltipla aos antibióticos em todo o mundo pode estar associado ao uso indiscriminado desses medicamentos na produção animal.

REFERÊNCIAS

- AARESTRUP, F. M. Sustainable farming: Get pigs off antibiotics. **Nature**, v. 487, n. 7404, p. 465–466, 2012.
- ABPA. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL. **História da avicultura**. Disponível em: <http://www.ubabef.com.br/a_avicultura_brasileira/historia_da_avicultura_no_brasil>. Acesso em: 29.mar.2014.
- ADLER, C.; CORBALÁN N. S.; SEYEDSAYAMDOST, M. R.; POMARES, M. F.; DE CRISTÓBAL, R. E.; CLARDY, J.; KOLTER, R.; VINCENT, P. A. Catecholate siderophores protect bacteria from pyochelin toxicity. **PloS one**, v. 7, n. 10, p. e46754, 2012.
- AHMED, A. M.; SHIMAMOTO, T.; SHIMAMOTO, T. Molecular characterization of multidrug-resistant avian pathogenic *Escherichia coli* isolated from septicemic broilers. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 303, n. 8, p. 475–83, 2013.
- ALMEIDA, R. T.; PALERMO-NETO, J. Uso de antimicrobianos em avicultura e o desenvolvimento de resistência bacteriana. In: PALERMO-NETO, J.; SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. (Ed.). **Farmacologia aplicada a avicultura**: boas práticas no manejo de medicamentos. São Paulo: Roca, 2005. p. 161–173.
- ALTEKRUSE, A. S. F.; ELVINGER, F.; DEBROY, C.; PIERSON, F.W.; EIFERT, J.; SRIRANGANATHAN, N. Pathogenic and fecal *Escherichia coli* strains from turkeys in a commercial operation. **Avian Diseases**, v. 46, n. 3, p. 562–569, 2002.
- ANDREATTI FILHO, R. L. **Saúde aviária e doenças**. São Paulo: Editora Roca, 2006. p. 314
- ASAI, T.; MASANI, K.; SATO, C.; HIKI, M.; USUI, M.; BABA, K.; OZAWA, M. HARADA, K.; AOKI, H.; SAWADA, T. Phylogenetic groups and cephalosporin resistance genes of *Escherichia coli* from diseased food-producing animals in Japan. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 53, p. 1-5, 2011.
- BARBIERI, N. L.; DE OLIVEIRA, A. L.; TEJKOWSKI, T. M.; PAVANELO, D. B.; ROCHA, D. A.; MATTER, L. B.; CALLEGARI-JACQUES, S. M.; DE BRITO, B. G.; HORN, F. Genotypes and pathogenicity of cellulitis isolates reveal traits that modulate APEC virulence. **PloS one**, v. 8, n. 8, p. e72322, 2013.
- BARNES, H. J.; NOLAN, L. K.; VAILLANCOURT, J. P. Colibacillosis. In: SAIF, Y. (Ed.). **Diseases of poultry**. 12th. ed. Ames, Iowa: Blackwell Publishing, 2008. p. 691–737.
- BARNES, H. J.; VAILLANCOURT, J.; GROSS, W. B. Colibacillosis. In: SAIF, Y. (Ed.). **Diseases of poultry**. 11th. ed. [s.l.] Iowa State University Press, 2003. p. 631–652.

BERGERON, C. R.; PRUSSING, C.; BOERLIN, P.; DAIGNAULT, D.; DUTIL, L.; REID-SMITH, R. J.; ZHANEL, G. G.; MANGES, A. R. Chicken as reservoir for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in humans, Canada. **Emerging Infectious Diseases**, v. 18, n. 3, p. 415–421, 2012.

BIDET, P.; BONARCORSI, S.; BINGEN, E. Virulence factors and pathophysiology of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. **Archives de Pédiatrie**, v. 19, n. 3, p. S80–92, 2012.

BINGEN, E.; PICARD, B.; BRAHIMI, N.; MATHY, S.; DESJARDINS, P.; ELION, J.; DENAMUR, E. Phylogenetic analysis of *Escherichia coli* strains causing neonatal meningitis suggests horizontal gene transfer from a predominant pool of highly virulent B2 group strains. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 177, n. 3, p. 642–50, 1998.

BOERLIN, P.; WHITE, D. G. Antimicrobial resistance and its epidemiology. In: GIGUÈRE, S.; PRESCOTT, J. F.; BAGGOT, J. D.; WALKER, R.D.; DOWLING, P. M. (Eds.). **Antimicrobial therapy in veterinary**. 4th. ed. Ames, Iowa: Blackwell Publishing, 2006. p. 626.

BONNET, C.; DIARRASSOUBA, F.; BROUSSEAU, R.; MASSON, L.; TOPP, E.; DIARRA, M. S. Pathotype and antibiotic resistance gene distributions of *Escherichia coli* isolates from broiler chickens raised on antimicrobial-supplemented diets. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 22, p. 6955–6962, 2009.

BOOM, R.; SOL, C. J.; SALIMANS, M. M.; JANSEN, C. L.; WERTHEIM-VAN DILLEN, P. M.; VAN DER NOORDAA, J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 3, p. 495–503, 1990.

BOYD, E. F.; HARTL, D. L. chromosomal regions specific to pathogenic isolates of *Escherichia coli* have a phylogenetically clustered distribution. **Journal of Bacteriology**, v. 180, n. 5, p. 1159–1165, 1998.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. 2013. Disponível em: <http://sigsif.agricultura.gov.br/sigsif_cons>. Acesso em: 20.mar.2014.

CAMBRAY, G.; GUEROUT, A.-M.; MAZEL, D. Integrins. **Annual Review of Genetics**, v. 44, p. 141–66, 2010.

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

CHANTELOUP, N. K.; PORCHERON, G.; DELALEU, B.; GERMON, P.; SCHOULER, C.; MOULIN-SCHOULEUR, M.; GILOT, P. The extra-intestinal avian pathogenic *Escherichia coli* strain BEN2908 invades avian and human epithelial cells and survives intracellularly. **Veterinary Microbiology**, v. 147, n. 3-4, p. 435–439, 2011.

CHOUIKHA, I.; BREE, A.; MOULIN-SCHOULEUR, M.; GILOT, P.; GERMON, P. Differential expression of iutA and ibeA in the early stages of infection by extra-intestinal pathogenic *E. coli*. **Microbes and Infection**, v. 10, n. 4, p. 432–438. 2008.

CLERMONT, O.; OLIER, M.; HOEDE, C.; DIANCOURT, L.; BRISSE, S.; KEROUDEAN, M.; GLODT, J.; PICARD, B.; OSWALD, E.; DENAMUR, E. Animal and human pathogenic *Escherichia coli* strains share common genetic backgrounds. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 11, n. 3, p. 654–62. 2011.

CLERMONT, O.; CHRISTENSON, J. K.; DENAMUR, E.; GORDON, D. M. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. **Environmental Microbiology Reports**, v. 5, n. 1, p. 58–65, 2013.

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.

CLSI. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **M31-A3**: performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. 3rd ed., Wayne, PA, USA: Clinical And Laboratory Standards Institute, 2008.

COQUE, T. M.; NOVAIS, A.; CARATTOLI, A.; POIREL, L.; PITOUT, J.; PEIXE, L.; BAQUERO, F.; CANTÓN, R.; NORDMANN, P.. Dissemination of clonally related *Escherichia coli* strains expressing extended-spectrum β -lactamase *Escherichia coli* strains expressing CTX-M-15. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 2, p. 195–200, 2008.

CORTES, M. A. M.; GIBON, J.; CHANTELOUP, N. K.; MOULIN-SCHOULEUR, M.; GILOT, P.; GERMON, P. Inactivation of ibeA and ibeT results in decreased expression of type 1 fimbriae in extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strain BEN2908. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 9, p. 4129–4136. 2008.

COSTA, F. da. **Caracterização do processo de rigor mortis e da maciez dos músculos Gastrocnemius e Pectoralis e efeito da radiação gama na vida comercial da carne de peru (Meleagris gallopavo)**. 2006. 137 p. Tese de Doutorado. Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro, 2006.

CROXEN, M. A.; FINLAY, B. B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 1, p. 26–38. 2010.

CUNHA, M. P. V.; MENÃO, M. C.; FERREIRA, A. J. P.; KNÖBL, T. A similaridade genética de *Escherichia coli* patogênica para as aves (APEC) com estirpes humana e a resistência antimicrobiana justificam a preocupação sanitária em relação aos produtos de origem aviária? **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 11, n. 2, p. 24–33, 2013.

DE ROSA, M.; FICKEN, M. D.; BARNES, H. J. Acute airsacculitis in untreated and cyclophosphamide-pretreated broiler chickens inoculated with *Escherichia coli* or *Escherichia coli* cell-free culture filtrate. **Veterinary Pathology**, v. 29, n. 1, p. 68–78, 1992.

DESJARDINS, P.; PICARD, B.; KALTENBLICK, B.; ELION, J.; DENAMUR, E. Sex in *Escherichia coli* does not disrupt the clonal structure of the population : evidence from random amplified polymorphic DNA and restriction-fragment-length polymorphism. **Journal of Molecular Evolution**, v. 41, p. 440–448, 1995.

DHANJI, H.; MURPHY, N. M.; DOUMITH, M.; DURMUS, S.; LEE, S. S.; HOPE, R.; WOODFORD, N.; LIVERMORE, D.M. Cephalosporin resistance mechanisms in *Escherichia coli* isolated from raw chicken imported into the UK. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, n. 12, p. 2534–2537, 2010.

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

DOETKOTT, D.M.; NOLAN, L.K.; GIDDINGS, C.W.; BERRYHILL, D.L. Large plasmids of avian *Escherichia coli* isolates. **Avian Diseases**, v. 40, n. 4, p. 927–930. 1996.

DOZOIS, C. M.; DHO-MOULIN, M.; BRÉE, A.; FAIRBROTHER, J. M.; DESAUTELS, C.; CURTISS, R. Relationship between the Tsh autotransporter and pathogenicity of avian *Escherichia coli* and localization and analysis of the Tsh genetic region. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 7, p. 4145–4154, 2000.

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

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

EWERS, C.; JANßEN, T.; KIESSLING, S.; PHILIPP, H. C.; WIELER, L.H. Rapid detection of virulence-associated genes in avian pathogenic *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. **Avian Diseases**, v. 49, n. 2, p. 269–273, 2005.

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

FERREIRA, A. J. P.; KNÖBL, T. Colibacillose. In: BERCHIERI JUNIOR, A.; SILVA, E.N.; DI FÁBIO, J.; SESTI, L.; ZUANAZE, M.A.F. (Ed.). **Doenças das aves**. 2. ed. Campinas: APINCO, 2009. p. 457–471.

FLOREA, N. F.; NIGHTINGALE, C. H. Review of the pharmacodynamics of antibiotic use in animal food production. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 49, n. 2, p. 105–8, 2004.

FLUIT, A. C.; SCHMITZ, F. J. Class 1 integrons, gene cassettes, mobility, and epidemiology. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 18, n. 11, p. 761–70, 1999.

FRICKE, W. F.; MCDERMOTT, P. F.; MAMMEL, M. K.; ZHAO, S.; JOHNSON, T. J.; RASKO, D.; FEDORKA-CRAY, P. J.; PEDROSO, A.; WHICHARD, J. M.; LECLERC, J. E.; WHITE, D. G.; CEBULA, T.; RAVEL, J. Antimicrobial resistance-conferring plasmids with similarity to virulence plasmids from avian pathogenic *Escherichia coli* strains in *Salmonella enterica* serovar Kentucky isolates from poultry. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 18, p. 5963–5971, 2009.

GAO, Q.; WANG, X.; XU, H.; XU, Y.; LING, J.; ZHANG, D.; GAO, S.; LIU, X. Roles of iron acquisition systems in virulence of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: salmochelin and aerobactin contribute more to virulence than heme in a chicken infection model. **BMC Microbiology**, v. 12, p. 143, 2012.

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, p. 1179–86, 2005.

GIUFRE, M.; GRAZIANI, C.; ACCOGLI, M.; LUZZI, I.; BUSANI, L.; CERQUETTI, M. *Escherichia coli* of human and avian origin: detection of clonal groups associated with fluoroquinolone and multidrug resistance in Italy. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 4, p. 860–7, 2012.

GORDON, D. M.; CLERMONT, O.; TOLLEY, H.; DENAMUR, E. Assigning *Escherichia coli* strains to phylogenetic groups: multi-locus sequence typing versus the PCR triplex method. **Environmental Microbiology**, v. 10, n. 10, p. 2484–96, 2008.

GRAZIANI, C.; LUZZI, I.; CORRO, M.; TOMEI, F.; PARISI, G.; GIUFRE, M.; MORABITO, S.; CAPRIOLI, A.; CERQUETTI, M. Phylogenetic background and virulence genotype of ciprofloxacin-susceptible and ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* strains of human and avian origin. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 199, n. 8, p. 1209–17, 2009.

GUARDABASSI, L.; KRUSE, H. Principles of prudent and rational use of antimicrobials in animals. In: GUARDABASSI, L.; JENSEN, L. B.; KRUSE, H. (Ed.). **Guide to antimicrobial use in animal**. Ames, Iowa: Blackwell Publishing, 2008. p. 1–12.

GUNTHER IV, N. W.; LOCKATELL, V.; JOHNSON, D. E.; MOBLEY, H. L. T. In vivo dynamics of type 1 fimbria regulation in uropathogenic *Escherichia coli* during experimental urinary tract infection. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 5, p. 2838–2846, 2001.

HALL, R. M.; COLLIS, C. M. Antibiotic resistance in gram-negative bacteria: the role of gene cassettes and integrons. **Drug Resistance Updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy**, v. 1, n. 2, p. 109–19, 1998.

HALL, R. M. Integrons and gene cassettes: hotspots of diversity in bacterial genomes. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1267, p. 71–78, 2012.

HALL, R. M.; COLLIS, C. M. Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination. **Molecular Microbiology**, v. 15, n. 4, p. 593–600, 1995.

HALL, R. M.; COLLIS, C. M.; KIM, M. J.; PARTRIDGE, S. R.; RECCHIA, G. D.; STOKES, H. W. Mobile gene cassettes and integrons in evolution. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 870, p. 68–80, 1999.

HARADA, K.; NIINA, A.; NAKAI, Y.; KATAOKA, Y.; TAKAHASHI, T. Prevalence of antimicrobial resistance in relation to virulence genes and phylogenetic origins among urogenital *Escherichia coli* isolates from dogs and cats in Japan. **American Journal of Veterinary Research**, v. 73, n. 3, p. 409–417, 2012.

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

HORNE, S. M.; PFAFF-MACDONOUGH, S. J.; GIDDINGS, C. W.; NOLAN, L. K. Cloning and sequencing of the *iss* gene from a virulent Avian *Escherichia coli*. **Avian Diseases**, v. 44, n. 1, p. 179–184, 2000.

HUANG, S. Y.; DAI, L.; XIA, L. N.; DU, X. D.; QI, Y. H.; LIU, H. B.; WU, C. M.; SHEN, J. Z. Increased prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in chicken *Escherichia coli* isolates from 2001 to 2007. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 6, n. 10, p. 1203–1209, 2009.

HUFF, G. R.; HUFF, W. E.; RATH, N. C.; BALOG, J. M. Turkey Osteomyelitis Complex. **Poultry Science**, v. 79, n. 7, p. 1050–1056, 2000.

JAKOBSEN, L.; GARNEAU, P.; BRUANT, G.; HAREL, J. Is *Escherichia coli* urinary tract infection a zoonosis ? Proof of direct link with production animals and meat. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 31, p. 1121–1129, 2012.

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

JENSEN, L.B.; ANGULO, F.J.; MØLBAK, K.; WEGENER, H.C. Human health risks associated with antimicrobial use in animals. In: GUARDABASSI, L.; JENSEN, L. B.; KRUSE, H. (Eds.). **Guide to antimicrobial use in animal**. Ames, Iowa: Blackwell Publishing, 2008. p. 13–26.

JEONG, Y. W.; KIM, T. E.; KIM, J. H.; KWON, H. J. Pathotyping avian pathogenic *Escherichia coli* strains in Korea. **Journal of Veterinary Science**, v. 13, n. 2, p. 145–152, 2012.

JOHNSON, J.R.; DELAVARI, P.; O'BRYAN, T.T.; SMITH, K.E.; TATINI, S. Contamination of retail foods, particularly turkey, from community markets (Minnesota, 1999-2000) with antimicrobial-resistant and extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 2, n. 1, p. 38–49, 2005b.

JOHNSON, J. R.; JOHNSTON, B.; KUSKOWSKI, M. A.; COLODNER, R.; RAZ, R. Spontaneous conversion to quinolone and fluoroquinolone resistance among wild-type *Escherichia coli* isolates in relation to phylogenetic background and virulence genotype. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 11, p. 4739–4744, 2005a.

JOHNSON, J. R.; KUSKOWSKI, M. A.; OWENS, K.; GAJEWSKI, A.; WINOKUR, P. L. Phylogenetic origin and virulence genotype in relation to resistance to fluoroquinolones and/or extended-spectrum cephalosporins and cephamycins among *Escherichia coli* isolates from animals and humans. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 188, n. 5, p. 759–68. 2003.

JOHNSON, J. R.; MCCABE, J. S.; WHITE, D. G.; JOHNSTON, B.; KUSKOWSKI, M. A.; MCDERMOTT, P. Molecular analysis of *Escherichia coli* from retail meats (2002-2004) from the United States National Antimicrobial Resistance Monitoring System. **Clinical Infectious Diseases**, v. 49, n. 2, p. 195–201, 2009a.

JOHNSON, J. R.; MILLER, S.; JOHNSTON, B.; CLABOTS, C.; DEBROY, C. Sharing of *Escherichia coli* sequence type ST131 and other multidrug-resistant and uropathogenic *E. coli* strains among dogs and cats within a household. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 11, p. 3721–3725, 2009b.

JOHNSON, J. R.; PORTER, S.B.; ZHANEL, G.; KUSKOWSKI, M. A.; DENAMUR, E. Virulence of *Escherichia coli* clinical isolates in a murine sepsis model in relation to sequence type ST131 status, fluoroquinolone resistance, and virulence genotype. **Infection and Immunity**, v. 80, n. 4, p. 1554–1562, 2012a.

JOHNSON, J. R.; RUSSO, T. A. Molecular epidemiology of extraintestinal pathogenic (uropathogenic) *Escherichia coli*. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 295, n. 6-7, p. 383–404, 2005.

JOHNSON, T. J.; LOGUE, C. M.; JOHNSON, J. R.; KUSKOWSKI, M. A.; SHERWOOD, J. S.; BARNES, H. J.; DEBROY, C.; WANNEMUEHLER, Y.; OBATA-YASUOKA, M.; SPANJAARD, L.; NOLAN, LISA K. Associations between multidrug resistance, plasmid content, and virulence potential among extraintestinal pathogenic and commensal *Escherichia coli* from humans and poultry. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 9, n. 1, p. 37–46, 2012b.

JOHNSON, T. J.; LOGUE, C. M.; WANNEMUEHLER, Y.; KARIYAWASAM, S.; DOETKOTT, C.; DEBROY, C.; WHITE, G.; NOLAN, LISA K. Examination of the source and extended virulence genotypes of *Escherichia coli* contaminating retail poultry meat. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 6, n. 6, p. 657–67, 2009c.

JOHNSON, T. J.; JOHNSON, S. J.; NOLAN, L. K. Complete DNA sequence of a ColBM plasmid from avian pathogenic *Escherichia coli* suggests that it evolved from closely related ColV virulence plasmids. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 16, p. 5975–5983, 2006.

JOHNSON, T. J.; JORDAN, D.; KARIYAWASAM, S.; STELL, A.L.; BELL, N. P.; WANNEMUEHLER, Y.; ALARCÓN, C. F.; LI, G.; TIVENDALE, K. A; NOLAN, L. K. Sequence analysis and characterization of a transferable hybrid plasmid encoding multidrug resistance and enabling zoonotic potential for extraintestinal *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 5, p. 1931–42, 2010.

JOHNSON, T. J.; 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. 3228–36, 2007.

JOHNSON, T. J.; NOLAN, L. K. Pathogenomics of the virulence plasmids of *Escherichia coli*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 73, n. 4, p. 750–774, 2009.

JOHNSON, T. J.; SIEK, K. E.; JOHNSON, S. J.; NOLAN, L. K. DNA Sequence of a ColV plasmid and prevalence of selected plasmid-encoded virulence genes among avian *Escherichia coli* strains. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 2, p. 745–758, 2006.

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

JOHNSON, T. J.; WANNEMUEHLER, Y. M.; NOLAN, L. K. Evolution of the *iss* gene in *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 8, p. 2360–2369, abr. 2008.

JOHNSON, T. J.; WANNEMUEHLER, Y.; JOHNSON, J. R.; STELL, A. L.; DOETKOTT, C.; JOHNSON, J. R.; KIM, K. S.; SPANJAARD, L.; NOLAN, L. K. Comparison of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains from human and avian sources reveals a mixed subset representing potential zoonotic pathogens. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 22, p. 7043–50, 2008a.

KAIBER, F. **Produzindo Peru**. In: Avicultura Industrial, 2005. Disponível em: <http://www.aviculturaindustrial.com.br/site/dinamica.asp?Id=12491&tipo_tabela=produtos&categoria=peru> Acesso em: 24.out.2013.

KANG, H. Y.; JEONG, Y. S. OH, J. Y.; TAE, S. H.; CHOI, C. H.; MOON, D. C.; LEE, W. K.; LEE, Y. C.; SEOL, S. Y.; CHO, D. T.; LEE, J. C. Characterization of antimicrobial resistance and class 1 integrons found in *Escherichia coli* isolates from humans and animals in Korea. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 55, n. 5, p. 639–44, 2005.

KHAITSA, M. L.; OLOYA, J.; DOETKOTT, D.; KEGODE, R. Antimicrobial resistance and association with class 1 integrons in *Escherichia coli* isolated from turkey meat products. **Journal of Food Protection**, v. 71, n. 8, p. 1679–84, 2008.

KLEIN, G.; FRANZ, C. M. A. P. The farm animal as potencial reservoir of antibiotic resistant bacteria in the food chain. In: HOLZAPFEL, W. H.; NAUGHTON, P. J. (Ed.). **Microbial ecology in growing animals**. Elsevier Ltd, 2005. p. 191–207.

KLEMM, P. **Fimbriae: Adhesion, Genetics, and Vaccines**. Boca Raton, FL: CRC Press, 1994. 283 p.

KLEMM, P.; HANCOCK, V.; SCHEMBRI, M. A. Fimbrial adhesins from extraintestinal *Escherichia coli*. **Environmental Microbiology Reports**, v. 2, n. 5, p. 628–40, 2010.

KNÖBL, T. **Caracterização epidemiológica, molecular e de virulência de *Escherichia coli* sfa + isoladas de aves**. 2005. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

KNÖBL, T.; MORENO, A. M.; PAIXÃO, R.; GOMES, T. A. T.; VIEIRA, M. A. M.; LEITE, D. S.; BLANCO, J. E.; FERREIRA, A. J. P. Prevalence of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) clone harboring sfa gene in Brazil. **The Scientific World Journal**, v. 2012, p. 1–7, 2012.

KOBAYASHI, R. K. T.; AQUINO, I.; FERREIRA, A. L. S.; VIDOTTO, M. C. EcoR phylogenetic analysis and virulence genotyping of avian pathogenic *Escherichia coli* strains and *Escherichia coli* isolates from commercial chicken carcasses in southern Brazil. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 8, n. 5, p. 631–4, 2011.

KOBAYASHI, R. K. T.; GAZIRI, L. C. J.; VIDOTTO, M. C. Functional activities of the Tsh protein from avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) strains. **Journal of Veterinary Science**, v. 11, n. 4, p. 315, 2010.

LAY, K. K.; KOOWATTANANUKUL, C.; CHANSONG, N.; CHUANCHUEN, R. Antimicrobial resistance, virulence, and phylogenetic characteristics of *Escherichia coli* isolates from clinically healthy swine. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 9, n. 11, p. 992–1001, 2012.

LEMAÎTRE, C.; BIDEAU, P.; BINGEN, E.; BONACORSI, S. Transcriptional analysis of the *Escherichia coli* ColV-Ia plasmid pS88 during growth in human serum and urine. **BMC Microbiology**, v. 12, p. 115, 2012.

LÉVESQUE, C.; PICHE, L.; LAROSE, C.; ROY, P.H. PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, n. 1, p. 185–191, 1995.

LITERAK, I.; REITSCHMIED, T.; BUJNAKOVA, D.; DOLEJSKA, M.; CIZEK, A.; BARDON, J.; POKLUDOVA, L.; ALEXA, P.; HALOVA, D.; JAMBOROVA, I. Broilers as a source of quinolone-resistant and extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in the Czech Republic. **Microbial Drug Resistance**, v. 19, n. 1, p. 57–63, 2013.

LYNNE, A. M.; FOLEY, S. L.; NOLAN, L. K. Immune response to recombinant *Escherichia coli* Iss protein in poultry. **Avian Diseases**, v. 50, p. 273–276, 2006.

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

MAGIORAKOS, A.; SRINIVASAN, A.; CAREY, R. B.; CARMELI, Y.; FALAGAS, M. E.; GISKE, C. G.; HARBARTH, S.; HINDLER, J.F. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria : an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 3, p. 268–281, 2011.

MANGES, A. R.; JOHNSON, J. R. Food-Borne origins of *Escherichia coli* causing extraintestinal infections. **Clinical Infectious Diseases**, v. 55, n. 5, p. 712–719, 2012.

MANGES, A. R.; SMITH, S. P.; LAU, B. J.; NUVAL, C. J.; EISENBERG, J. N. S.; DIETRICH, P. S.; RILEY, L. W. Retail meat consumption and the acquisition of antimicrobial resistant *Escherichia coli* causing urinary tract infections: a case-control study. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 4, n. 4, p. 419–31, 2007.

MARIETTO GONÇALVES, G. A.; ANDREATTI FILHO, R. L. Susceptibilidade antimicrobiana de amostras de *Escherichia coli* isoladas de frango industrial (*Gallus gallus domesticus* - Linnaeus, 1758) com colibacilose. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 77, n. 4, p. 715–718, 2010.

MATURANA, V. G.; DE PACE, F.; CARLOS, C.; MISTRETTA PIRES, M.; AMABILE DE CAMPOS, T.; NAKAZATO, G.; STHELING, E. G.; LOGUE, C. M.; NOLAN, L. K.; DIAS DA SILVEIRA, W. Subpathotypes of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) exist as defined by their syndromes and virulence traits. **The Open Microbiology Journal**, v. 5, n. Supl 1, p. 55–64, 2011.

MAURER, J. J.; BROWN, T. P.; STEFFENS, W. L.; THAYER, S. G. The occurrence of ambient temperature-regulated adhesins, curli, and the temperature-sensitive hemagglutinin tsh among avian *Escherichia coli*. **Avian Diseases**, v. 42, n. 1, p. 106–118, 1998.

MAZEL, D. Integrins: agents of bacterial evolution. **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, n. 8, p. 608–20, 2006.

MCEWEN, S. A.; FEDORKA-CRAY, P. J. Antimicrobial Use and Resistance in Animals. **Clinical Infectious Diseases**, v. 34, n. 3, p. 93–106, 2002.

MELLATA, M. Human and avian extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: infections, zoonotic risks, and antibiotic resistance trends. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 10, n. 11, p. 916–932, 2013.

MELLATA, M.; TOUCHMAN, J. W.; CURTISS, R. Full sequence and comparative analysis of the plasmid pAPEC-1 of avian pathogenic *E. coli* chi7122 (O78:K80:H9). **PloS one**, v. 4, n. 1, p. e4232, 2009.

MENDES, A. S. Produção industrial de perus: características e exigências. **Avisite**, 2005. Disponível em: <<http://www.avisite.com.br/cet/trabalhos.php?codigo=71>>. Acesso em: 20.jan.2014.

MILLET, S.; MAERTENS, L. The European ban on antibiotic growth promoters in animal feed: from challenges to opportunities. **Veterinary Journal**, v. 187, n. 2, p. 143–144, 2011.

MORA, A.; HERRERA, A.; MAMANI, R.; LÓPEZ, C.; ALONSO, M. P.; BLANCO, M.; BLANCO, J. E.; DABHI, G.; GARCÍA-GARROTE, F.; PITA, J. M.; COIRA, A.; BERNÁRDEZ, M. I.; BLANCO, J. Recent emergence of clonal group O25b:K1:H4-B2-ST131 *ibcA* strains among *Escherichia coli* poultry isolates, including CTX-M-9-producing strains, and comparison with clinical human isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 21, p. 6991–6997, 2010.

MORA, A.; LÓPEZ, C.; DABHI, G.; BLANCO, M.; BLANCO, J. E.; ALONSO, M. P.; HERRERA, A.; MAMANI, R.; BONACORSI, S.; MOULIN-SCHOULEUR, M.; BLANCO, J. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* O1:K1:H7/NM from human and avian origin: detection of clonal groups B2 ST95 and D ST59 with different host distribution. **BMC Microbiology**, v. 9, p. 132, 2009.

MORA, A.; LÓPEZ, C.; HERRERA, A.; VISO, S.; MAMANI, R.; DABHI, G.; ALONSO, M. P.; BLANCO, M.; BLANCO, J.E.; BLANCO, J. Emerging avian pathogenic *Escherichia coli* strains belonging to clonal groups O111:H4-D-ST2085 and O111:H4-D-ST117 with high virulence-gene content and zoonotic potential. **Veterinary Microbiology**, v. 156, n. 3-4, p. 347–352, 2012.

MORA, A.; VISO, S.; LÓPEZ, C.; ALONSO, M.P.; GARCÍA-GARROTE, F.; DABHI, G.; MAMANI, R.; HERRERA, A.; MARZOA, J.; BLANCO, M.; BLANCO, J.E.; MOULIN-SCHOULEUR, M.; SCHOULEUR, C.; BLANCO, J. Poultry as reservoir for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* O45:K1:H7-B2-ST95 in humans. **Veterinary Microbiology**, v. 167, n. 3-4, p. 506–512, 2013.

MORALES, C.; LEE, M. D.; HOFACRE, C.; MAURER, J. J. Detection of a novel virulence gene and a *Salmonella* virulence homologue among *Escherichia coli* isolated from broiler chickens. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 1, n. 3, p. 160–165, 2004.

MORENG, R. E.; AVENS, J. S. **Ciência e produção de aves**. São Paulo: Roca, 1990. p. 380

MOULIN-SCHOULEUR, M.; SCHOULER, C.; TAILLIEZ, P.; KAO, M. R.; BRÉE, A.; GERMON, P.; OSWALD, E.; MAINIL, J.; BLANCO, M.; BLANCO, J. Common virulence factors and genetic relationships between O18:K1:H7 *Escherichia coli* isolates of human and avian origin. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 10, p. 3484–3492, 2006.

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

NAKAZATO, G.; CAMPOS, T. A.; STEHLING, E.G.; BROCCHI, M. Virulence factors of avian pathogenic *Escherichia coli*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 7, p. 479–486, 2009.

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

NORDSTROM, L.; LIU, C. M.; PRICE, L. B. Foodborne urinary tract infections: a new paradigm for antimicrobial-resistant foodborne illness. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, n. 3, p. 1-6, 2013.

OBENG, A.S.; RICKARD, H.; NDI, O.; SEXTON, M.; BARTON, M. Antibiotic resistance, phylogenetic grouping and virulence potential of *Escherichia coli* isolated from the faeces of intensively farmed and free range poultry. **Veterinary Microbiology**, v. 154, n. 3-4, p. 305–315, 2012.

OCHMAN, H.; SELANDER, R. K. Standard reference strains of *Escherichia coli* from natural populations. **Journal of Bacteriology**, v. 157, n. 2, p. 690–693, 1984.

OELSCHLAEGER, T. A. Adhesins as invasins. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 291, n. 1, p. 7–14, 2001.

PARREIRA, V. R.; GYLES, C. L. A novel pathogenicity island integrated adjacent to the *thrW* tRNA gene of avian pathogenic *Escherichia coli* encodes a vacuolating autotransporter toxin. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 9, p. 5087–5096, 2003.

PEIGNE, C.; BIDE, P.; MAHJOUR-MESSAI, F.; PLAINVERT, C.; BARBE, V.; MÉDIGUE, C.; FRAPY, E.; NASSIF, X.; DENAMUR, E.; BINGEN, E.; BONACORSI, S. The plasmid of *Escherichia coli* strain S88 (O45:K1:H7) that causes neonatal meningitis is closely related to avian pathogenic *E. coli* plasmids and is associated with high-level bacteremia in a neonatal rat meningitis model. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 6, p. 2272–2284, 2009.

PICARD, B.; GARCIA, J.S.; GOURIOU, S.; DURIEZ, P.; BRAHIMI, N.; BINGEN, E.; ELION, J.; DENAMUR, E. The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 2, p. 546–53, 1999.

PIRES-DOS-SANTOS, T.; BISGAARD, M.; CHRISTENSEN, H. Genetic diversity and virulence profiles of *Escherichia coli* causing salpingitis and peritonitis in broiler breeders. **Veterinary Microbiology**, v. 162, n. 2-4, p. 873–80, 2013.

PITOUT, J. D. D. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: a combination of virulence with antibiotic resistance. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n. 1, p. 9, 2012.

PLATELL, J. L.; JOHNSON, J. R.; COBBOLD, R. N.; TROTT, D. J. Multidrug-resistant extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* of sequence type ST131 in animals and foods. **Veterinary Microbiology**, v. 153, n. 1-2, p. 99–108, 2011.

POIREL, L.; CATTOIR, V.; NORDMANN, P. Plasmid-mediated quinolone resistance; Interactions between human, animal, and environmental ecologies. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n. 2, p. 24, 2012.

PONCE-RIVAS, E.; MUÑOZ-MÁRQUEZ, M. E.; KHAN, A. A. Identification and molecular characterization of class 1 integrons in multiresistant *Escherichia coli* isolates from poultry litter. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 15, p. 5444–5447, 2012.

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

QUIROGA, M. P.; ARDUINO, S. M.; MERKIER, A. K.; QUIROGA, C.; PETRONI, A.; ROY, P. H.; CENTRÓN, D. Distribution and functional identification of complex class 1 integrons. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 19, p. 88–96, 2013.

RODRIGUEZ-SIEK, K.E.; GIDDINGS, C.W.; DOETKOTT, C.D.; JOHNSON, T.J.; FAKHR, M.K.; NOLAN, L.K. Comparison of *Escherichia coli* isolates implicated in human urinary tract infection and avian colibacillosis. **Microbiology**, v. 151, p. 2097–2110, 2005b.

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

ROWE-MAGNUS, D. A; MAZEL, D. The role of integrons in antibiotic resistance gene capture. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 292, n. 2, p. 115–25, 2002.

SCANES, C. G.; BRANT, G.; ENSMINGER, M. E. **Poultry science**. 4th. ed. Person-Prentice Hall, 2004. p. 372

SCHOULER, C.; SCHAEFFER, B.; BRÉE, A.; MORA, A.; DAHBI, G.; BIET, F.; OSWALD, E.; MAINIL, J.; BLANCO, J.; MOULIN-SCHOULEUR, M. Diagnostic strategy for identifying avian pathogenic *Escherichia coli* based on four patterns of virulence genes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 5, p. 1673–1678, 2012.

SCHUBERT, S.; RAKIN, A.; KARCH, H.; CARNIEL, E.; HEESEMANN, J. Prevalence of the “high-pathogenicity island” of *Yersinia* species among *Escherichia coli* strains that are pathogenic to humans. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 2, p. 480–5, 1998.

SIRLICI, M. P.; TRABULSI, L. R. Fatores de virulência: adesão, invasão, sideróforos, evasinas. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. (Ed.). **Microbiologia**. 4^a. ed. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 143–156.

SKURNIK, D.; LACHEEB, S.; BERNEDE, C.; MENAC'H, A.; ELBAZ, S.; MOHLER, J.; DENAMUR, E.; ANDREMONT, A.; RUIMY, R. Integrons and antibiotic resistance in phylogenetic group B2 *Escherichia coli*. **Microbial Drug Resistance**, v. 15, n. 3, p. 173–179, 2009.

SKURNIK, D.; LE MENAC'H, A.; ZURAKOWSKI, D.; MAZEL, D.; COURVALIN, P.; DENAMUR, E.; ANDREMONT, A.; RUIMY, R.. Integron-associated antibiotic resistance and phylogenetic grouping of *Escherichia coli* isolates from healthy subjects free of recent antibiotic exposure. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 7, p. 3062–3065, 2005.

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

SOTO, S. M.; ANTA, M. T. J. DE; VILA, J. Quinolones induce partial or total loss of pathogenicity islands in uropathogenic *Escherichia coli* by *sos*-dependent or -independent pathways, respectively. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 2, p. 649–653, 2006.

SOUFI, L.; ABBASSI, M.S.; SÁENZ, Y.; VINUÉ, L.; SOMALO, S.; ZARAZAGA, M.; ABBAS, A.; DBAYA, R.; KHANFIR, L.; BEN HASSEN, A.; HAMMAMI, S.; TORRES, C. Prevalence and diversity of integrons and associated resistance genes in *Escherichia coli* isolates from poultry meat in Tunisia. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 6, n. 9, p. 1067–1073, 2009.

SOUFI, L.; SÁENZ, Y.; VINUÉ, L.; ABBASSI, M.S.; HAMMAMI, S.; TORRES, C. Characterization of Pc promoter variants of class 1 integrons in *Escherichia coli* isolates from poultry meat. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 10, n. 12, p. 1075–7, 2013.

STALDER, T.; BARRAUD, O.; CASELLAS, M.; DAGOT, C.; PLOY, M.C. Integron involvement in environmental spread of antibiotic resistance. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n. 4, p. 119, 2012.

STARCIC ERJAVEC, M.; RIJAVEC, M.; KRIZAN-HERGOUTH, V.; FRUTH, A.; ZGUR-BERTOK, D. Chloramphenicol- and tetracycline-resistant uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) exhibit reduced virulence potential. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 30, n. 5, p. 436–42, 2007.

STOKES, H. W.; HALL, R. M. A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. **Molecular Microbiology**, v. 3, n. 12, p. 1669–1683, 1989.

STRAHILEVITZ, J.; JACOBY, G.A.; HOOPER, D.C.; ROBICSEK, A. Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, n. 4, p. 664–689, 2009.

SUN, H.; LI, S.; XIE, Z.; YANG, F.; SUN, Y.; ZHU, Y.; ZHAO, X.; JIANG, S. A novel multidrug resistance plasmid isolated from an *Escherichia coli* strain resistant to aminoglycosides. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 7, p. 1635–1638, 2012.

SUSSMAN, M. **Escherichia coli**: mechanisms of virulence. Cambridge: Cambridge University Press, 1997. p. 640

SZMOLKA, A.; NAGY, B. Multidrug resistant commensal *Escherichia coli* in animals and its impact for public health. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, n. 9, p. 258, 2013.

THORSTEINSDOTTIR, T.R.; HARALDSSON, G.; FRIDRIKSDOTTIR, V.; KRISTINSSON, K.G.; GUNNARSSON, E. Broiler chickens as source of human fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli*, Iceland. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 1, p. 133–135, 2010.

TIVENDALE, K. A.; LOGUE, C. M.; KARIYAWASAM, S.; JORDAN, D.; HUSSEIN, A.; LI, G.; WANNEMUEHLER, Y.; NOLAN, L. K. Avian-pathogenic *Escherichia coli* strains are similar to neonatal meningitis *E. coli* strains and are able to cause meningitis in the rat model of human disease. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 8, p. 3412–3419, 2010.

TIVENDALE, K. A.; ALLEN, J. L.; BROWNING, G. F. Plasmid-borne virulence-associated genes have a conserved organization in virulent strains of avian pathogenic *Escherichia coli*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 8, p. 2513–2519, 2009.

TIVENDALE, K. A.; ALLEN, J. L.; GINNS, C. A.; CRABB, B. S.; BROWNING, G. F. Association of *iss* and *iucA*, but not *tsh*, with plasmid-mediated virulence of avian pathogenic *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 11, p. 6554–6560, 2004.

TOMA, C.; LU, Y.; HIGA, N.; NAKASONE, N.; CHINEN, I.; BASCHKIER, A.; RIVAS, M.; IWANAGA, M. Multiplex PCR assay for identification of human diarrheagenic *Escherichia coli*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 6, p. 2669–2671, 2003.

TRABULSI, L. R.; ORDOÑEZ, J. G.; MARTINEZ, M. B. Enterobacteriaceae. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. (Ed.). **Microbiologia**. 4^a. ed. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 269–288.

TSAI, J. C.; YEN, M. R.; CASTILLO, R.; LEYTON, D.; HENDERSON, I. R.; SAIER, M. H.. The bacterial intimins and invasins: a large and novel family of secreted proteins. **PloS one**, v. 5, n. 12, p. e14403, 2010.

TSUKAMOTO, T. PCR method for detection of K1 antigen and serotypes of *Escherichia coli* isolated from extraintestinal infection. **Kansenshogaku Zasshi**, v. 71, n. 2, p. 125–129, 1997.

UBABEF. União Brasileira de Avicultura. **Relatório Anual UBABEF 2013**. São Paulo: UBABEF, 2013.

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, n. 4, p. 327–335, 2000.

VASILAKOPOULOU, A.; PSICHOGIOU, M.; TZOUVELEKIS, L.; TASSIOS, P. T.; KOSMIDIS, C.; PETRIKKOS, G.; ROMA, E. S.; CHARVALOS, E.; PASSIOTOU, M.; AVLAMI, A.; DAIKOS, G. L. Prevalence and characterization of class 1 integrons in *Escherichia coli* of poultry and human origin. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 6, n. 10, p. 1211–1218, 2009.

VELDMAN, K.; CAVACO, L.M.; MEVIUS, D.; BATTISTI, A.; FRANCO, A.; BOTTELDOORN, N.; BRUNEAU, M.; PERRIN-GUYOMARD, A.; CERNY, T.; DE FRUTOS ESCOBAR, C.; GUERRA, B.; SCHROETER, A.; GUTIERREZ, M.; HOPKINS, K.; MYLLYNIEMI, A. L.; SUNDE, M.; WASYL, D.; AARESTRUP, F. International collaborative study on the occurrence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* isolated from animals, humans, food and the environment in 13 European countries. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, n. 6, p. 1278–1286, 2011.

VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, J.R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 19, n. 24, p. 6823-6831, 1991.

VIDOTTO, M. C.; QUEIROZ, M. B.; DE LIMA, N. C. S.; GAZIRI, L. C. J. Prevalence of *ibeA* gene in avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). **Veterinary Microbiology**, v. 119, n. 1, p. 88–89, 2007.

VILA, J.; SIMON, K.; RUIZ, J.; HORCAJADA, J.; VELASCO, M.; BARRANCO, M.; MORENO, A.; MENSA, J. Are quinolone-resistant uropathogenic *Escherichia coli* less virulent? **The Journal of Infectious Diseases**, v. 186, n. 7, p. 1039–1042, 2002.

VINCENT, C.; BOERLIN, P.; DAIGNAULT, D.; DOZOIS, C.M.; DUTIL, L.; GALANAKIS, C.; REID-SMITH, R.J.; TELLIER, P.P.; TELLIS, P.A.; ZIEBELL, K.; MANGES, A. R. Food reservoir for *Escherichia coli* causing urinary tract infections. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 1, p. 88–95, 2010.

WALSH, C. **Antibiotics: actions, origins, resistance**. Washington, DC: ASM Press, 2003.

WANG, S. NIU, C.; SHI, Z.; XIA, Y.; YAQOOB, M.; DAI, J.; LU, C. Effects of *ibeA* deletion on virulence and biofilm formation of avian pathogenic *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 79, n. 1, p. 279–287, 2011.

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

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

WATERS, V. L.; CROSA, J. H. Colicin V virulence plasmids. **Microbiological Reviews**, v. 55, n. 3, p. 437–50, set. 1991.

XU, X.; CUI, S.; ZHANG, F.; LUO, Y.; YANG, B.; LI, F.; CHEN, Q.; ZHOU, G.; WANG, Y.; PANG, L.; LIN, L. Prevalence and Characterization of Cefotaxime and Ciprofloxacin Co-Resistant *Escherichia coli* Isolates in Retail Chicken Carcasses and Ground Pork, China. **Microbial Drug Resistance**, v. 20, n. 1, p73-81, 2013.

YAMAMOTO, S.; TERA, A.; YURI, K.; KURAZONO, H.; TAKEDA, Y.; YOSHIDA, O. Detection of urovirulence factors in *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 12, n. 2, p. 85–90, 1995.

YAMAMOTO, T.; ECHEVERRIA, P. Detection of the enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 gene sequences in enterotoxigenic *E. coli* strains pathogenic for humans. **Infection and Immunity**, v. 64, n. 4, p. 1441–5, 1996.

YANG, H.; CHEN, S.; WHITE, D.G.; ZHAO, S.; MCDERMOTT, P.; WALKER, R.; MENG, J. Characterization of Multiple-Antimicrobial-Resistant *Escherichia coli* Isolates from Diseased Chickens and Swine in China. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 8, p. 3483–3489, 2004.

YOGARATNAM, V. Analysis of the causes of high rates of carcase rejection at a poultry processing plant. **Veterinary Record**, v. 137, n. 9, p. 215–217, 26 ago. 1995.

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

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

ZHAO, S.; MAURER, J. J.; HUBERT, S.; DE VILLENA, J.; MCDERMOTT, P. F.; MENG, J.; AYERS, S.; ENGLISH, L.; WHITE, D. G. Antimicrobial susceptibility and molecular characterization of avian pathogenic *Escherichia coli* isolates. **Veterinary Microbiology**, v. 107, n. 3-4, p. 215–224, 2005.