

MÁRCIA CRISTINA MENÃO

**Indução de mutação por uma substância química em cepas
de *Escherichia coli* para a atenuação e o desenvolvimento
de vacina contra a colibacilose aviária**



São Paulo

2013

MÁRCIA CRISTINA MENÃO

Indução de mutação por uma substância química em cepas de *Escherichia coli* para a atenuação e o desenvolvimento de vacina contra a colibacilose aviária

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. Antonio José Piantino Ferreira

São Paulo

2013

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.2771
FMVZ

Menão, Márcia Cristina
Indução de mutação por uma substância química em cepas de *Escherichia coli* para a atenuação e o desenvolvimento de vacina contra a colibacilose aviária / Márcia Cristina Menão. -- 2013.
100 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2013.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. Antonio José Piantino Ferreira.

1. *Escherichia coli*. 2. Substância mutagênica. 3. Fatores de virulência. 4. Aves.
5. Mutação. I. Título.



Comissão de Ética no uso de Animais

Of. CEUAVET nº 174/FMVZ/2012.

rcg

São Paulo, 24 de setembro de 2012.

Ao sr.

Prof. Dr. Antonio José Piantino Ferreira

Assunto: **Projeto nº 2751/2012**, intitulado "Indução da mutação em cepas de *Escherichia coli* por antimicrobiano para controle da colibacilose aviária".

A Comissão de Ética no uso de Animais desta Faculdade, analisou os protocolos acima mencionados e solicita a Vossa Senhoria esclarecer:

- em relação à aquisição dos animais, não é informado se os mesmos serão comprados ou doados e a exata procedência do referido criatório comercial;
- o item 10.4 indica que não serão usados fármacos analgésicos justificando que o experimento induz dores nos animais. A presente afirmação necessita de melhor fundamento para justificar a manutenção da dor nos animais, mesmo que em breve período de tempo.

Atenciosamente,



Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: MENÃO, Márcia Cristina

Título: Indução de mutação por uma substância química em cepas de *Escherichia coli* para a atenuação e o desenvolvimento de vacina contra a colibacilose aviária

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária.

Data: ____/____/____

Banca examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

A meus pais por todo amor e apoio...
Aos meus amados filhos Lucas e Pedro, razões da minha vida...
A meu marido Cesar, pelo amor e incentivo...

À Deus pela vida e a oportunidade de um aprendizado diário.

Ao Prof. Dr. Antonio José Piantino Ferreira por todas as orientações, ensinamentos, compreensão e paciência.

Aos meus pais Milson e Maria Eugênia por todo amor, incansável dedicação, apoio, carinho e exemplo de luta durante toda minha vida.

Aos meus filhos Lucas e Pedro pela compreensão dos muitos momentos de ausência, companheirismo, amor incondicional e por tornarem meus dias mais felizes.

A meu marido César por todo apoio, companheirismo e esforço para compensação de minhas inúmeras ausências.

À Profa. Dra. Terezinha Knöbl pela amizade, incentivo, ajuda e por não me permitir desistir nunca.

À Profa. Dra. Claudete Astolfi Ferreira pela amizade, por todas as ideias, incentivo e inúmeras correções na tese.

À Profa. Dra. Andrea Micke Moreno pela amizade, sugestões e desenvolvimento do AFLP.

A minha sobrinha Júlia por todo carinho e momentos de muita alegria.

Aos meus irmãos Marcos e Mileni e minha cunhada Elaine pelo apoio e companheirismo.

Aos meus grandes amigos José Domingues e José Aparecido e ao Laboratório Biovet por toda colaboração no decorrer deste trabalho.

Aos funcionários do Laboratório de Ornitopatologia da FMVZ, Dennis e Maurício por toda ajuda, paciência e pelo convívio extremamente agradável nestes anos.

Aos amigos do Laboratório de Ornitopatologia da Universidade de São Paulo: Maria Eugênia, Luciana Alegretti, Luciana Scanavini, Luis, Silvana, Gabrielle, Natalia, Marta, Yamê e Pedro pela convivência agradável e troca de experiências.

Aos amigos Marcos Paulo, Mirela e Maria Gabriela pelo auxílio nas análises de PCR.

Aos amigos Ketrin e Vasco do Laboratório de Sanidade Suína pelo desenvolvimento de análises laboratoriais.

*Há duas formas para viver a sua vida:
Uma é acreditar que não existe milagre.
A outra é acreditar que todas as coisas são um milagre.*

Albert Einstein

RESUMO

MENÃO, M. C. **Indução de mutação por uma substância química em cepas de *Escherichia coli* para a atenuação e o desenvolvimento de vacina contra a colibacilose aviária.** [Mutations induced by a chemical in strains of *Escherichia coli* to the attenuation and vaccine development against avian colibacillosis]. 2013. 100 f. Tese (Doutorado em Ciências). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

A colibacilose aviária caracteriza-se como uma infecção extra-intestinal secundária a outros agentes. É responsável por grandes perdas econômicas na criação de aves comerciais, sendo sua prevenção fundamental para minimizar prejuízos. O objetivo deste estudo foi atenuar cepas virulentas de *Escherichia coli* aviárias, por indução de mutagênese química. Foram selecionadas nove (09) cepas pertencentes à coleção de cultura do Laboratório de Ornitopatologia da FMVZ-USP. Todas as cepas estudadas foram resistentes à eritromicina, lincomicina, oxaciclina, penicilina, tiamulina e tilmicosin e sensíveis ao ácido nalidíxico, cloranfenicol, ciprofloxacina, colistina, enrofloxacina, florfenicol e gentamicina. Ocorreram resistências nas amostras analisadas de 33,33%, 22,22%, 11,11%, 55,55%, 66,66%, 77,77%, 33,33%, 22,22%, 22,22% e 33,33%, respectivamente, a amoxicilina, a ampicilina, a doxaciclina, a espectomicina, a estreptomicina, a lincomicina-espectomicina, a neomicina, a rifampicina, a tetraciclina e ao trimetropin-sulfa. Induziu-se resistência a estreptomicina ou rifampicina ou ácido nalidíxico como marcadores. Não houve o desenvolvimento de resistências a outros antimicrobianos testados, após a exposição a substância mutagênica. Os resultados da amplificação dos genes por PCR, mostraram que todas as cepas foram negativas para *papC*, *cnf* e *astA* e todas foram positivas para *iuc* e *irp2*. Duas cepas foram positivas para os genes *vat*, cinco para *iss*, quatro para o gene *tsh*, uma para *cvi/cva*, duas para *sfal* e uma para *astA*. Após o uso da substância mutagênica duas cepas apresentaram reações negativas para os genes *tsh*, *cvi/cva* e *sfal* e uma cepa para o gene *astA*. No teste de AFLP verificaram-se diferenças em similaridade de bandas em oito (08) das nove (09) cepas, quando comparadas com a amostra tratada com a substância mutagênica, sendo que este índice variou de 40% a 96,3%. Embora no teste de patogenicidade em pintinhos de um dia de idade não tenha ocorrido diferenças significativas na mortalidade nos diferentes grupos estudados, houve alteração de patogenicidade

em cinco cepas expostas à substância mutagênica. Ocorreram reduções significativas em relação ao escore de lesões quando os grupos foram comparados ($p < 0,05$), indicando atenuação pela substância mutagênica.

Palavras-chave: *Escherichia coli*. Substância mutagênica. Fatores de virulência. Aves. Mutação.

ABSTRACT

MENÃO, M. C. **Mutations induced by a chemical in strains of *Escherichia coli* to the attenuation and vaccine development against avian colibacillosis** [Indução de mutação por uma substância química em cepas de *Escherichia coli* para a atenuação e o desenvolvimento de vacina contra a colibacilose aviária]. 2013. 100 f. Tese (Doutorado em Ciências). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

The avian colibacillosis is characterized as an extraintestinal infection which is secondary to other agents. It is responsible for considerable economic loss in the breeding of commercial birds, making its prevention essential to reducing damages. The aim of this study was to attenuate viral strains of avian *Escherichia coli*, using chemical mutagenesis induction. Nine (09) strains were selected from the culture collection of the Ornithopathology Laboratory of the School of Veterinary Medicine of the University of São Paulo. All analyzed strains were resistant to erythromycin, lincomycin, oxacillin, penicillin, tiamulin and tilmicosin and they were sensitive to nalidixic acid, chloramphenicol, ciprofloxacin, colistin, enrofloxacin, florfenicol and gentamicin. The analyzed samples presented the following resistance levels: 33.33%, 22.22%, 11.11%, 55.55%, 66.66%, 77.77%, 33.33%, 22.22%, 22.22% and 33.33% to, respectively, amoxicillin, ampicillin, doxycycline, spectinomycin, streptomycin, lincomycin-spectinomycin, neomycin, rifampicin, tetracycline and trimethoprim-sulfa. The resistance to streptomycin or rifampicin or nalidixic acid was induced as a marker. There was no development of resistance to other tested antimicrobials after the exposure to the mutagenic substance. The results of the PCR gene amplification showed that all strains were negative for *papC*, *cnf* and *astA* and they were all positive for *iuc* and *irp2*. Two strains were positive for the *vat* genes, five for *iss*, four for the *tsh* gene, one for *cvi/cva*, two for *sfal* and one for *astA*. After using the mutagenic substance, two strains presented negative reactions for the *tsh*, *cvi/cva* and *sfal* genes and one strain for the *astA* gene. In the AFLP test, differences were found for band similarity in eight (08) out of nine (09) strains, when compared with the samples treated with the mutagenic substance and this rate varied from 40% to 96.3%. Although the pathogenicity test in one-day-old chicks did not present significant differences in the mortality rate in the different analyzed groups, there was

a pathogenicity alteration in five strains exposed to the mutagenic substance. There were significant reductions regarding the lesion scores when the groups were compared ($p < 0,05$), indicating an attenuation due to the mutagenic substance.

Keywords: *Escherichia coli*. Mutagenic substance. Virulence factors. Birds. Mutation.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Mecanismos de resistência entre bactérias e suas bases genéticas.....	44
Quadro 2	Identificação das amostras de <i>E. coli</i> , sorotipo, origem e órgão de Isolamento.....	53
Quadro 3	Genes de virulência pesquisados pela reação de polimerase em cadeia.....	54
Quadro 4	Cepas de <i>E. coli</i> e antibióticos utilizados para a indução de resistência.....	56
Quadro 5	Grupos de aves e cepas de <i>E. coli</i> utilizadas para a inoculação das aves.....	59
Quadro 6	Cepas de <i>E. coli</i> e concentrações utilizadas para a inoculação, por via saco aéreo de pintinhos <i>SPF</i> de um dia de idade	60
Quadro 7	Escore de lesão para sacos aéreos, serosa hepática e pericárdio..	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Resultados dos testes de suscetibilidade a antimicrobianos (mg/L), no teste de difusão em disco (TDD) em mm e no teste de concentração inibitória mínima em µg/mL.....	65
Tabela 2	Resultados da amplificação dos genes de virulência por PCR nas cepas selvagens ou tratadas com substância mutagênica.....	69
Tabela 3	Mortalidade de pintinhos <i>SPF</i> inoculados com cepas de <i>E. coli</i> selvagens ou com mutações nos 10 dias de observação e a classificação de patogenicidade.....	75
Tabela 4	Número de pintinhos com lesão provocada por cepas selvagens de <i>E. coli</i> ou tratadas com a substância mutagênica após 10 dias da inoculação.....	76
Tabela 5	Escore de lesões em sacos aéreos de aves inoculadas com cepas de <i>E. coli</i> classificadas em um escore de 0 a 4.....	77
Tabela 6	Escore de lesões em coração de aves com cepas de <i>E. coli</i> classificadas em um escore de 0 a 4.....	78
Tabela 7	Diferenças entre cepas selvagens e com mutações em relação a fatores de virulência, similaridade em AFLP, patogenicidade, mortalidade e escore de lesões.....	78

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Eletroforese em gel de agarose 1,5%. Perfis obtidos através do AFLP em amostras de <i>E. coli</i> selvagens ou tratadas com substância mutagênica.....	70
Figura 2	Comparação de bandas entre as cepas EC 269 S e EC 269 M.....	71
Figura 3	Comparação de bandas entre as cepas EC 341 S e EC 341 M.....	71
Figura 4	Comparação de bandas entre as cepas EC 713 S e EC 713 M.....	71
Figura 5	Comparação de bandas entre as cepas EC 775 S e EC 775 M.....	72
Figura 6	Comparação de bandas entre as cepas EC 1299 S e EC 1299 M..	72
Figura 7	Comparação de bandas entre as cepas EC 1669 S e EC 1669 M..	72
Figura 8	Comparação de bandas entre as cepas EC 1708 S e EC 1708 M..	73
Figura 9	Comparação de bandas entre as cepas EC 1869 S e EC 1869 M..	73
Figura 10	Comparação de bandas entre as cepas EC 1889 S e EC 1889 M..	73
Figura 11	Mortalidade total de pintinhos <i>SPF</i> inoculados com as cepas de <i>E. coli</i> selvagens ou com mutações, nos 10 dias de observação.....	75
Figura 12	Número de aves com lesões após 10 dias de inoculação de cepas de <i>E. coli</i> selvagens ou com mutações.....	77

LISTA DE ABREVIATURAS

AFLP	Polimorfismo do comprimento de fragmentos amplificados
APEC	<i>Escherichia coli</i> patogênica aviária
astA	Gene codificador da toxina enteroagregativa termo estável
cvi/cva	Gene codificador do plasmídeo da colicina V
DAEC	<i>Escherichia coli</i> de aderência difusa
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Deoxirribonucleotídeo
EAGGEC	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
EC	<i>Escherichia coli</i>
EIEC	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasora
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica
hly	Gene codificador da α -hemolisina
irp2	Gene de proteína repressível por ferro (<i>Iron repressible protein yersinia-bactin synthesis</i>)
iss	Gene codificador da proteína para o aumento de sobrevivência no soro
iuc	Gene codificador da aerobactina
Kb	Quilobases
M	Molar
MIC	<i>Minimum inhibitory concentration</i>
mL	Mililitro (10^{-3})
mM	Milimolar (10^{-3} Molar)
neuS	Gene da cápsula K1
NMEC	<i>Escherichia coli</i> de meningite neonatal
papC	Gene codificador do pili associado com pielonefrite
pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia pela polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
SPF	Livre de patógenos específicos
STEC	<i>E. coli</i> produtora de toxina Shiga-like

<i>tsh</i>	Gene codificador da hemaglutinina sensível a temperatura
μg	Micrograma (10^{-6} grama)
UFC	Unidades formadoras de colônias
UPEC	<i>E. coli</i> uropatogênica
μL	Microlitro (10^{-6} litro)
μM	Micromolar (10^{-6} Molar)
<i>vat</i>	Gene da toxina vacuolizante

Nota: em função do uso consagrado na literatura técnica, algumas abreviaturas utilizadas seguem as iniciais da sua grafia no idioma inglês.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	29
2	REVISÃO DE LITERATURA	32
2.1	<i>ESCHERICHIA COLI</i>	33
2.2	COLIBACILOSE AVIÁRIA.....	34
2.3	FATORES DE VIRULÊNCIA.....	36
2.3.1	Adesinas	37
2.3.2	Hemaglutinina sensível à temperatura	38
2.3.3	Cápsula	39
2.3.4	Alfa-hemolisina	40
2.3.5	Resistência sérica	41
2.3.6	Sistema de aquisição de ferro	41
2.4	RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS.....	42
2.5	EPIDEMIOLOGIA.....	45
2.6	MUTAGÊNESE BACTERIANA.....	46
2.7	VACINAS.....	47
3	OBJETIVOS	49
3.1	GERAL.....	50
3.2	ESPECÍFICOS.....	50
4	MATERIAL E MÉTODOS	51
4.1	AMOSTRAS BACTERIANAS.....	52
4.2	EXTRAÇÃO DO DNA E REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR).....	53
4.2.1	Determinação dos fatores de virulência	53
4.3	TESTES DE SUSCETIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS.....	54
4.3.1	Concentração inibitória mínima	55
4.3.2	Técnica de difusão em disco	56
4.3.3	Indução de resistência a antimicrobianos	56
4.4	INDUÇÃO DE MUTAÇÃO POR SUBSTÂNCIA MUTAGÊNICA.....	57
4.5	POLIMORFISMO DO COMPRIMENTO DE FRAGMENTOS AMPLIFICADOS (AFLP).....	57

4.6	TESTE DE PATOGENICIDADE EM PINTINHOS DE UM DIA DE IDADE.....	58
4.6.1	Aves	58
4.6.2	Delineamento experimental	58
4.6.3	Teste de patogenicidade	59
5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	61
5.1	ANÁLISE ESTATÍSTICA DE AFLP.....	61
5.2	ANÁLISE ESTATÍSTICA DE PATOGENICIDADE E ESCORE DE LESÃO.....	61
6	RESULTADOS	62
6.1	SUSCETIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS.....	63
6.1.1	Concentração inibitória mínima (MIC)	63
6.1.2	Técnica de difusão em disco	64
6.2	INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS.....	64
6.3	ANÁLISE POR PCR.....	68
6.4	CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA POR AFLP.....	69
6.5	AVALIAÇÃO DE PATOGENICIDADE DE CEPAS SELVAGENS OU TRATADAS COM SUBSTÂNCIA MUTAGÊNICA EM PINTINHOS DE UM DIA DE IDADE.....	74
6.5.1	Mortalidade	74
6.5.2	Escore de lesões	76
7	DISCUSSÃO	79
8	CONCLUSÕES	87
	REFERÊNCIAS	89

1 INTRODUÇÃO

A indústria avícola representa um dos mais importantes segmentos do agronegócio. Alcançou nas últimas décadas um grande desenvolvimento em função da crescente demanda por produtos avícolas pela população mundial e contínua agregação de novas tecnologias. Atualmente possui como principais características a alta produção, a boa qualidade dos produtos e os baixos custos (GIMENO, 2009; SALLE; MORAES, 2009).

No Brasil mais de 12 mil toneladas de carne de frango foram produzidas no ano de 2011, sendo o país o terceiro produtor mundial e líder em exportações (APINCO, 2012). Segundo o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, até 2020, a expectativa é que a produção nacional de carne de frango seja responsável por 48,1% das exportações mundiais (BRASIL, 2012).

O melhoramento genético, a nutrição balanceada e a sanidade em uma produção intensiva foram os fatores responsáveis para que estes índices de produtividade fossem alcançados. Entretanto, novos desafios surgiram, dentre eles os problemas sanitários decorrentes de situações de estresse geradas por este moderno tipo de criação, além disso, a intensificação da produção também induz a perdas econômicas e a alteração da qualidade do alimento produzido (BARNES; VAILLANCOURT; GROSS, 2003; GIMENO, 2009).

Uma das doenças que se destacam neste cenário é a colibacilose aviária, causada pela *Escherichia coli* patogênica para aves (APEC) que é considerada secundária a outros agentes e tem manifestações clínicas extra-intestinais. Este agente pode ocasionar diversos quadros clínicos como colisepticemia, peritonite, pneumonia, pleuropneumonia, aerossaculite, pericardite, doença respiratória crônica complicada (DRCC), onfalite, osteomielite e ooforite gerando extensivas perdas econômicas, decorrentes do tratamento e baixa produtividade, podendo também ocasionar mortalidade (BARNES; VAILLANCOURT; GROSS, 2003; FERREIRA; KNÖBL, 2009).

Várias proteínas estão associadas à virulência de *Escherichia coli* (*E. coli*) em aves, incluindo adesinas, proteínas que induzem resistência sérica e produção de sideróforos, sendo que a combinação destas pode aumentar a patogenicidade e potencializar os prejuízos (ROCHA et al., 2008).

A utilização de aditivos na dieta, como promotores de crescimentos, é uma das estratégias para a alta produtividade. Esses são definidos como substâncias adicionadas às rações, sem valor nutricional, capazes de melhorar o desempenho animal ou as características físicas dos alimentos (SILVA, 2000; ARAUJO et al., 2007). O principal promotor de crescimento utilizado no Brasil e países cujas leis não imponham restrições, desde a década de 50 é o antibiótico (BARNES; VAILLANCOURT; GROSS, 2003; ANDREATTI FILHO, 2007). Este quando utilizado em doses sub-terapêuticas na ração, possui a função de impedir a invasão e multiplicação de micro-organismos patogênicos no intestino do animal, permitindo assim, que os nutrientes da dieta sejam aproveitados pelo hospedeiro (FLEMMING, 2005; ARAUJO et al., 2007).

No entanto, o uso contínuo destes produtos na alimentação animal pode contribuir para o desenvolvimento de populações de bactérias resistentes que podem se disseminar no ambiente e na microbiota intestinal podendo possibilitar que essa resistência seja transferida a micro-organismos patogênicos, dificultando tratamentos, constituindo um risco tanto para a saúde animal quanto humana (LODDI, 2003, SINGER; HOFACRE, 2006).

Conseqüentemente, a vacinação das aves torna-se uma ferramenta imprescindível contra a doença. Entretanto, as vacinas inativadas com adjuvantes oleosos podem induzir reações adversas. Dessa forma, o desenvolvimento de vacinas atenuadas é uma opção para a imunização, pois além de produzirem menores reações adversas podem ser utilizadas por via aerossol ou água de bebida (BARNES; VAILLANCOURT; GROSS, 2003).

A atenuação de cepas induzida por mutação pode representar uma alternativa para o desenvolvimento dessas vacinas atenuadas. Peighmbari et al. (2002) testaram duas vacinas elaboradas com cepas de *E. coli* mutante, dos sorogrupos O2 e O78, em frangos de corte e concluíram que as aves vacinadas com o sorogrupo O2 apresentaram diferença significativa na redução de lesões em sacos aéreos quando comparadas as aves do grupo controle.

Neste trabalho foi investigada se a exposição à substância mutagênica poderia induzir mutações em cepas de *E. coli* para um futuro desenvolvimento de vacinas atenuadas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *ESCHERICHIA COLI*

Escherichia coli é uma bactéria pertencente à família Enterobacteriaceae descrita pela primeira vez por Theodor Von Escherich em 1885, a partir de fezes de crianças saudáveis, sendo nomeada inicialmente de *Bacterium coli commune* (BETTELHEIM, 1994; TRABULSI; ALTHERTUM, 2005).

É um bastonete curto, com coloração Gram negativa, não formador de esporos, anaeróbico facultativo e que faz parte da microbiota intestinal de seres humanos e animais. Coloniza o trato intestinal do hospedeiro já nas primeiras horas de vida, estabelecendo uma relação de simbiose, embora não esteja totalmente esclarecido seu papel na microbiota entérica (SUSSMAN, 1997; TRABULSI; ALTHERTUM, 2005). São mesófilas, crescendo de 18 a 44°C, com temperatura ótima de crescimento de 37°C. Seu tamanho varia de 1,1 a 1,5 µm por 2 a 6 µm e produzem colônias com formas lisas ou rugosas em meio sólido, sendo possível ocorrer colônias mucóides (HIRSH; ZEE, 2003; FERREIRA; KNÖBL, 2009).

A maioria das amostras possui a capacidade de fermentar a lactose, entretanto algumas delas apresentam fermentação tardia (FERREIRA; KNÖBL, 2009). A produção de ácido e gás após a fermentação de maltose, glicose, lactose, manose, manitol, xilose, glicerol, ramnose, arabinose e sorbitol é também comum na maioria das amostras (KONEMAN et al., 2001; TORTORA; FUNKE; CASE, 2005).

Alguns sorotipos são considerados patogênicos, devido a diferentes fatores de virulência, podendo causar diversas manifestações clínicas, intestinais e extra-intestinais em inúmeras espécies de animais (FERREIRA; KNÖBL, 2009).

E. coli possui muitos sorogrupos determinados por estruturas antigênicas (FERREIRA; KNÖBL, 2009):

- Antígenos capsulares (*Kapal* – “K”) – de natureza proteica, podendo ser destruídos por aquecimento e com identificação realizada por testes de aglutinação;

- Antígenos fimbriais (*Fimbriae* – “F”) – de natureza proteica presentes na superfície bacteriana, capazes de reconhecer receptores específicos na superfície de células eucarióticas. Considerado um fator de virulência essencial para a aderência e colonização nos tecidos do hospedeiro;
- Antígenos somáticos (*Ohne* – “O”) – corresponde ao lipopolissacarídeo (LPS) presente na parede celular sendo constituído de três frações: a) antígeno somático que é uma cadeia de polissacarídeo que se projeta para o espaço extracelular; b) o lipídeo A que é liberado na multiplicação bacteriana e atua na ativação de macrófagos e estimula a liberação de vários mediadores da inflamação e c) o core que é uma fração intermediária composta por oligossacarídeo que liga covalentemente o lipídeo A ao antígeno somático.

A tipagem sorológica tem sido largamente utilizada para se caracterizar *E. coli*. Entretanto, somente a sorologia não é adequada para a caracterização de cepas patogênicas de *E. coli*, sendo principalmente utilizados métodos moleculares para a identificação de genes de virulência associados a cada categoria da bactéria (NATARO; KAPER, 1998).

Este gênero bacteriano envolve linhagens causadoras de diversos quadros clínicos em seres humanos e animais como: APEC (*E. coli* patogênica aviária), ETEC (*E. coli* enterotoxigênica), EPEC (*E. coli* enteropatogênicas), EaggEC (*E. coli* enteroagregativa), EIEC (*E. coli* enteroinvasora), DAEC (*E. coli* de aderência difusa), STEC (*E. coli* produtora de toxina Shiga) e NMEC (*E. coli* de meningite neonatal) (KONEMAN et al., 2001; TRABULSI; ALTERTHUM, 2005;)

2.2 COLIBACILOSE AVIÁRIA

Escherichia coli patogênica aviária (APEC) está associada a infecções extra-intestinais em galinhas, perus, patos e outras espécies aviárias causando a colibacilose aviária, termo utilizado para qualquer infecção localizada ou sistêmica responsável por significativa morbidade e mortalidade (DHO-MOULIN; FAIRBROTHER, 1999; TUNTUFYE et al., 2012).

Essa bactéria faz parte da microbiota de algumas espécies de aves, podendo-se encontrar mais de 10^6 unidades formadoras de colônias (UFC) por grama de fezes (BARNES; VAILLANCOURT; GROSS, 2003). Coloniza e persiste no trato intestinal das aves, sendo que aproximadamente de 10 a 15% dos coliformes são de sorotipos de *E. coli* potencialmente patogênicas. Esta localização proporciona uma excelente condição de disseminação da bactéria, pois uma vez eliminada pelas fezes a bactéria pode persistir no ambiente (BARNES; VAILLANCOURT; GROSS, 2003; DZIVA; STEVENS, 2008).

Em aves, as infecções por *E. coli* são consideradas multifatoriais, resultando da interação entre diversas variáveis como a presença de outros micro-organismos, manejo, instalações, alimentação e condição da ave. Na dependência da virulência da cepa bacteriana e destes fatores predisponentes as infecções podem ser localizadas nos sacos aéreos (aerossaculite) ou ocasionar pneumonia, pleuropneumonia, peritonite, colisepticemia, pericardite, celulite, onfalite, salpingite, doença respiratória crônica complicada (DRCC), sinovite, ooforite, artrite e osteomielite (BARNES; VAILLANCOURT; GROSS, 2003; FERREIRA; KNÖBL, 2009).

Os principais micro-organismos que predispõem ao surgimento da colibacilose nas aves são: *Mycoplasma gallisepticum*, vírus da Bronquite Infecciosa, vírus da Doença de Newcastle, vírus da Doença de Marek e vírus da Doença de Gumboro. Fatores como ventilação inadequada nos galpões, estresse, superpopulação, excesso de poeiras e gases também predispõe ao surgimento da doença (NAGARAJA, 1993; ANDREATTI FILHO, 2007; FERREIRA; KNÖBL, 2009).

Diferentes sorotipos de *E. coli* foram isolados de aves com colibacilose (MENÃO et al., 2002; DZIVA; STEVENS, 2008), mas além da sorotipificação também se utiliza para a caracterização da bactéria: a resistência a antibióticos, a detecção de toxinas, a presença de adesinas, a hemaglutinação, a adesão celular e a presença de plasmídeos (BARNES; VAILLANCOURT; GROSS, 2003).

2.3 FATORES DE VIRULÊNCIA

Características bioquímicas e sensibilidade a antibióticos podem ser semelhantes em cepas de *E. coli* patogênicas e apatogênicas, sendo importante a caracterização de genes de virulência para se determinar a patogenicidade de uma amostra. Entretanto, é importante ressaltar que a função de vários genes de virulência não está ainda elucidada (BARNES; VAILLANCOURT; GROSS, 2003; DZIVA; STEVENS, 2008).

O surgimento de técnicas moleculares nos últimos anos tem propiciado um melhor entendimento dos mecanismos de patogenicidade das APEC. Houve a identificação de genes e a associação de alguns à patogenicidade e ou virulência em aves (SCHOULER et al., 2004; LI et al., 2005).

Fatores de virulência de APEC foram estudados e mostraram que algumas amostras possuíam mecanismos de escape em relação aos mecanismos de defesa do hospedeiro, além de outros genes de virulência que contribuíam para a patogenicidade da bactéria (EWERS et al., 2004; DZIVA; STEVENS, 2008; TUNTUFYE et al., 2012). Dentre estes fatores estão: os lipopolissacarídeos (LPS), o antígeno O, a cápsula, as adesinas, os sistemas de secreção e os sistemas de captação de ferro (TUNTUFYE et al., 2012). A expressão de adesinas, a capacidade de resistir à ação microbicida do soro e a produção de sideróforos foram consideradas como fundamentais na patogenia da doença (FERREIRA; KNÖBL, 2009).

É importante ressaltar que os fatores de virulência podem ser transferidos através de plasmídeos de amostras não patogênicas para patogênicas (WOOLEY et al., 1998).

2.3.1 Adesinas

A adesão da bactéria no epitélio do hospedeiro é considerada um fator importante para a infecção, pois permite a ligação e manutenção do contato com o tecido epitelial do hospedeiro (MOON, 1990; WOOLEY et al., 1998).

As adesinas, moléculas de natureza proteica que apresentam a estrutura de *pili* ou fímbrias, são fatores de colonização. Recobrem a superfície bacteriana e são capazes de se ligar a receptores específicos nas superfícies de células eucarióticas (NAVEH et al., 1984; HOEPELMAN; TUOMANEN, 1992; OFEK; DOYLE, 1993). São produzidas por algumas cepas de *E. coli*, sendo importantes para a adesão em células eucarióticas. Estão associadas à aderência em muco, colonização da traqueia, trato intestinal, e interação ao epitélio celular do pulmão (DOZOIS et al., 1997; EDELMAN et al., 2003).

Adesinas fimbriais foram inicialmente descritas em cepas de *E. coli* de infecções urinárias humanas (UTI) e posteriormente em cepas de APEC (KALLENIOUS et al., 1980).

Em 1980, Arp e Jensen observaram que cepas virulentas e fimbriadas de *E. coli* foram mais persistentes em traqueia de perus do que cepas avirulentas e afimbriadas, sugerindo que as fímbrias poderiam ser um fator de virulência.

A fímbria tipo 1 está relacionada à adesão e colonização inicial no trato respiratório superior das aves, em cepas de APEC (MOON, 1990; WOOLEY et al., 1998). Esta propriedade pode ser inibida por anti-soros específicos e por D-manose, um carboidrato que interage com um receptor celular presente nas membranas de células eucarióticas, sendo esta característica utilizada para a detecção desta fímbria na bactéria (NAKAZATO et al., 2009). A expressão da fímbria tipo 1 *in vitro* é modulada pelas condições de cultivo, sendo favorecida quando a bactéria é cultivada tanto a 20°C como a 37°C, em baixas concentrações de oxigênio (ORSKOV; ORSKOV, 1983).

A fímbria P é codificada pelo operon *pap* que está localizado no cromossomo bacteriano, sendo que o gene *papA* codifica a maior proteína estrutural, o gene *papI* e *papB* são genes reguladores responsáveis pelo processo de variação de fase (LATHAM; STAMM, 1994; MOL; OUDEGA, 1996). Os genes *papD*, *papH*, *papJ*, *papF* e *papK* codificam proteínas relacionadas com a integridade do complexo

fimbrial e o gene *papE* é responsável por codificar a extremidade estrutural da fímbria (MOL; OUDEGA, 1996). Subunidades complexas dobradas pelo chaperoneo (PapC) são orientadas para o *usher*, onde estas subunidades se polimerizam e se translocam através da membrana externa pelo poro *usher* (THANASSI; SAULINO; HULTGREN, 1998; WAKSMAN; HULTGREN, 2009).

Na patogenicidade das APECs o papel da fímbria P ainda não está totalmente esclarecido. Estudos realizados *in vivo* sugeriram que estas adesinas seriam importantes nos últimos estágios da infecção, não no início do processo de colonização do trato respiratório superior (POURBAKHS et al., 1997).

Na superfície celular de *Escherichia coli* e *Salmonella enterica* se encontram a fímbria *curli*, que são apêndices finos e enrolados. Estas são responsáveis pela ligação da bactéria a proteínas da matriz extracelular, e pela sobrevivência no meio ambiente, auxiliando na formação de biofilmes. A expressão dos genes que codificam esta fímbria é controlada por fatores ambientais como pH, temperatura e osmolaridade (OLSEN; JONSSON; NORMARK, 1989).

2.3.2 Hemaglutinina sensível à temperatura (TSH)

A hemaglutinina sensível à temperatura é conhecida como uma proteína autotransportadora, pois utiliza um mecanismo próprio de transporte através da parede bacteriana (KOSTAKIOTI; STATHOPOULOS, 2004).

Um único gene é responsável pela expressão da proteína TSH que é sintetizada como uma proteína precursora de 140KDa, é clivada em uma proteína secretada de 106KDa e uma proteína de 33KDa presente na membrana externa (STATHOPOULOS; PROVENCE; CURTISS, 1999).

TSH é capaz de se aderir a hemácias, hemoglobina e proteínas da matriz extracelular como fibronectina e colágeno IV e possui atividade proteolítica contra a caseína. Dessa forma, apresenta propriedade proteolítica e de adesão (KOSTAKIOTI; STATHOPOULOS, 2004).

Estudos epidemiológicos indicaram que a presença do gene *tsh* em cepas de APEC, ocorria mais frequentemente em amostras patogênicas. Embora sua

participação na patogenia da colibacilose aviária não esteja esclarecida, pois a deleção do gene *tsh* não foi capaz de inibir a reação de hemaglutinação (PROVENCE; CURTISS, 1994).

Maurer et al. (1998) analisando amostras de origem aviária obtiveram 46% de amostras *tsh* positivas, 97% *csgA* positivas e 100% *crl* positivas. Estes resultados não foram confirmados por Campos et al. (2005) que demonstraram a presença de 25 e 50% do gene *tsh* em cepas de APEC isoladas de aves com septicemia e síndrome da cabeça inchada, respectivamente. No Brasil, Delicato et al. (2002) determinaram a ocorrência deste gene em 305 amostras de *E. coli* isoladas de aves, sendo 39,5% provenientes de aves com colisepticemia, 19% com celulite e 3,8% de amostras fecais.

Ewers et al. (2004) propuseram a utilização desse gene como um marcador molecular para se detectar cepas de APEC, em função da sua associação com APEC patogênica.

2.3.3 Cápsula

Consiste em uma estrutura externa composta de ácido N-acetil murâmico que algumas cepas de *E. coli* possuem na sua superfície. Esta interage com a via clássica do complemento, conferindo resistência à bactéria, sendo o antígeno capsular K1 geralmente associado aos sorogrupos O1, O2 e outros sorogrupos não caracterizados (BARNES; VAILLANCOURT; GROSS, 2003).

Mellata et al. (2003) investigaram o papel dos seguintes fatores de virulência de cepas de *E. coli* de origem aviária, dos sorogrupos O1, O2 e O78: fímbria P, fímbria *curli*, aerobactina, lipopolissacarídeo (LPS), antígeno capsular (K1) e hemaglutinina sensível a temperatura (*tsh*) na interação com células fagocíticas. Os resultados indicaram que a presença de fímbria tipo 1 protegeu a bactéria contra efeitos bactericidas de células fagocíticas, especialmente de heterófilos, bem como o antígeno capsular K1 e a fímbria P evitaram a fagocitose.

Brée, Dho e Lafont (1989) analisaram amostras de *E. coli* do sorotipo O2 e encontraram que a produção do antígeno K1 foi um determinante de virulência da

bactéria. Pourbakhsh et al. (1997) também investigaram os fatores de virulência de três cepas de *E. coli* aviária por inoculação destas por via do saco aéreo. Os resultados sugeriram que a resistência à fagocitose poderia ser um importante mecanismo bacteriano para o desenvolvimento da colibacilose aviária e que cepas expressando o antígeno capsular K1 foram mais resistentes aos efeitos bactericidas do soro em comparação com as cepas que expressavam outros antígenos K.

2.3.4 Alfa-hemolisina

Cepas de *E. coli* isoladas de infecções extra-intestinais apresentaram mais frequentemente a produção de α -hemolisina que as bactérias de origem fecal, sugerindo a importância desta como um fator de virulência. A hemolisina é secretada para o meio de cultura, como um peptídeo lábil, com 107 KDa, quando o crescimento bacteriano atinge a fase exponencial (MINISHEW et al., 1978; HOLLAND; BLIGHT; KENNY, 1990).

Para a síntese e secreção da α -hemolisina são necessários quatro genes localizados em uma região contígua do DNA, denominados *hlyA*, *hlyB*, *hlyC* e *hlyD*. Para a secreção da hemolisina para o meio extracelular são necessários os produtos dos genes *hlyB* e *hlyC* (MACKMAN et al., 1986).

A ação da hemolisina se dá pela formação de poros de 1 a 2 μ m de diâmetro, na membrana do eritrócito, após a inserção de um monômero na camada lipídica. A consequente hemólise é uma alternativa para a obtenção de ferro pela bactéria (LEBEK; GRUENIG, 1985; BHAKDI et al., 1986).

2.3.5 Resistência sérica

A resistência bacteriana ao complemento, mediada por estruturas da superfície bacteriana, foi associada com cepas de APEC (BARNES; VAILLANCOURT; GROSS, 2003; LYNNE et al., 2007).

Silveira, Fantinatti e Castro (1994) demonstraram que a presença de plasmídeo contendo o gene *iss* (aumento da sobrevivência no soro), não era suficiente para se determinar a capacidade patogênica de cepas de *E. coli*. Entretanto, esse gene foi considerado um marcador de virulência em APEC e foi encontrado na maioria das cepas patogênicas (PFAFF-MCDONOUGH et al., 2000). Johnson et al. (2008) descreveram o gene *iss* em um plasmídeo denominado Col V. Esse gene confere à bactéria resistência aos efeitos bactericidas do soro e é o mais prevalente em aves com colibacilose, atua pelo bloqueio do complexo de ataque à membrana do sistema complemento, que causa lise da célula.

Yang et al. (2004) analisaram 71 amostras de *E. coli* que apresentavam resistência à múltiplos antibióticos, encontraram positividade para o gene *iss* em 97% amostras. Entretanto, a associação entre a presença do gene *iss* e a resistência a antimicrobianos não foi estabelecida (NOLAN et al., 2003; MCPEAKE; SMYTH; BALL, 2005).

2.3.6 Sistema de aquisição de ferro

A capacidade de bactérias patogênicas sequestrarem o íon ferro dos fluidos orgânicos é considerada primordial para a virulência. Em APEC esta característica foi associada à letalidade em pintinhos de um dia de idade (DZIVA; STEVENS, 2008).

O íon ferro é encontrado em grandes quantidades nos fluídos corporais e tecidos. Em condições fisiológicas está ligado à glicoproteínas ou apresenta-se em forma insolúvel, constituindo um mecanismo de defesa do organismo, pois impede o

desenvolvimento de micro-organismos que necessitam deste elemento. Desta forma, as bactérias dependem da produção de complexos inorgânicos com afinidade pelo íon ferro (sideróforos) e da síntese de proteínas de membrana que atuem como receptoras para o complexo sideróforo-ferro (NEILANDS, 1981).

Bactérias patogênicas Gram negativas possuem esses mecanismos para a aquisição de ferro. O sistema melhor caracterizado é o da aerobactina, que em amostras de *E. coli* pode ser codificado por genes cromossomais ou plasmideais. Este sistema compreende genes para a síntese de aerobactina (*iuc*) e do receptor para a aerobactina ligada ao íon ferro (*iut*), para a captação deste (LAFONT et al., 1987).

Além da aerobactina, existem outros sistemas de aquisição e transporte do íon ferro presentes no plasmídeo ColV, que inclui o sistema de transporte de ferro *sitABC* (DZIVA; STEVENS, 2008).

2.4 RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS

A história da humanidade é marcada pela luta constante contra os micro-organismos que causam diversas infecções e doenças. A partir do século XX o descobrimento da penicilina surgiu como a primeira grande arma nesta batalha. O desenvolvimento de outros antimicrobianos trouxe uma euforia aos profissionais de saúde. Entretanto, com o uso indiscriminado destes produtos, rapidamente houve a resposta das bactérias, com o desenvolvimento de várias formas de resistência (TENOVER, 2006).

A resistência bacteriana a antimicrobianos continua aumentando muito, principalmente nas últimas décadas e tornou-se um problema de proporções mundiais (ROSSI; ANDREAZZI, 2005). O uso intensivo de antibióticos como promotores de crescimento em animais induziu uma grande seleção de bactérias resistentes e a fixação destas características nas populações, com impacto tanto em saúde pública como animal, pois algumas classes desses produtos normalmente utilizados para o tratamento de infecções humanas são também utilizados como promotores de crescimento e tratamento em animais (WEGENER et al., 1999).

Aproximadamente 8.164.662 Kg de antibióticos foram utilizados, por ano, em criações animais, sendo que 70% foram utilizados como promotor de crescimento, em contraste com 1.363.636 Kg utilizados em medicina humana (ROE; PILLAI, 2003).

Os micro-organismos geralmente resistem a ação de antibióticos por interferência com os requisitos necessários para a ligação do fármaco ao seu local de destino, destruindo ou alterando a integridade conformacional da droga ou prevenindo que o medicamento atinja uma concentração efetiva no seu local de ação, essa resistência bacteriana pode ser plasmideal ou cromossomal (Quadro 1) (CLARKE, 2006).

Em relação a *E. coli* há uma grande preocupação, pois algumas cepas foram capazes de adquirir e transferir genes de resistência bacteriana, o que dificultou o tratamento (JOUINI et al., 2009; KOO; WOO, 2011; SUNDE; NORSTRÖM, 2006).

Zanata et al. (2004) analisaram a sensibilidade a antimicrobianos em 27 amostras de *E. coli* isoladas de aves com colibacilose da região centro-oeste do Estado de São Paulo. Obtiveram como resultado a resistência das amostras testadas frente a quase todas as drogas, sendo que as amostras não apresentaram resistência somente à ciprofloxacina, a norfloxacina e a gentamicina.

Miles, McLaughlin e Brown (2006) analisaram 82 amostras de *E. coli* isoladas de frangos de corte, urina e fezes de pacientes hospitalizados para se determinar a suscetibilidade destas bactérias frente a 11 antimicrobianos. Encontraram 82,4% de resistência à tetraciclina nas amostras isoladas de aves comparadas a 43,8% nas amostras humanas. Além disso, as amostras aviárias apresentaram maior resistência à kanamicina e ao ácido nalidíxico, enquanto as de humanos foram mais resistentes ao cloranfenicol e a gentamicina.

Obeng et al. (2012) analisaram 251 amostras de *E. coli* de fezes de frangos de criações intensivas e frangos, poedeiras de vida livre na Austrália. Encontraram 40,6% e 26,7% de resistência à tetraciclina e à ampicilina respectivamente. Também observaram resistência à sulfa-trimetropin (12,4%), estreptomicina (10,8%), espectomicina (9,6%), neomicina (6,0%) e florfenicol (2,0%), mas nenhuma resistência foi observada à gentamicina, ciprofloxacina e ceftiofur.

Quadro 1 - Mecanismos de resistência entre bactérias e suas bases genéticas

Mecanismo de resistência	Classe de antibiótico	Genética
Inibição enzimática β -lactamases		
• Grupo 1 – cefalosporina (hidrólise não inibida por CA)	β -lactamase	Cromossomal
• Grupo 2a – penicilinas inibidas por CA	β -lactamase	Plasmideal
• Grupo 2bN – amplo espectro não inibido por CA	β -lactamase	Plasmideal e cromossomal
• Grupo 2b – amplo espectro estendido	β -lactamase	Plasmideal
• Grupo 2c – carbenicilinas, oxilinas	β -lactamase	Plasmideal e cromossomal
• Grupo 2e – cefalosporinas inibidas por CA	β -lactamase	Plasmideal e cromossomal
• Grupo 3 – metaloenzimas	β -lactamase	Plasmideal e cromossomal
• Grupo 4 – penicilinas não inibidas por CA Acetiltransferases, adeniltransferases, fosfortransferases Cloranfenicol acetiltransferases Esterases, fosfortransferases Alteração de permeabilidade Canais de porinas Efluxo de drogas	Aminoglicosídeos Cloranfenicol Macrolídeos, estreptograminas B-lactamases, aminoglicosídeos e macrolídeos B-lactamases e carbapenems Quinolonas, tetraciclina, cloranfenicol e β -lactamases	Plasmideal e cromossomal Plasmideal, exceto <i>Enterococcus faecium</i> (cromossomal) Plasmideal, cromossomal Plasmideal Cromossomal Cromossomal Plasmideal, cromossomal
Alteração de local alvo Proteína de ligação de penicilina alterada Oligopeptídeo da parede celular alterada Alvo ribossomal alterado	B-lactamases Glicopeptídeo Tetraciclina, macrolídeos, aminoglicosídeos, estreptograminas, oxazolidinone	Plasmideal em <i>S. aureus</i> , genes mosaico em <i>Streptococcus pneumoniae</i> penicilina resistente <i>vanA</i> e <i>vanB</i> – transferível plasmídeo; <i>vanC</i> – plasmídeo
• Inibição competitiva pelo excesso de produção de ácido p-aminobenzoico ou sintetase dihidropteroato alteradas	Sulfonamidas	Plasmideal
• Utilização de requerimento alternativo de crescimento	Trimetropina	Plasmideal

CA – ácido clavulônico

Fonte: Adaptado de KHardORI, 2006

2.5 EPIDEMIOLOGIA

E. coli é uma bactéria encontrada na microbiota entérica, na maioria dos mamíferos e aves, com a colonização do intestino iniciando-se logo após o nascimento. Sua presença em água e alimentos é um indicador de contaminação fecal (FRANCO; LANDGRAF, 2006).

A colibacilose aviária tem distribuição cosmopolita e as aves excretam a bactéria de forma contínua pelas fezes, o que faz com que esta permaneça por longos períodos nas criações, contaminando água e alimentos que poderão ser vias de transmissão da doença. Aves silvestres e roedores também podem funcionar como reservatório do agente (BARNES; VAILLANCOURT; GROSS, 2003).

A via natural de infecção não está claramente definida, entretanto o trato respiratório parece ser uma das mais significantes portas de entrada, com posterior colonização da traqueia e disseminação para sacos aéreos e tecidos adjacentes (DZIVA; STEVENS, 2008).

A colibacilose é multifatorial, resultante da interação entre a bactéria, o meio ambiente e o hospedeiro, sendo que apenas amostras patogênicas podem causar a doença nas aves, ou seja, as que apresentem fatores de virulência (FERREIRA; REVOLLEDO; FERREIRA, 2009).

São considerados fatores predisponentes para a colibacilose infecções por *Mycoplasma*, doença de Newcastle, coriza infecciosa das galinhas, pneumovirose, bronquite infecciosa das galinhas, doenças imunossupressoras como doença de Gumboro, além de condições de ventilação inadequada e estresse (BARNES; VAILLANCOURT; GROSS, 2003; FERREIRA; KNÖBL, 2009).

Normalmente as aves mais jovens (entre 4 e 9 semanas de idade) são mais susceptíveis aos quadros respiratórios e nas aves adultas observa-se a ocorrência de salpingite (FERREIRA; REVOLLEDO; FERREIRA, 2009).

2.6 MUTAGÊNESE BACTERIANA

Mutações são alterações na estrutura química ou física do DNA, que podem ser causadas por agentes físicos ou químicos, ocasionando variações fenotípicas ou variações detectadas por processos bioquímicos ou biofísicos. Podem ser espontâneas, ocasionadas por erro na replicação do DNA por exposição do micro-organismo a influências extracelulares do meio onde o mesmo se encontra, ou induzida por exposição proposital a um agente genotóxico (TRABULSI; ALTERTHUM, 2005).

A taxa de mutação bacteriana frente a um mutagênico específico depende da natureza da base no extremo 5' do DNA, sendo esta taxa de 1×10^{-4} ou maior. A estimativa é de um (01) erro a cada mil a dez mil replicações para *E. coli* que possui um cromossomo de $4,6 \times 10^6$ pares de bases. Nesta espécie foram detectados genes suscetíveis à mutação, como por exemplo, o gene que produz a RNA polimerase termolábil (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005; TRABULSI; ALTERTHUM, 2005).

Pesquisas com substâncias mutagênicas indicaram a possibilidade das mutações induzirem a uma diminuição na virulência de algumas bactérias, conservando sua capacidade imunogênica. Uma cepa J5 de *E. coli* O78 com mutação no gene para a endotoxina, com uma endotoxina incompleta na sua parede celular, foi segura e eficaz na proteção de pintos após a utilização como vacina e desafio com cepa homóloga (ABDUL AZIZ; EL SOKHON, 1998).

Nagano, Kitaha e Nagai (2012) produziram uma vacina viva atenuada com uma cepa aviária patogênica de *Escherichia coli* O78, por deleção no gene *crp*, conseqüentemente sem a capacidade de produzir indol. A cepa com mutação não possuía os genes *tsh*, *iss*, *cvaA* e *papC* e era suscetível a vários antimicrobianos com a exceção de ácido nalidíxico. Após a vacinação por via *spray*, ocular e *in ovo*, ocorreu uma diminuição do escore de lesões e redução de mortalidade e manifestações clínicas, após o desafio, por via intravenosa, com cepa homóloga.

2.7 VACINAS

Diante dos vários problemas sanitários decorrentes da criação de aves industriais, a vacinação é uma ferramenta imprescindível para a manutenção da saúde dos animais. Os principais tipos de vacinas utilizadas para as aves são as inativadas, onde os micro-organismos são mortos por algum processo ou produto químico e as atenuadas, cujos micro-organismos perdem ou tem sua virulência diminuída (MENÃO, 2008).

Nas últimas décadas, vários tipos dessas vacinas foram testadas em aves comerciais para se controlar a septicemia e doenças respiratórias causadas por APEC (DHO-MOULIN; FAIRBROTHER, 1999; YAGUCHI et al., 2009; LYNNE et al., 2012). Os sorotipos mais utilizados para a produção destas foram o O2 e o O78, mais comumente encontrados em casos de colibacilose aviária. Estas vacinas promovem a proteção contra sorotipos homólogos, entretanto, não há proteção contra as cepas heterólogas (MENÃO, et al. 2002; BARNES; VAILLANCOURT; GROSS, 2003).

Melamed, Leitner e Heller (1991) conseguiram obter melhor proteção com as vacinas inativadas quando utilizaram as cepas dos sorotipos O2 e O78 de *E. coli* e o método de inativação por ultra-som seguido pelo processo de radiação, quando comparado ao método de inativação por formalina e irradiação. Correlacionaram o grau de proteção conferido com a concentração sérica de anticorpos. Estas vacinas foram utilizadas para a vacinação de matrizes com o intuito de proporcionar uma imunidade passiva na progênie contra as cepas homólogas, por até 21 dias de idade (HELLER et al., 1990).

Gomis et al. (2007) testaram a citosina-guanina-diestér (CpG) como adjuvante para potencializar a resposta imune em uma vacina inativada oleosa contra *E. coli* em aves. Vacinaram dois grupos de aves com e sem o adjuvante, com duas doses, e 10 dias após realizaram o desafio com cepa homóloga e virulenta. Encontraram no grupo vacinado com CpG títulos de IgG maiores, significativamente menor mortalidade das aves e menor isolamento de bactérias dos órgãos internos comparados ao grupo vacinado sem CpG.

As vacinas inativadas necessitam de adjuvantes para potencializar e prolongar o período de resposta imune, consequentemente mais onerosas e podem

causar efeitos colaterais nas aves. Dessa forma, não devem ser utilizadas em frangos de corte, portanto, as vacinas atenuadas tornam-se uma alternativa viável neste tipo de criação (YUNIS et al., 2000; PEIGHAMBARI et al., 2002; GREGERSEN et al., 2010).

Fromer et al. (1994) demonstraram que uma vacina preparada com uma cepa não patogênica de *E. coli* induziu imunidade e proteção contra cepas homólogas e heterólogas, em frangos vacinados com 14 e 21 dias de idade.

Vacinas recombinantes também estão sendo testadas para a proteção contra a colibacilose aviária. Lynne et al. (2012) testaram uma vacina recombinante no gene *iss de E. coli* e demonstraram que esta conferia maior proteção às aves após o desafio quando comparadas às aves do grupo controle.

Os sorotipos O1, O2 e O78 foram os mais frequentemente encontrados em casos de colibacilose aviária na maioria dos países, apesar de ocorrer variação geográfica. Em consequência, estes resultados direcionam para a utilização destes sorotipos na produção de vacinas (BARNES; VAILLANCOURT; GROSS, 2003).

3. OBJETIVOS

Os objetivos estão divididos em geral e específicos, os quais seguem discriminados abaixo.

3.1. GERAL

- Caracterizar as cepas pré-selecionadas (selvagens ou com mutações) com respeito à patogenicidade e caracterização genotípica.

3.2. ESPECÍFICOS

- Caracterizar as cepas em relação à suscetibilidade a antimicrobianos.
- Induzir resistência a rifampicina, a estreptomicina e ao ácido nalidíxico.
- Produzir *E. coli* com mutações pela exposição a substância mutagênica;
- Comparar o genótipo, ou seja, o perfil de genes de virulência e a suscetibilidade a antimicrobianos, de cepas de *E. coli* selvagens ou com mutações;
- Comparar a patogenicidade de cepas de *E. coli* selvagens com as cepas com mutações em pintinhos infectados, por via do saco aéreo;
- Comparar as lesões induzidas em pintinhos inoculados com cepas selvagens ou com mutações.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 AMOSTRAS BACTERIANAS

Foram selecionadas nove (09) amostras de *E. coli* patogênicas de diferentes Estados brasileiros, pertencentes a coleção de cultura do Laboratório de Ornitopatologia da Universidade de São Paulo, isoladas de aves que apresentaram as seguintes enfermidades: onfalite, salpingite, doença respiratória crônica complicada e colisepticemia. As características previamente estudadas e consideradas nesta seleção foram: patogenicidade, genes de virulência e sensibilidade a antimicrobianos.

Todas as amostras selecionadas foram cultivadas em ágar MacConkey por 24 horas a 37°C. O quadro 2 apresenta o número, sorotipo, origem e o órgão de isolamento das amostras pertencentes à coleção de cultura do laboratório de Ornitopatologia/ FMVZ/USP.

Uma colônia de cada amostra cultivada em ágar MacConkey foi transferida para o meio Luria Bertani (LB) e incubada a 37°C por 24 horas. Uma alíquota de 200 µL de cada cultura foi utilizada para a extração de DNA.

Quadro 2 - Identificação das amostras de *E coli*, sorotipo, origem e órgão de isolamento

Amostra	Identificação	Sorotipo	Origem	Órgão de isolamento
<i>Escherichia coli</i>	EC 269	O2	São Paulo	Fígado
<i>Escherichia coli</i>	EC 341	O119	São Paulo	Saco aéreo
<i>Escherichia coli</i>	EC 713	NT	São Paulo	Saco aéreo
<i>Escherichia coli</i>	EC 775	O78	São Paulo	Fígado
<i>Escherichia coli</i>	EC 1299	O78	Santa Catarina	Fígado
<i>Escherichia coli</i>	EC 1696	O78	São Paulo	Saco aéreo
<i>Escherichia coli</i>	EC 1708	O88	São Paulo	Saco aéreo
<i>Escherichia coli</i>	EC 1869	O112	São Paulo	Intestino
<i>Escherichia coli</i>	EC 1889	NT	São Paulo	Intestino

4.2 EXTRAÇÃO DO DNA BACTERIANO E REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR)

4.2.1 Determinação dos fatores de virulência

Diferentes pares de *primers* foram utilizados na pesquisa dos genes de virulência. O quadro 3 apresenta as informações sobre os genes pesquisados, a sequência dos oligonucleotídeos, o tamanho dos fragmentos e as referências bibliográficas utilizadas.

A extração de DNA foi realizada segundo a metodologia descrita por Boom et al. (1990). A amplificação foi realizada em termociclador. A mistura para a amplificação foi constituída por Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM, gelatina 0,001% (água/volume), trifosfatos de desoxinucleotídeos 200 µM,

pares de *primers*, e Taq DNA polimerase 0,5 U em um volume final de 25 µl. Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese em um gel de agarose 1,5% e examinados após coloração com SyBR® Safe DNA gel stain (Invitrogen). O marcador de peso molecular utilizado foi o DNA ladder (Invitrogen) de 100 pb.

Quadro 3 - Genes de virulência pesquisados pela reação de polimerase em cadeia

Genes	Pares de <i>primers</i> (5'-3')	Referência
<i>iucD</i>	TACCGGATTGTCATATGCAGACCGT AATATCTTCTCCAGTCCGGAGAAG	YAMAMOTO et al., 1995
<i>tsh</i>	GGGAAATGACCTGAATGCTGG CCGCTCATCAGTCAGTACCAC	MAURER et al., 1998
<i>iss</i>	GTGGCGAAAAGTAAACAGC CGCCTCGGGGTGGATAA	HORNE et al., 2000
<i>papC</i>	TGATATCACGCAGTCAGTAGC CCGGCCATATTCACATAAC	JANBEN et al., 2001
<i>irp2</i>	AAGGATTCGCTGTTACCGGAC TCGTCGGGCAGCGTTTCTTCT	SCHUBERT et al., 1998
<i>astA</i>	TGCCATCAACACAGTATATCC TAGGATCCTCAGTCCGAGTGACGGC	YAMAMOTO e ECHEVERRIA, 1996
<i>cvi/cva</i>	TCCAAGCGGACCCCTTATAG CGCAGCATAGTTCCATGCT	EWERS et al., 2007
<i>sfa</i>	CTCCGGAGAACTGGGTGCATCTTAC CGGAGGAGTAATTACAAACCTGGCA	YAMAMOTO et al., 1995
<i>hly</i>	AACAAGGATAAGCACTGTTCTGGCT ACCATATAAGCGGTCATTCCCGTCA	YAMAMOTO et al., 1995
<i>neuS</i>	TATAATTAGTAACCTGGGGC GGCGCTAATGAATAAGACTG	TSUKAMOTO, 1997
<i>cnf</i>	AAGATGGAGTTTCTATGCAGGAG CATTGAGTCTGCCCTCATTATT	YAMAMOTO et al., 1995
<i>vat</i>	TCCTGGGACATAATGGTCAG GTGTCAGAACGGAATTGTC	EWERS et al. 2004

4.3 TESTES DE SUSCETIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS

Dois diferentes métodos diagnósticos foram utilizados nas cepas de *E. coli* para a seleção de amostras para a indução de resistência à antimicrobianos.

4.3.1 Concentração inibitória mínima

Utilizou-se o teste de microdiluição comercial Avipro *plate* (Lohmann Animal Health & Co. KG) que quantifica *in vitro* a atividade de um antimicrobiano frente a bactérias isoladas de aves. Cada cavidade é preparada com as diferentes concentrações dos seguintes antibióticos: amoxicilina, colistina, doxiciclina, enrofloxacina, eritromicina, espectinomicina, estreptomicina, lincomicina, neomicina, oxacilina, penicilina, rifampicina, tiamulina, tilmicosin, tetraciclina, lincomicina-espectinomicina e trimetropin-sulfametazona.

Uma colônia da cada cepa a ser testada de *E. coli*, semeada em ágar MacConkey e mantida a 37°C por 24 horas, foi inoculada em 5 mL de solução de NaCl 0,9%, homogeneizada. A turbidez foi ajustada pela escala de MacFarland a 0,5 ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL) com o auxílio de um espectrofotômetro, em comprimento de onda de 620 nm. A amostra ATCC 25922 de *Escherichia coli* foi utilizada como controle positivo.

Uma alíquota de 50 µL da suspensão bacteriana foi transferida para 11 mL de meio Muller-Hinton, homogeneizada e 100 µL transferidos para cada cavidade da placa, antes de 30 minutos. A placa foi incubada a 37°C por 18 a 24 horas.

A leitura visual foi realizada pela presença ou ausência de crescimento bacteriano e as bactérias foram classificadas como: sensível (S), parcialmente sensível (PS) ou resistente (R).

4.3.2 Técnica de difusão em disco

Os perfis de sensibilidade a antimicrobianos dos isolados foram analisados por meio da técnica de difusão em ágar, pela técnica de Bauer-Kirby (1966), seguindo as recomendações do CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*, 2009).

Foram utilizados os seguintes antibióticos: ácido nalidíxico (30 µg), ampicilina (10 µg), cloranfenicol (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), doxiciclina (30 µg), enrofloxacina

(10 µg), eritromicina (15 µg), estreptomicina (10 µg), florfenicol (30 µg), gentamicina (10 µg), tetraciclina (30 µg) e sulfa-trimetropin (30 µg).

A cepa ATCC 25.922 foi utilizada como controle positivo.

4.3.3 Indução de resistência a antimicrobianos

Todas as cepas bacterianas foram semeadas em ágar MacConkey e incubadas a 37°C por 24 horas. Uma colônia de cada cepa foi selecionada e semeada em placas com ágar nutriente, com concentrações crescentes (de 10 a 800 mg/L) de ácido nalidíxico, estreptomicina e rifampicina. A placa foi incubada por 24 horas a 37°C. O quadro 4 mostra a cepa de *E. coli* estudada e a resistência inicial ao antibiótico utilizado.

A estabilidade da resistência foi testada por 20 passagens sucessivas, em ágar nutriente e posterior semeadura em ágar nutriente com 800 µg/mL de antibiótico.

Quadro 4 – Cepas de *E. coli* e antibióticos utilizados para a indução de resistência

Cepa	Antibiótico
EC 269	Rifampicina
EC 341	Rifampicina
EC 713	Rifampicina
EC 775	Rifampicina
EC 1299	Rifampicina
EC 1696	Ácido nalidíxico
EC 1708	Estreptomicina
EC 1869	Rifampicina
EC 1889	Estreptomicina

4.4 INDUÇÃO DE MUTAÇÃO POR SUBSTÂNCIA MUTAGÊNICA

Uma colônia de cada cepa de *E. coli* semeada em ágar MacConkey e mantida a 37°C por 24 horas, foi inoculada em 2 mL de meio Luria Bertani (LB) e incubada a 37°C por 24 horas.

A esta suspensão bacteriana se adicionou 100 mL de PBS 0,1M, pH 7,4 contendo a substância mutagênica (o nome da substância não foi citado devido ao requerimento de patente USP), incubando-se a 37°C por seis (06) horas. Realizou-se diluição seriada, na base 10, de cada amostra em zero, três e seis horas para se avaliar a mortalidade bacteriana.

Após seis (06) horas, semeou-se uma alíquota de cada amostra em ágar MacConkey, e as placas foram mantidas a 37°C por 24 horas, para o isolamento de colônias bacterianas.

4.5 POLIMORFISMO DO COMPRIMENTO DE FRAGMENTOS AMPLIFICADOS (AFLP)

As amostras foram submetidas à extração do DNA genômico segundo as descrições de Boom et al. (1990). As amostras de DNA foram armazenadas a -20°C. O AFLP foi realizado com a endonuclease de restrição Hind III, segundo o protocolo descrito por McLauchlin et al. (2000).

Para a clivagem do DNA bacteriano, 4 µg de DNA foram adicionados a um microtubo contendo 24U de Hind III, tampão da enzima (1X) e água ultra pura estéril para um volume final de 20 µL. O tubo foi incubado a 37°C por 12 a 18 horas.

Uma alíquota de 5µL do DNA clivado foi adicionada a um microtubo contendo 0,2 µg dos adaptadores ADH1 e ADH2, 1U de T4 DNA ligase, tampão da enzima para esta reação e água ultra pura estéril para um volume final de 20 µL. Esta reação foi incubada à temperatura ambiente por três (03) horas. O DNA ligado foi aquecido a 80°C por 10 minutos. A PCR foi realizada utilizando-se 2µL do DNA ligado diluído, 2,5 mM de MgCl₂, 300 ng do “primer” (HI-G), 1U de Taq DNA polimerase, 1 X tampão de PCR e água ultra pura estéril para um volume final de 50

μL . A reação foi submetida à desnaturação a 94°C por 4 minutos seguidos por 35 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 60°C e 2,5 minutos a 72°C.

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese a 28V por 24 horas em gel de agarose 2%, e em seguida corado com Gel Red® (Biotium) por 30 minutos, sob agitação. O gel foi então fotografado através de luz ultra-violeta em um sistema de foto documentação convencional. Os fragmentos foram identificados por meio de um marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen).

4.6 TESTE DE PATOGENICIDADE EM PINTINHOS DE UM DIA

4.6.1 Aves

Foram utilizados pintinhos livres de patógenos específicos (SPF), com um dia de idade. As aves foram alimentadas com ração comercial, água *ad libitum* e alojadas em bateria de 1,7 m². As amostras foram estudadas individualmente, em grupos de 10 aves, para se evitar a contaminação cruzada entre as amostras de *E. coli*.

4.6.2 Delineamento experimental

As aves *SPF* foram divididas em 20 grupos (n=10). Estas receberam 0,1 mL de *E. coli* selvagem ou com mutação por via do saco aéreo direito. As aves do grupo 19 receberam meio Luria Bertani (LB) (C1) e aquelas do grupo 20, nenhuma inoculação (C2). O quadro 5 descreve estes grupos.

Quadro 5 – Grupos de aves e cepas de *E. coli* utilizadas para a inoculação das aves

Grupos	Cepa
T1	EC 269 S
T2	EC 269 M
T3	EC 341 S
T4	EC 341 M
T5	EC 713 S
T6	EC 713 M
T7	EC 775 S
T8	EC 775 M
T9	EC 1299 S
T10	EC 1299 M
T11	EC 1669 S
T12	EC 1699 M
T13	EC 1708 S
T14	EC 1708 M
T15	EC 1869 S
T16	EC 1869 M
T17	EC 1889 S
T18	EC 1889 M
T19	Controle 1 (C1)
T20	Controle 2 (C2)

4.6.3 Teste de patogenicidade

O teste de patogenicidade foi realizado através da inoculação de 0,1 mL de cultura bacteriana, padronizada por contagem por diluição seriada em de 2×10^5 a $1,2 \times 10^7$ unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) (Quadro 6), no saco aéreo de pintinhos de um dia de idade, como descrito por Dho e Lafont (1982). Para o preparo do inoculo foi semeada uma (01) colônia de cada cepa bacteriana em 5 mL de caldo BHI (Difco, Detroit, MI), incubando-se a cultura por 12 horas a 37°C.

A mortalidade foi acompanhada com observações de 12 em 12 horas por dez dias e de acordo com o índice de mortalidade, as amostras foram classificadas em alta (mortalidade > 80%), intermediária (mortalidade $\geq 50\%$ e $\leq 80\%$), baixa patogenicidade (mortalidade < 50%) e não patogênica (mortalidade zero). Após este período, as aves foram sacrificadas em câmara de CO₂ e necropsiadas para a avaliação das seguintes lesões: aerossaculite, pericardite e perihepatite.

Utilizou-se um índice de escore de lesão variando de 0 a 4 de acordo com as alterações macroscópicas encontradas. O quadro 7 detalha as características observadas.

Quadro 6 – Cepas de *E. coli* e concentrações utilizadas para a inoculação, por do via saco aéreo, de pintinhos *SPF* de um dia de idade

Cepa	Título
EC 269 S	1×10^6
EC 269 M	9×10^5
EC 341 S	2×10^6
EC 341 M	$1,2 \times 10^7$
EC 713 S	4×10^6
EC 713 M	1×10^6
EC 775 S	2×10^5
EC 775 M	6×10^6
EC 1299 S	3×10^6
EC 1299 M	3×10^6
EC 1696 S	5×10^6
EC 1696 M	3×10^6
EC 1708 S	3×10^6
EC 1708 M	4×10^6
EC 1869 S	2×10^6
EC 1869 M	2×10^5
EC 1889 S	1×10^6
EC 1889 M	1×10^6

Quadro 7 – Escore de lesão para sacos aéreos, serosa hepática e pericárdio

Local	Descrição	Escore
Sacos aéreos	Normal	0
	Leve opacidade dos sacos aéreos.	1
	Opacidade localizada dos sacos aéreos e com presença de exsudato.	2
	Opacidade extensa e presença de placas de fibrina	3
Fígado	Normal	4
	Presença de fibrina em pequena quantidade	0
	Presença de placas de fibrina na superfície hepática	1
	Presença de fibrina extensa e que forma aderência no tecido hepático	2
Coração	Placas extensas e espessas de fibrina em todo o fígado	3
	Normal	0
	Quantidade excessiva de fluido claro dentro do saco pericárdico	1
	Opacidade no pericárdio ou presença de fluido turvo dentro do saco pericárdico	2
Coração	Placas extensas de fibrina que revestem todo pericárdio	3
		4

Fonte: Adaptado de Goren (1978)

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

5.1 ANÁLISE ESTATÍSTICA DE AFLP

Para a análise estatística dos fragmentos gerados foi utilizado o programa *Bionumerics* (AppliedMaths, Sint-Martens-Latem, Bélgica). A similaridade das amostras foi estimada por meio do coeficiente de Dice. Com a matriz de similaridade gerada foi possível se determinar os grupos pelo método de "Unweighthed Pair-Group Method Using Arithmetic Average" (UPGMA).

5.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA DE PATOGENICIDADE E ESCORE DE LESÃO

A mortalidade e a proteção contra as lesões (aerossaculite, pericardite e perihepatite) induzidas por *E. coli* foram comparadas utilizando-se o teste de Fischer. Os resultados foram considerados significantes quando $p < 0,05$.

6 RESULTADOS

6.1 SUSCETIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS

Não ocorreram diferenças nos resultados obtidos nos dois testes quando utilizados com o mesmo antibiótico, com exceção da cepa EC 341 selvagem ou com mutação, que foi classificada como resistente no teste de concentração inibitória mínima (MIC) e parcialmente sensível na técnica de difusão em disco (TDD) frente à eritromicina.

6.1.1 Concentração inibitória mínima (MIC)

A suscetibilidade aos antimicrobianos por meio do método da concentração inibitória mínima (MIC) indicaram diferenças no perfil de suscetibilidade aos antibióticos nas nove amostras testadas.

Todas as cepas testadas selvagens ou tratadas com a substância mutagênica foram resistentes à lincomicina, oxaciclina, penicilina, tiamulina e tilmicosin e sensíveis a colistina e enrofloxacina.

A cepa EC 341 selvagem (S) ou tratada com a substância mutagênica (M) foi parcialmente resistente a eritromicina.

Ocorreram resistências nas amostras analisadas de 33,33% a amoxicilina, de 11,11% a doxaciclina, de 55,55% a espectiomicina, de 66,66% a estreptomicina, de 77,77% a lincomicina-espectiomicina, de 33,33% a neomicina, de 22,22% a rifampicina, de 22,22% a tetraciclina e de 33,33% trimetropin-sulfa.

A amostra EC 1669 S tornou-se espontaneamente resistente a neomicina após a exposição a concentrações crescentes de ácido nalidíxico.

A tabela 1 apresenta estes resultados.

6.1.2 Técnica de difusão em disco (TDD)

Todas as cepas testadas selvagens ou tratadas com a substância mutagênica foram resistentes à eritromicina e lincomicina e sensíveis ao cloranfenicol, ciprofloxacina, enrofloxacina, florfenicol e gentamicina. Ocorreram resistências nas amostras analisadas de 22,22%, 11,11% e 66,66%, respectivamente, a ampicilina, a doxaciiclina e a estreptomicina.

A amostra EC 1669 M tornou-se resistente ao ácido nalidíxico após a exposição a concentrações crescentes a este antibiótico e espontaneamente resistente a neomicina. A tabela 1 apresenta estes resultados.

6.2 INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS

Ocorreram alterações de sensibilidade nas cepas após a exposição a concentrações crescentes de rifampicina, eritromicina ou ácido nalidíxico. As cepas EC 269 S, EC 341 S, EC 713 S, EC 775 S, EC 1299 S e EC 1869 S, tornaram-se resistentes a rifampicina após a exposição a este antibiótico. As cepas EC 1708 S e EC 1889 S tornaram-se resistentes a estreptomicina e a cepa EC 1669 S tornou-se resistente após a exposição ao ácido nalidíxico. A tabela 1 apresenta estes resultados.

Tabela 1 - Resultados dos testes de suscetibilidade a antimicrobianos (mg/L), no teste de difusão em disco (TDD) em mm e no teste de concentração inibitória mínima em µg/mL (Continua)

Cepas de <i>Escherichia coli</i> (cepas selvagens ou tratadas com concentrações crescentes de antibióticos)							
Antibióticos	Método ¹	EC 269 S	EC 269 R	EC 341 S	EC 341 R	EC 713 S	EC 713 R
Ácido Nalidíxico	TDD	26 ^S	26 ^S	32 ^S	30 ^S	28 ^S	28 ^S
Amoxiciclina	MIC	≥2 ^S	≥2 ^S	≥16 ^K	≥16 ^K	≥2 ^S	≥2 ^S
Ampicilina	TDD	22 ^S	22 ^S	22 ^S	22 ^S	24 ^S	22 ^S
Cloranfenicol	TDD	30 ^S	30 ^S	32 ^S	30 ^S	30 ^S	28 ^S
Ciprofloxacina	TDD	30 ^S	30 ^S	34 ^S	34 ^S	32 ^S	32 ^S
Colistina	MIC	≤2 ^S	≤2 ^S	≤2 ^S	≤2 ^S	≤2 ^S	≤2 ^S
Doxaciclina	MIC	≥2 ^S	≥2 ^S	≥2 ^S	≥2 ^S	≥2 ^S	≥2 ^S
	TDD	24 ^S	24 ^S	28 ^S	24 ^S	30 ^S	28 ^S
Enrofloxacin	MIC	≤0,25 ^S	≤0,25 ^S	≤0,25 ^S	≤0,25 ^S	≤0,25 ^S	≤0,25 ^S
	TDD	30 ^S	30 ^S	32 ^S	32 ^S	34 ^S	34 ^S
Eritromicina	MIC	≥4 ^R	≥4 ^R	≥4 ^R	≥4 ^R	≥4 ^R	≥4 ^R
	TDD	12 ^R	12 ^R	18 ^{PS}	16 ^{PS}	12 ^R	12 ^R
Espectiomicina	MIC	<32 ^S	<32 ^S	<32 ^S	<32 ^S	≥64 ^R	≥64 ^R
Estreptomicina	MIC	≥200 ^R	≥200 ^R	≥200 ^R	≥200 ^R	≤200 ^R	≤200 ^R
	TDD	8 ^R	8 ^R	10 ^R	8 ^R	10 ^R	10 ^R
Florfenicol	TDD	26 ^S	26 ^S	32 ^S	32 ^S	30 ^S	28 ^S
Gentamicina	TDD	16 ^S	16 ^S	20 ^S	20 ^S	22 ^S	20 ^S
Lincomicina	MIC	≥4 ^K	≥4 ^K	≥4 ^K	≥4 ^K	≥4 ^K	≥4 ^K
	TDD	0 ^R	0 ^R	0 ^R	0 ^R	0 ^R	0 ^R
Lincomicina-espectiomicina	MIC	≥8/32 ^K	≥8/32 ^K	≥8/32 ^K	≥8/32 ^K	≥8/32 ^K	≥8/32 ^K
Neomicina	MIC	10 ^R	10 ^R	<8 ^S	<8 ^S	≤8 ^S	≤8 ^S
Oxaciclina	MIC	≥2 ^K	≥2 ^K	≥2 ^K	≥2 ^K	≥2 ^K	≤2 ^K
Penicilina	MIC	≥2 ^R	≥2 ^R	≥2 ^R	≥2 ^R	≥2 ^R	≥2 ^R
Rifampicina	MIC	<50 ^S	≥50 ^R	<50 ^S	≥50 ^R	<50 ^S	<50 ^S
Tetraciclina	MIC	≤2 ^S	≤2 ^S	≤2 ^S	≤2 ^S	≤2 ^S	≤2 ^S
	TDD	30 ^S	30 ^S	30 ^S	28 ^S	30 ^S	30 ^S
Tiamulin	MIC	≥16 ^R	≥16 ^R	≥16 ^R	≥16 ^R	≥16 ^R	≥16 ^R
Tilmicosin	MIC	≥16 ^R	≥16 ^R	≥16 ^R	≥16 ^R	≥16 ^R	≥16 ^R
Trimetropina-sulfa	MIC	<0,5/9,5 ^S	<0,5/9,5 ^S	≥2/38 ^R	≥2/38 ^R	≥2/38 ^R	≥2/38 ^R

¹ MIC – teste da concentração inibitória mínima; TDD – teste de difusão em disco

EC = *Escherichia coli*; R = resistente, PS – Parcialmente sensível, S = sensível.

S = selvagem; M = tratada com substância mutagênica

(Continuação)

Cepas de <i>Escherichia coli</i> (cepas selvagens ou tratadas com concentrações crescentes de antibióticos)							
Antibióticos	Método ¹	EC 775 S	EC 775 R	EC 1299 S	EC 1299 R	EC 1696 S	EC 1696 R
Ácido Nalidíxico	TDD	24 ^S	24 ^S	20 ^S	20 ^S	28 ^S	0 ^R
Amoxiciclina	MIC	≥2 ^S	≥2 ^S	≥2 ^S	≥2 ^S	≥16 ^R	≥16 ^R
Ampicilina	TDD	20 ^S	20 ^S	18 ^S	18 ^S	20 ^S	18 ^S
Cloranfenicol	TDD	26 ^S	26 ^S	22 ^S	22 ^S	24 ^S	24 ^S
Ciprofloxacina	TDD	24 ^S	24 ^S	26 ^S	26 ^S	30 ^S	30 ^S
Colistina	MIC	≤2 ^S	≤2 ^S	≤2 ^S	≤2 ^S	≤2 ^S	≤2 ^S
Doxaciclina	MIC	<2 ^S	<2 ^S	<2 ^S	<2 ^S	<2 ^S	<2 ^S
	TDD	26 ^S	26 ^S	20 ^S	20 ^S	22 ^S	24 ^S
Enrofloxacin	MIC	<0,25 ^S	<0,25 ^S	<0,25 ^S	<0,25 ^S	<0,25 ^S	<0,25 ^S
	TDD	28 ^S	28 ^S	30 ^S	30 ^S	32 ^S	30 ^S
Eritromicina	MIC	≥4 ^R	≥4 ^R	≥4 ^R	≥4 ^R	≥4 ^R	≥4 ^R
	TDD	6 ^R	6 ^R	6 ^R	6 ^R	10 ^R	10 ^R
Espectiomicina	MIC	<32 ^S	<32 ^S	<32 ^S	<32 ^S	≥64 ^R	≥64 ^R
Estreptomicina	MIC	≥200 ^K	≥200 ^K	≥200 ^K	≥200 ^K	≥200 ^K	≥200 ^K
	TDD	8 ^S	20 ^R	18 ^R	18 ^R	18 ^R	18 ^R
Florfenicol	TDD	24 ^S	24 ^S	22 ^S	22 ^S	22 ^S	22 ^S
Gentamicina	TDD	16 ^S	16 ^S	20 ^S	20 ^S	24 ^S	24 ^S
Lincomicina	MIC	≥4 ^R	≥4 ^R	≥4 ^R	≥4 ^R	≥4 ^R	≥4 ^R
Lincomicina-espectiomicina	MIC	≤8/32 ^S	≤8/32 ^S	≥8/32 ^R	≥8/32 ^R	≥8/32 ^R	≥8/32 ^R
Neomicina	MIC	≥16 ^R	≥16 ^R	≥16 ^R	≥16 ^R	<8 ^S	≥16 ^R
Oxaciclina	MIC	≥2 ^K	≥2 ^K	≥2 ^K	≥2 ^K	≥2 ^K	≥2 ^K
Penicilina	MIC	≥2 ^R	≥2 ^R	≥2 ^R	≥2 ^R	≥2 ^R	≥2 ^R
Rifampicina	MIC	<50 ^S	≥50 ^R	<50 ^S	≥50 ^R	≥50 ^R	≥50 ^R
Tetraciclina	MIC	≤2 ^S	≤2 ^S	≤2 ^S	≤2 ^S	≤2 ^S	≤2 ^S
	TDD	28 ^S	28 ^S	26 ^S	26 ^S	26 ^S	26 ^S
Tiamulin	MIC	≥16 ^R	≥16 ^R	≥16 ^R	≥16 ^R	≥16 ^R	≥16 ^R
Tilmicosin	MIC	≥16 ^R	≥16 ^R	≥16 ^R	≥16 ^R	≥16 ^R	≥16 ^R
Trimetropina-sulfa	MIC	<0,5/9,5 ^S	<0,5/9,5 ^S	<0,5/9,5 ^S	<0,5/9,5 ^S	<0,5/9,5 ^S	<0,5/9,5 ^S

¹ TDM – teste de MIC; TDD – teste de difusão em disco

EC = *Escherichia coli*; R = resistente, PS – Parcialmente sensível, S = sensível.

S = selvagem; M = tratada com substância mutagênica

(Conclusão)

Cepas de *Escherichia coli* (cepas selvagens ou tratadas com concentrações crescentes de antibióticos)

Antibióticos	Método ¹	EC 1708 S	EC 1708 R	EC1869 S	EC 1869 R	EC 1889 S	EC 1889 R
Ácido Nalidíxico	TDD	28 ^S	28 ^S	20 ^S	20 ^S	30 ^S	30 ^S
Amoxiciclina	MIC	≤2 ^S	≤2 ^S	<2 ^S	<2 ^S	≥16 ^R	≥16 ^R
Ampicilina	TDD	28 ^S	30 ^S	8 ^R	8 ^R	8 ^R	8 ^R
Cloranfenicol	TDD	28 ^S	28 ^S	20 ^S	20 ^S	20 ^S	20 ^S
Ciprofloxacina	TDD	30 ^S	30 ^S	24 ^S	26 ^S	32 ^S	34 ^S
Colistina	MIC	≤2 ^S	≤2 ^S	≤2 ^S	≤2 ^S	≤2 ^S	≤2 ^S
Doxaciclina	MIC	≤4 ^{PS}	≤4 ^{PS}	<2 ^S	<2 ^S	≥8 ^R	≥8 ^R
	TDD	12 ^{PS}	12 ^{PS}	20 ^S	20 ^S	12 ^{PS}	12 ^{PS}
Enrofloxacin	MIC	≤0,25 ^S	≤0,25 ^S	<0,25 ^S	<0,25 ^S	<0,25 ^S	<0,25 ^S
	TDD	32 ^S	32 ^S	32 ^S	32 ^S	34 ^S	34 ^S
Eritromicina	MIC	≥4 ^R	≥4 ^R	≥4 ^R	≥4 ^R	≥4 ^R	≥4 ^R
	TDD	0 ^R	0 ^R	18 ^{PS}	18 ^{PS}	8 ^R	8 ^R
Espectomicina	MIC	≥64 ^R	≥64 ^R	≥64 ^R	≥64 ^R	≥64 ^R	≥64 ^R
Estreptomina	MIC	<200 ^S	≥200 ^R	<200 ^S	<200 ^S	<200 ^S	≥200 ^R
Florfenicol	TDD	30 ^S	30 ^S	30 ^S	30 ^S	28 ^S	28 ^S
Gentamicina	TDD	20 ^S	18 ^S	22 ^S	20 ^S	20 ^S	20 ^S
Lincomicina	MIC	≥4 ^R	≥4 ^R	≥4 ^R	≥4 ^R	≥4 ^R	≥4 ^R
	TDD	0 ^R	0 ^R	0 ^R	0 ^R	0 ^R	0 ^R
Lincomicina-espectomicina	MIC	≥8/32 ^R	≥8/32 ^R	<0,5/9,5 ^S	<0,5/9,5 ^S	≥8/32 ^R	≥8/32 ^R
Neomicina	MIC	<8 ^S	<8 ^S	<8 ^S	<8 ^S	<8 ^S	<8 ^S
Oxaciclina	MIC	≥2 ^R	≥2 ^R	≥2 ^R	≥2 ^R	≥2 ^R	≥2 ^R
Penicilina	MIC	≥2 ^R	≥2 ^R	≥2 ^R	≥2 ^R	≥2 ^R	≥2 ^R
Rifampicina	MIC	≥50 ^R	≥50 ^R	≤50 ^S	≥50 ^R	≥50 ^R	≥50 ^R
Tetraciclina	MIC	≥8 ^R	≥8 ^R	<2 ^S	<2 ^S	≥8 ^R	≥8 ^R
	TDD	0 ^R	0 ^R	28 ^S	28 ^S	0 ^R	0 ^R
Tiamulin	MIC	≥16 ^R	≥16 ^R	≥16 ^R	≥16 ^R	≥16 ^R	≥16 ^R
Tilmicosin	MIC	≥16 ^R	≥16 ^R	≥16 ^R	≥16 ^R	≥16 ^R	≥16 ^R
Trimetopina-sulfa	MIC	<0,5/9,5 ^S	<0,5/9,5 ^S	<0,5/9,5 ^S	<0,5/9,5 ^S	≤2/38 ^R	≤2/38 ^R

¹ TDM – teste de MIC; TDD – teste de difusão em disco; Números em negrito – mudança de sensibilidadeEC = *Escherichia coli*; R = resistente, PS – Parcialmente sensível, S = sensível.

S = selvagem; M = tratada com substância mutagênica

6.3 ANÁLISE POR PCR

Os resultados da amplificação dos genes de virulência por PCR, mostraram que todas as cepas foram negativas para *papC*, *cnf* e *afa*. Algumas cepas apresentaram alteração na detecção dos fragmentos gênicos analisados, uma vez que apresentaram reações negativas para alguns genes após a exposição à substância mutagênica.

A cepa EC 269 S apresentou reação positiva para *iuc*, *iss*, *tsh*, *cvi/cva*, *irp2*, *sfal* e *vat*, apresentando-se negativa para os genes *cvi/cva* e *sfal* após a exposição a substância mutagênica (EC 269 M). A cepa EC 1869 S apresentou-se positiva para *iuc*, *tsh*, *irp2*, *sfal* e *astA*, apresentando-se negativa para os genes *tsh*, *sfal* e *astA* após exposição a substância mutagênica (EC 1869 M). A cepa EC 1889 S apresentou-se positiva para *iuc*, *tsh*, *cvi/cva*, *irp2* e *astA*, apresentando-se negativa para *tsh* e *cvi/cva* após a exposição a substância mutagênica (EC 1889 M).

A cepa EC 341 S apresentou-se positiva para *iuc*, *iss*, *irp2* e *sfa*. A cepa 775 S apresentou-se positiva para *iss*, *tsh*, *iuc*, *irp2* e *vat*. Na cepa EC 1299 S os genes *iuc*, *iss*, *tsh* *irp2* e *sfa* foram detectados. Os genes para *iuc*, *tsh*, *cvi/cva* e *irp2* foram encontrados na cepa EC 713 S. A cepa EC 1696 S apresentou-se positiva para *iuc*, *iss* e *irp2* e a cepa EC 1708 S apresentou-se positiva para *iuc* e *irp2*. Nestas cepas não ocorreu nenhuma mudança na detecção de genes após a exposição à substância mutagênica. A tabela 2 apresenta estes resultados.

Tabela 2 - Resultados da amplificação dos genes de virulência por PCR, nas cepas selvagens ou tratadas com a substância mutagênica

Amostra	<i>pap C</i>	<i>iuc</i>	<i>iss</i>	<i>tsh</i>	<i>cvi/ cva</i>	<i>irp2</i>	<i>cnf</i>	<i>afa</i>	<i>sfa I</i>	<i>astA</i>	<i>vat</i>
EC 269 S	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+
EC 269 M	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+
EC 341 S	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-
EC 341 M	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-
EC 713 S	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-
EC 713 M	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-
EC 775 S	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+
EC 775 M	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+
EC 1299 S	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-
EC 1299 M	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-
EC 1696 S	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
EC 1696 M	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
EC 1708 S	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
EC 1708 M	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
EC 1869 S	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-
EC 1869 M	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
EC 1889 S	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-
EC 1889 M	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-

S = selvagem; M = com mutação

6.4 CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA POR AFLP

Com o objetivo de se caracterizar e discriminar as cepas selvagens ou tratadas com a substância mutagênica foi empregada a técnica de AFLP. A similaridade entre os padrões foi calculada através do coeficiente de Dice.

A análise das 18 amostras (selvagens ou tratadas com a substância mutagênica) revelou diferenças em algumas bandas. A figura 1 mostra estes resultados.

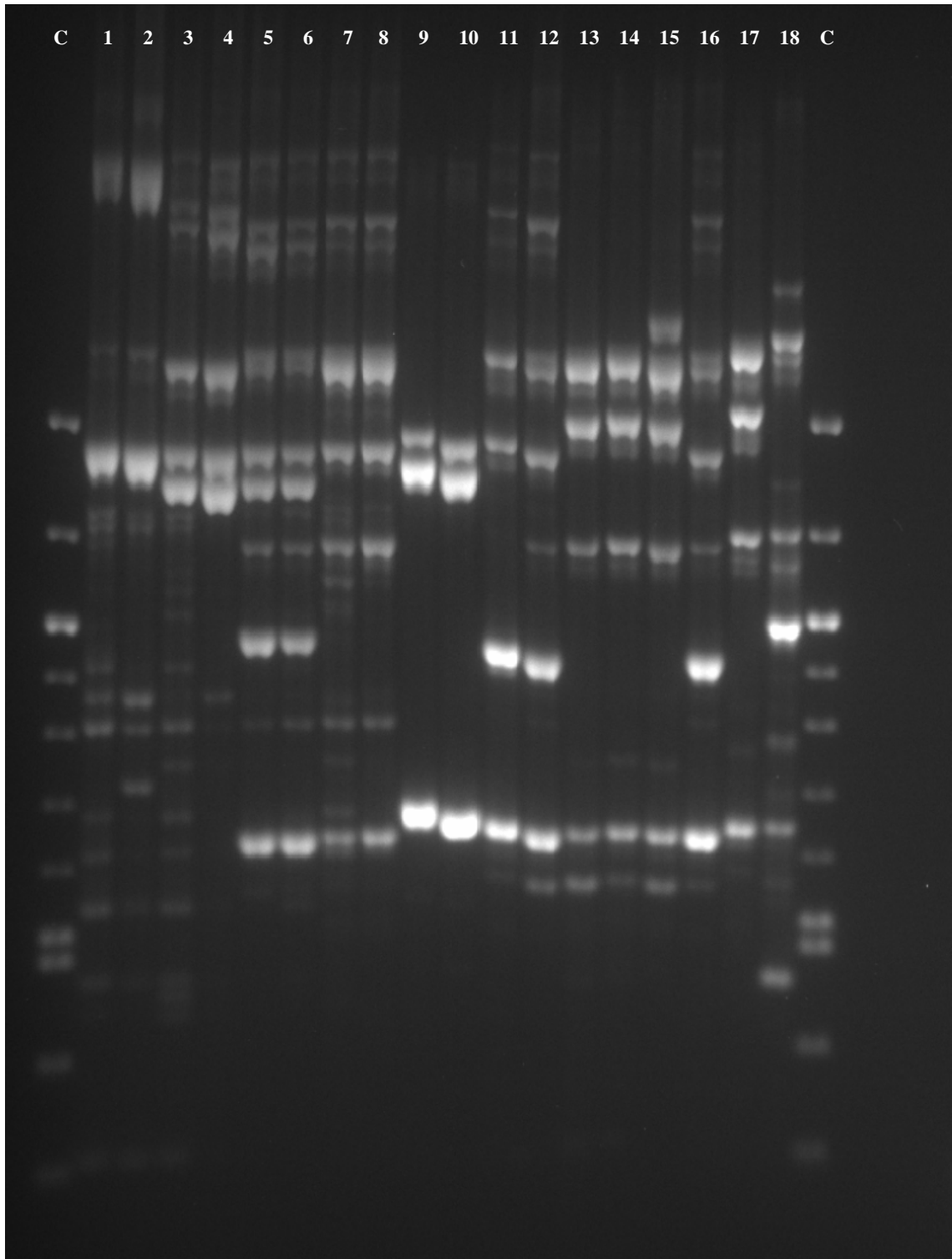
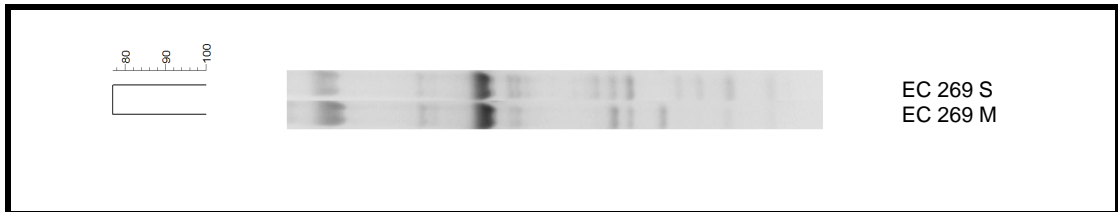


Figura 1 - Eletroforese em gel de agarose 1,5%. Perfis obtidos através do AFLP em cepas de *E.coli* selvagens ou tratadas com a substância mutagênica. C – marcador de pares de base 100 pb DNA *Ladder* (LGC)

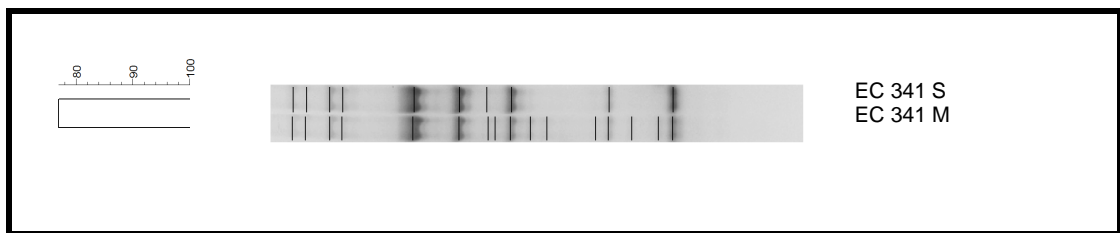
A cepa EC 269 S comparada a EC 269 M revelou 76,9% de similaridade pela ausência de algumas bandas. Estes resultados se encontram na figura 2.

Figura 2 - Comparação de bandas entre as cepas EC 269 S e EC 269 M



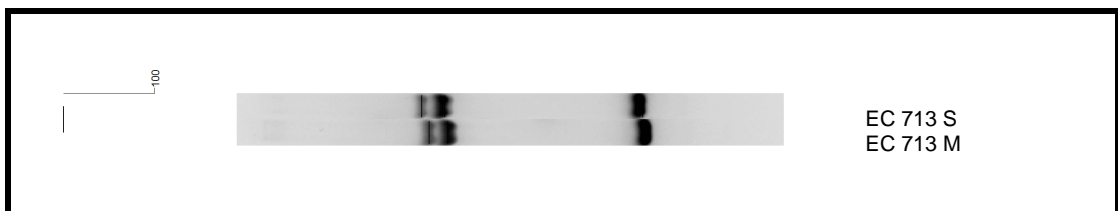
A cepa EC 341 S comparada a EC 341 M revelou 76,9 % de similaridade pela ausência de algumas bandas. A figura 3 apresenta estes resultados.

Figura 3 - Comparação de bandas entre as cepas EC 341 S e EC 341 M



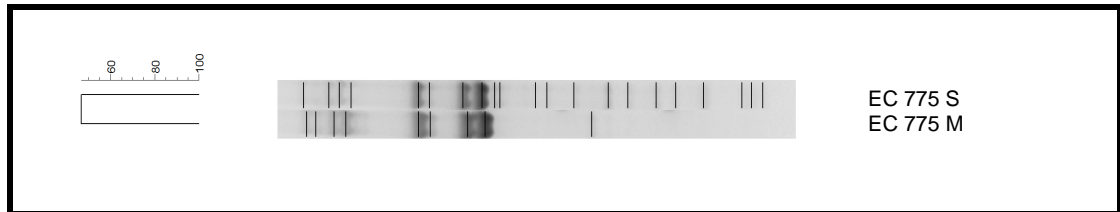
A cepa EC 713 S comparada a EC 713 M revelou 100,0 % de similaridade. Estes resultados se encontram na figura 4.

Figura 4 - Comparação de bandas entre as cepas EC 713 S e EC 713 M



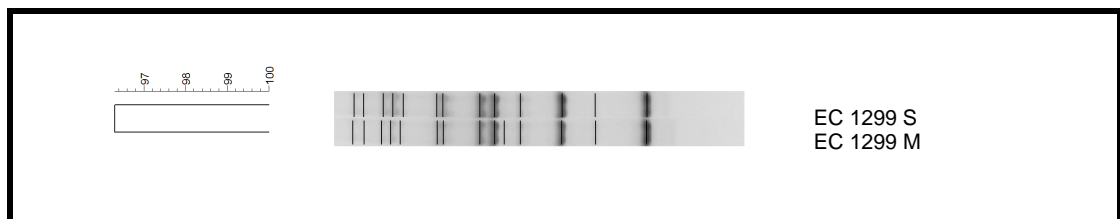
A cepa EC 775 S comparada a EC 775 M revelou 46,6% de similaridade pela ausência de algumas bandas. A figura 5 apresenta estes resultados.

Figura 5 - Comparação de bandas entre as cepas EC 775 S e EC 775 M



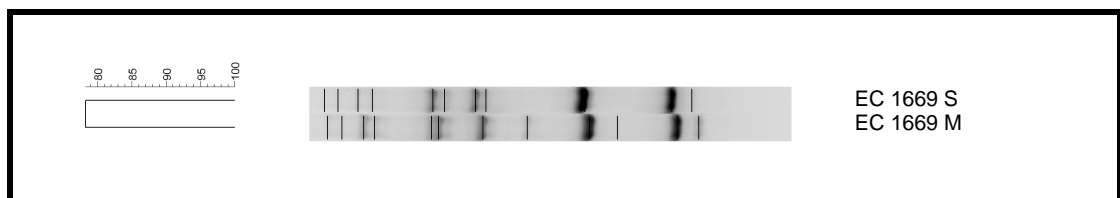
A cepa EC 1299 S comparada a EC 1299 M revelou 96,3% de similaridade pela ausência de algumas bandas. Estes resultados se encontram na figura 6.

Figura 6 - Comparação de bandas entre as cepas EC 1299 S e EC 1299 M



A cepa EC 1669 S comparada a EC 1669 M revelou 78,2 % de similaridade pela ausência de algumas bandas. A figura 7 apresenta estes resultados.

Figura 7 - Comparação de bandas entre as cepas EC 1669 S e EC 1669 M



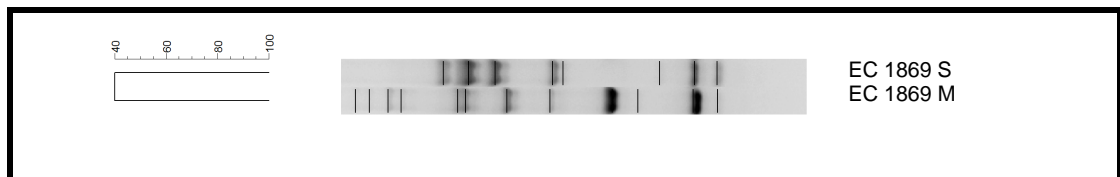
A cepa EC 1708 S comparada a EC 1708 M revelou 94 % de similaridade pela ausência de algumas bandas. Estes resultados se encontram na figura 8.

Figura 8 - Comparação de bandas entre as cepas EC 1708 S e EC 1708 M



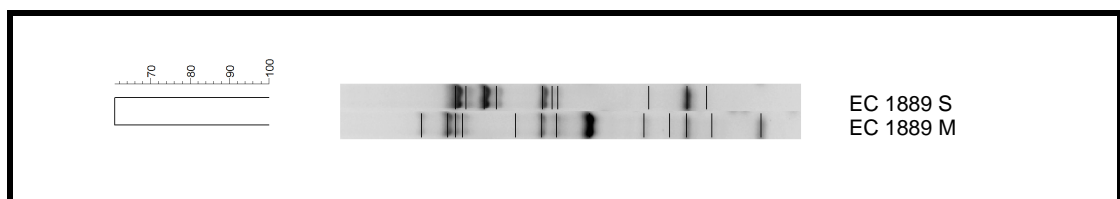
A cepa EC 1869 S comparada a EC 1869 M revelou 40 % de similaridade pela ausência de algumas bandas. A figura 9 apresenta estes resultados.

Figura 9 - Comparação de bandas entre as cepas EC 1869 S e EC 1869 M



A cepa EC 1889 S comparada a EC 1889 M revelou 60,8 % de similaridade pela ausência de algumas bandas. Estes resultados se encontram na figura 10.

Figura 10 - Comparação de bandas entre as cepas EC 1889 S e EC 1889 M



6.5 AVALIAÇÃO DE CEPAS SELVAGENS OU TRATADAS COM A SUBSTÂNCIA MUTAGÊNICA EM PINTINHOS DE UM DIA DE IDADE

O controle ambiental para *E. coli* demonstrou a ausência da bactéria na água, bebedouros, ração, balança, comedouros, papéis para forração, maravalha e equipamentos.

As cepas foram avaliadas em função da mortalidade, patogenicidade e escore de lesões apresentados pelas aves e os resultados obtidos organizados em tabelas e gráficos para uma melhor compreensão.

6.5.1 Mortalidade

Após a inoculação das bactérias selvagens ocorreram mortes nos grupos de pintinhos inoculados durante os 10 dias de observação. Alguns grupos inoculados com as cepas bacterianas apresentaram modificações na patogenicidade quando comparadas com as cepas selvagens.

No grupo T3 (inoculado com a cepa EC 341 S), ocorreu a maior mortalidade, com 10 pintinhos mortos nas primeiras 24 horas, sendo classificada como uma cepa de alta patogenicidade. A cepa correspondente com mutação causou a morte de oito (08) pintinhos, sendo a sua patogenicidade classificada como intermediária.

A patogenicidade da cepa EC 269 S (grupo T1) e da EC 713 S (grupo T5) foram classificadas como intermediária. Após o tratamento com a substância mutagênica estas cepas passaram a apresentar baixa patogenicidade. As cepas com mutação EC 775 M (grupo T8) e EC 1869 M (grupo T16) foram classificadas como não patogênica, enquanto as cepas selvagens correspondentes apresentaram baixa patogenicidade.

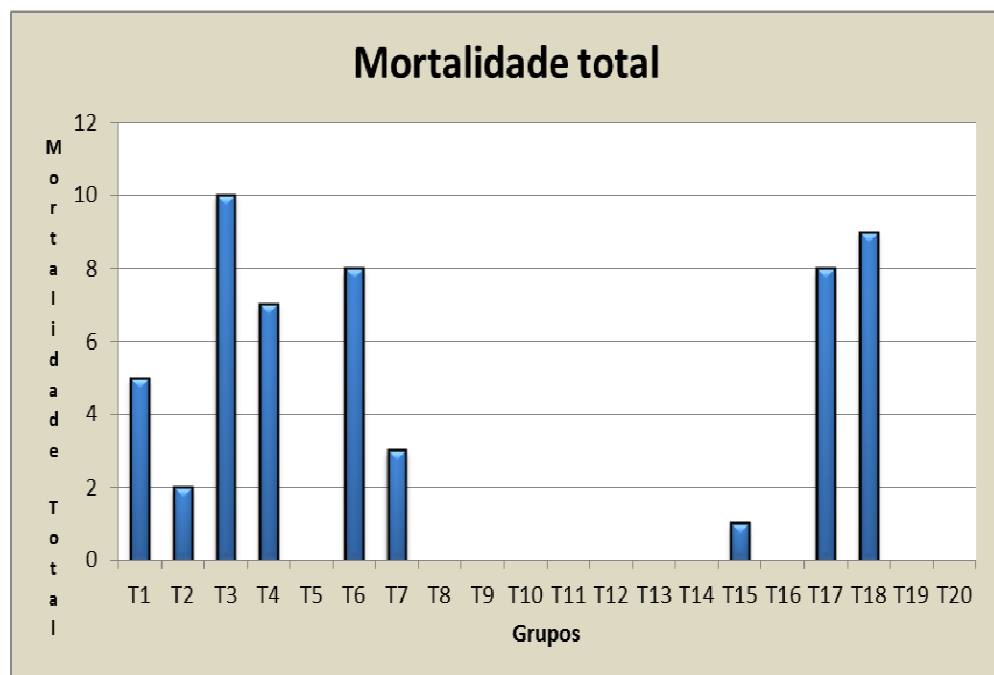
Os dados estão expostos na tabela 3 e ilustrados na figura 11.

As diferenças entre mortalidade dos pintinhos dos diferentes grupos não foram significativas nas comparações entre as cepas selvagens e suas respectivas cepas com mutação ($p \leq 0,05$).

Tabela 3 - Mortalidade de pintinhos *SPF* inoculados com cepas de *E. coli* selvagens ou com mutações, nos 10 dias de observação e a classificação de patogenicidade

Grupo	Cepa	n	Dias										Total	Patogenicidade
			01	02	03	04	05	06	07	08	09	10		
T1	EC 269 S	10	3	1	1	0	0	0	0	0	0	0	5	Intermediária
T2	EC 269 M	10	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	2	Baixa
T3	EC 341 S	10	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	Alta
T4	EC 341 M	10	5	0	1	0	0	1	0	1	0	0	8	Intermediária
T5	EC 713 S	10	7	0	1	0	0	0	0	0	0	0	8	Intermediária
T6	EC 713 M	10	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	Baixa
T7	EC 775 S	10	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	3	Baixa
T8	EC 775 M	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Não patogênica
T9	EC 1299 S	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Não patogênica
T10	EC 1299 M	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Não patogênica
T11	EC 1669 S	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Não patogênica
T12	EC 1669 M	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Não patogênica
T13	EC 1708 S	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Não patogênica
T14	EC 1708 M	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Não patogênica
T15	EC 1869 S	10	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	Baixa
T16	EC 1889 M	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Não patogênica
T17	EC 1889 S	10	7	0	1	0	0	0	0	0	0	0	8	Intermediária
T18	EC 1889 M	10	7	2	0	0	0	0	0	0	0	0	9	Alta
T19	C1	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-
T20	C2	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-

Figura 11 - Mortalidade total de pintinhos *SPF* inoculados com as cepas de *E. coli* selvagens ou com mutações, nos 10 dias de observação



6.5.2 Escore de lesões

O escore de lesões causadas pelas *E. coli* selvagens ou com mutações foi avaliado após 10 dias da inoculação.

As aves apresentaram lesões principalmente em sacos aéreos torácicos direitos (local da inoculação). Em alguns grupos observaram-se lesões em sacos aéreos torácicos esquerdos e número muito reduzido de lesões em sacos aéreos abdominais. Pericardite foi observada em poucas aves. Nenhuma ave apresentou perihepatite.

Os dados estão expostos na tabela 4 e 5 e ilustrados na figura 12.

Tabela 4 – Número de pintinhos com lesão provocada por cepas selvagens de *E. coli* ou tratadas com a substância mutagênica, após 10 dias da inoculação

Cepa	n	Cepa	Aerossaculite (Saco torácico direito)	Aerossaculite (Saco torácico esquerdo)	Aerossaculite (saco abdominal)	Pericardite	Perihepatite
T1	5	EC 269 S	4	2	0	0	0
T2	8	EC 269 M	5	1	0	0	0
T3	0	EC 341 S	0	0	0	0	0
T4	2	EC 341 M	3	3	1	0	0
T5	2	EC 713 S	2	2	0	1	0
T6	9	EC 713 M	3	0	0	0	0
T7	7	EC 775 S	7	2	2	2	0
T8	10	EC 775 M	9	0	1	0	0
T9	10	EC 1299 S	10	7	2	0	0
T10	10	EC 1299 M	3	0	0	0	0
T11	10	EC 1669 S	6	4	0	0	0
T12	10	EC 1669 M	6	2	0	0	0
T13	10	EC 1708 S	9	5	2	0	0
T14	10	EC 1708 M	4	1	0	0	0
T15	9	EC 1869 S	9	2	0	0	0
T16	10	EC 1869 M	4	0	0	0	0
T17	2	EC 1889 S	2	2	0	2	0
T18	1	EC 1889 M	1	1	0	0	0
T19	10	C1	0	0	0	0	0
T20	10	C2	0	0	0	0	0

Figura 12 - Número de aves com lesões, após 10 dias da inoculação de cepas de *E. coli* selvagens ou com mutações

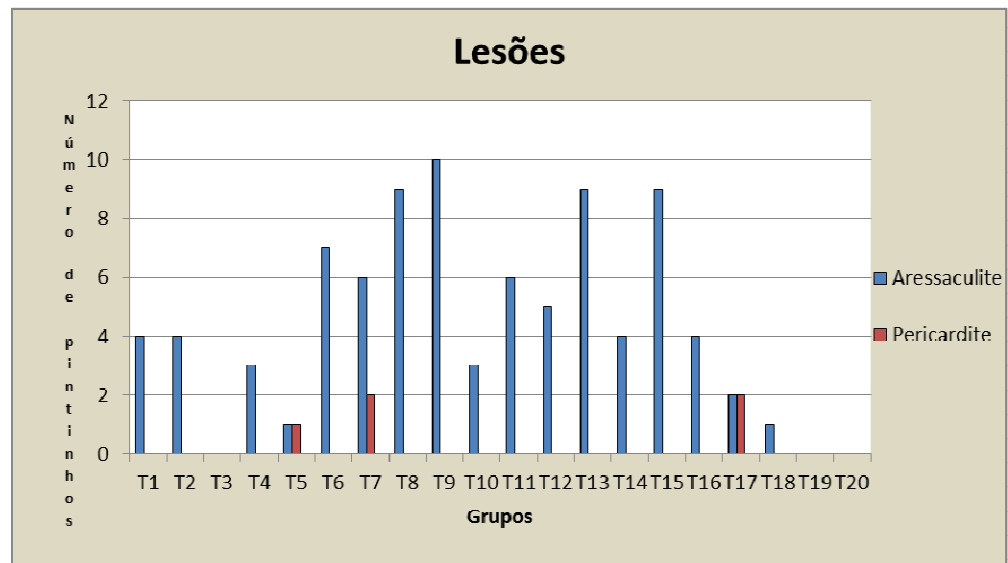


Tabela 5 – Escore de lesões em sacos aéreos de aves inoculadas com cepas de *E. coli* classificadas em um escore de 0 a 4

Grupo	Cepa	n	Saco aéreo torácico direito				Saco aéreo torácico esquerdo				Saco aéreo abdominal						
			0	1	2	3	4	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
T1	EC 269 S	5	1	2	1	1	0	3	2	0	0	0	5	0	0	0	0
T2	EC 269 M	8	3	3	1	1	0	7	1	0	0	0	8	0	0	0	0
T3	EC 341 S	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T4	EC 341 M	2	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0
T5	EC 713 S	2	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
T6	EC 713 M	9	2	5	2	0	0	9	0	0	0	0	9	0	0	0	0
T7	EC 775 S	7	0	1	1	2	3	5	1	1	0	0	5	1	1	0	0
T8	EC 775 M	10	1	6	3	0	0	10	0	0	0	0	9	1	0	0	0
T9	EC 1299 S	10	0	4	5	1	0	6	2	2	0	0	8	2	0	0	0
T10	EC 1299 M	10	7	2	1	0	0	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0
T11	EC 1669 S	10	4	4	2	0	0	6	4	0	0	0	10	0	0	0	0
T12	EC 1669 M	10	4	4	1	1	0	8	2	0	0	0	10	0	0	0	0
T13	EC 1708 S	10	1	5	2	2	0	5	2	2	1	0	8	2	0	0	0
T14	EC 1708 M	10	6	4	0	0	0	9	1	0	0	0	10	0	0	0	0
T15	EC 1869 S	9	0	7	2	0	0	7	2	0	0	0	10	0	0	0	0
T16	EC 1869 M	10	6	4	0	0	0	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0
T17	EC 1889 S	2	0	1	1	0	0	2	0	0	0	0	2	0	0	0	0
T18	EC 1889 M	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
T19	C1	10	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0
T20	C2	10	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0

Ocorreram diferenças significativas em relação ao escore de lesões na comparação entre os grupos T5 (EC 713 S) e T6 (EC 713 M), T9 (EC 1299 S) e T10 (EC 1299 M), T13 (EC 1708 S) e T14 (EC 1708 M) e T15 (EC 1869 S) e T16 (EC 1869 M) ($p \leq 0,05$). Os dados estão expostos na tabela 6.

Tabela 6 – Escore de lesões em coração inoculadas com cepas de *E. coli* classificadas em um escore de 0 a 4

Grupo	Cepa	N	Pericardite				
			0	1	2	3	4
T1	EC 269 S	5	5	0	0	0	0
T2	EC 269 M	8	8	0	0	0	0
T3	EC 341 S	0	0	0	0	0	0
T4	EC 341 M	2	1	1	0	0	0
T5	EC 713 S	2	2	0	0	0	0
T6	EC 713 M	9	7	2	0	0	0
T7	EC 775 S	7	7	0	0	0	0
T8	EC 775 M	10	10	0	0	0	0
T9	EC 1299 S	10	10	0	0	0	0
T10	EC 1299 M	10	10	0	0	0	0
T11	EC 1669 S	10	10	0	0	0	0
T12	EC 1669 M	10	10	0	0	0	0
T13	EC 1708 S	10	10	0	0	0	0
T14	EC 1708 M	10	10	0	0	0	0
T15	EC 1869 S	9	9	0	0	0	0
T16	EC 1869 M	10	8	0	1	0	1
T17	EC 1889 S	2	2	0	0	0	0
T18	EC 1889 M	1	1	0	0	0	0
T19	C1	10	10	0	0	0	0
T20	C2	10	10	0	0	0	0

Tabela 7 – Diferenças entre cepas selvagens ou com mutações em relação aos fatores de virulência, a similaridade em AFLP, a patogenicidade, a mortalidade e ao escore de lesões

Grupo	Cepa	Diferenças				
		Fatores de virulência	Similaridade em AFLP	Patogenicidade	Mortalidade	Escore de lesões
T1	EC 269 S	cvi/cva e sfal	76,9%	Intermediária	-	-
T2	EC 269 M			Baixa	-	
T3	EC 341 S	-	76,9 %	Alta	-	-
T4	EC 341 M			Intermediária	-	
T5	EC 713 S	-	100,0 %	Intermediária	-	+
T6	EC 713 M			Baixa	-	
T7	EC 775 S	-	46,6%	Não patogênica	-	-
T8	EC 775 M			Não patogênica	-	
T9	EC 1299 S	-	96,3%	Não patogênica	-	+
T10	EC 1299 M			Não patogênica	-	
T11	EC 1669 S	-	78,2 %	Não patogênica	-	-
T12	EC 1669 M			Não patogênica	-	
T13	EC 1708 S	-	94 %	Não patogênica	-	+
T14	EC 1708 M			Não patogênica	-	
T15	EC 1869 S	tsh, sfal e astA	40 %	Baixa	-	+
T16	EC 1869 M			Não patogênica	-	
T17	EC 1889 S	tsh e cvi/cva	60,8 %	Intermediária	-	-
T18	EC 1889 M			Alta	-	

(+) = diferença significativa (p<0,05), (-) = não ocorrência de diferença significativa (p<0,05)

7 DISCUSSÃO

A colibacilose aviária é a principal doença secundária em aves e pode se manifestar nas condições modernas de criação, com alta densidade e níveis de estresse, tornando-se uma das maiores causas de mortalidade e prejuízos na avicultura, no mundo (GIMENO, 2009; ANDREATTI FILHO, 2007).

A correção do manejo e a inserção de medidas de biossegurança efetivas devem ser prioritárias para o sucesso desta criação animal, uma vez que a restrição ao uso de agentes antimicrobianos como promotores de crescimento é cada vez maior. Neste contexto, a vacinação e decorrente proteção contra a doença surgem como uma alternativa para diminuir os prejuízos que podem ser gerados (FERREIRA; KNÖBL, 2009).

O desenvolvimento de vacinas vivas que protejam os animais sem ocasionar reações adversas é considerada a melhor alternativa para o êxito na criação de aves. O presente estudo selecionou cepas de *E. coli* aviária para a atenuação de sua patogenicidade por mutação induzida por substância química.

E. coli é uma espécie bacteriana bastante versátil, com alto grau de plasticidade genômica, através da perda ou ganho de genes, induzindo a aquisição de resistência a inúmeros antimicrobianos (RASKO et al., 2008). A capacidade de bactérias adquirirem e transferirem genes de resistência a outras bactérias é extremamente grande (CYRIL, 2006).

Bactérias com mutações podem ser candidatas a vacinas vivas para serem usadas na avicultura industrial, principalmente, em frangos de corte, pois pode ocorrer diminuição de sua virulência e preservação de sua imunogenicidade (LYNNE et al., 2012; NAGANO; KITAHARA; NAGAI, 2012)

A caracterização das cepas selecionadas neste estudo em relação a antimicrobianos encontrou resistência a vários destes medicamentos. Os resultados obtidos de resistência a lincomicina e penicilina e a suscetibilidade a enrofloxacina e ciprofloxacina foram semelhantes aos encontrados por Gomis et al. (2001), em *E. coli* isoladas de frangos de corte, no Canadá, que encontraram 100% de resistência a lincomicina e penicilina, e 31,2% a neomicina e nenhuma resistência para a enrofloxacina e ciprofloxacina.

Estudo realizado no Brasil, por Zanata et al. (2004), classificou 93% das amostras de *E. coli* isoladas de aves, no Laboratório de Descalvado-SP, como multirresistentes. Estes verificaram que a tetraciclina foi a droga com maior resistência (76%) e as de maior eficiência: o cloranfenicol, a ciprofloxacina, a enrofloxacina, o florfenicol e a gentamicina. Estes resultados não estão de acordo com os resultados deste estudo, que encontrou 22,22% de resistência a tetraciclina e a fosfomicina como o medicamento de maior eficiência.

Os resultados encontrados na literatura com respeito à suscetibilidade a antibióticos em bactérias isoladas de aves de produção são bastante divergentes, e isto se relaciona com a liberação de uso dos mesmos nos diversos países, e a consequente utilização desses em granjas como tratamento e principalmente como promotores de crescimento (BUTAYE; DEVRIESE; HAESEBROUK, 2003, TURNIDGE, 2004).

A opção por indução de resistência a rifampicina como marcador ocorreu em função desta não ser utilizada em aves comerciais e a possibilidade de rapidez neste processo, já demonstrado desde 1946 com o uso deste antibiótico para o tratamento de *Mycobacterium tuberculosis* e a aquisição rápida de resistência (CROFTON; MITCHISON, 1948). A rifampicina liga-se à subunidade β da RNA polimerase, codificada pelo gene *rpoB*, inibindo a etapa de transcrição. A elevada resistência a este fármaco é com frequência devido a mutações pontuais no gene *rpsL*, com as mutações mais comuns no codon K43 e K88 (SREEVATSAN et al., 1996).

Outro antibiótico selecionado para a indução de resistência foi a estreptomicina que inibe a tradução do RNA mensageiro (mRNA), afetando a eficiência desta tradução (GARVIN; BISWAS; GORINI, 1974). A resistência ocorre por mutações no alvo do fármaco, mais especificamente nos ribossomos, sendo o principal sítio de mutação o gene *rpsL*, que codifica uma proteína ribossomal onde ocorrem mutações resultando na substituição de um único aminoácido. Um segundo mecanismo da resistência ocorre por alterações no gene que codifica o RNA 16S (*rrs*) em duas regiões diferentes e um terceiro mecanismo de resistênciat pode estar relacionado a trocas na entrada do fármaco para o interior da célula bacteriana (COOKSEY et al., 1996).

Na impossibilidade de indução de resistência aos dois antibióticos citados acima se optou pela indução de resistência com o ácido nalidíxico na cepa EC 1669 S. Únicas mutações pontuais em regiões do DNA determinantes de resistência a

quinolonas, nas subunidades do gene *gyrA*, no códon 83 e 87 foram atribuídas aos altos níveis de resistências a este antibiótico (HOPKINS; ARNOLD; THREFALL, 2007).

As cepas selecionadas neste estudo eram na sua maioria dos sorogrupos O2, O78 e O119, pois foram isolados de surtos de colibacilose, nas granjas e incubatórios e são associadas a vários fatores de virulência (VIDOTTO et al., 1990; DHO-MOULIN; FAIRBROTHER, 1999; MENÃO et al., 2002).

Apesar de existirem estudos, os mecanismos exatos de virulência utilizados por este micro-organismo, nas aves, ainda não foram totalmente elucidados. Embora a expressão de diversos fatores de virulência por *E. coli* possam afetar os processos celulares e resultar em diferentes manifestações clínicas nas aves (EWERS et al., 2004; DZIVA; STEVENS, 2008; TUNTUFYE et al., 2012), ainda não foram associados fatores de virulência que possam ser fundamentais para a virulência de cepas de APEC (DHO-MOULI; FAIRBROTHER, 1999, HORNE et al., 2000; JANBEN et al., 2001).

Todas as cepas selvagens testadas foram positivas para o gene *iuc* e *irp2*, cinco delas para os genes *iss*, seis para *tsh* e três para *cvi/cva*, sendo estes normalmente associados a APEC (DZIVA; STEVENS, 2008; DELICATO et al., 2002).

A resistência ao sistema complemento pode ter um papel importante na virulência de APEC, pois o gene *iss* foi associado com a resistência ao sistema complemento por amostras de *E. coli*, o qual foi detectado significativamente de APEC do que de *E. coli* isolada de aves saudáveis (IKE et al., 1992, NOLAN; WOOLEY; COOPER, 2002, NOLAN et al., 2003, RODRIGUEZ-SIEK et al., 2005).

PFAFF-McDONOUGH et al. (2000) encontraram o gene *iss* em 78,7% de em cepas de aves com colibacilose, enquanto este gene foi detectado em 16% de cepas isoladas de aves saudáveis e Delicato et al. (2002) encontraram 27,5% em aves com colibacilose.

Os resultados encontrados neste estudo coincidem com aqueles de Yaguchi et al. (2007) que pesquisaram os fatores de virulência em cepas de *E. coli* aviária isoladas no Japão. Os sorogrupos O1, O2, e O78 foram detectados em 56 de 125 cepas (44,8%) isoladas de frangos doentes contra 13 em 100 (13%) cepas isoladas de aves sadias e identificaram que os genes *iss*, *iutA* e *tsh* estavam amplamente distribuídos nas amostras patogênicas.

O gene *tsh* foi detectado em cepas de *E. coli* isoladas de aves com colibacilose, sendo que Delicato et al. (2002) encontraram este gene em 39,5% das amostras isoladas no Brasil. Johnson et al. (2008) analisaram 994 amostras de *E. coli* isoladas de aves com relação aos fatores de virulência e identificaram os genes *iutA*, *hlyF*, *iss*, *iroN* e *ompT* como os mais associados com APEC altamente patogênica.

Circella et al. (2012) isolaram *E. coli* de lesões de aves com colibacilose e de conteúdo fecal de aves saudáveis. A presença de genes de virulência, com exceção de *astA* foi associada mais frequentemente com cepas de APEC. Os genes *cva/cvi*, *tsh*, *irp2*, e *iucD* foram mais relatados em isolados de colibacilose.

Neste estudo, ocorreram alterações na detecção de fragmentos gênicos analisados, uma vez que apresentaram reações negativas para alguns genes após a exposição à substância mutagênica, sugerindo que possa ter ocorrido perda de sequência de nucleotídeos, troca ou inserção destes.

Três das cepas estudadas apresentaram modificações em genes de virulência. A cepa EC 269 após a exposição à substância mutagênica não apresentou os genes *cvi/cva* e *sfal* e ausência de bandas no teste de AFLP, existindo 76,9% de similaridade à cepa selvagem. Os resultados encontrados no teste de patogenicidade em pintinhos de um dia, apontou mudança em sua patogenicidade, ou seja, de intermediária para baixa patogenicidade, entretanto não houve diferença significativa no escore de lesões.

A cepa EC 1869 não apresentou os genes *tsh*, *sfal* e *astA* após a exposição à substância mutagênica. Houve uma grande modificação na detecção de bandas no teste de AFLP, ocorrendo apenas 40% de similaridade com a cepa selvagem. Também ocorreu mudança de patogenicidade, uma vez que esta cepa se apresentou não patogênica e apresentou diferenças significativas no escore de lesões.

A cepa EC 1889 não apresentou os genes *tsh* e *cvi/cva* após a exposição à substância mutagênica. A similaridade entre as cepas antes e após a exposição à substância mutagênica foi de 60,8%, entretanto, não houve diferença em patogenicidade, sendo ambas classificadas como não patogênicas e sem diferença significativa no escore de lesões. Estes resultados sugerem que as modificações genéticas sofridas por esta cepa possam ter ocorrido em segmentos gênicos que não estão envolvidos na patogenicidade.

Considerando a ausência de genes de virulência e o escore de lesão encontrado nas cepas estudadas é possível sugerir que o gene *astA* tenha importância na atenuação da patogenicidade de *E. coli* aviária, uma vez que ocorreu uma diminuição de patogenicidade com as amostras EC 269 M e EC 1869 M e escore de lesão menor com as amostras EC 713 M e EC 1299 M que apresentam ausência deste gene.

A maioria dos estudos de fatores de virulência em APEC envolvem genes que codificam as adesinas, o sistema de aquisição de ferro, as hemolisinas e os fatores envolvendo a resistência ao soro (EDELMAN et al., 2003; KOSTAKIOTI; STATHOPOULOS, 2004). Entretanto, a interação entre uma bactéria e células eucarióticas depende também de outros fatores, como a presença de citocinas e de toxinas (ANTAO; WIELER, EWERS, 2003).

O sistema de secreção tipo VI também foi associado com a patogenicidade de APEC. Mutantes com genes deletados deste sistema demonstraram diminuição nos processos de adesão e invasão de células e virulência atenuada em experimentos *in vivo* (PACE et al., 2010).

No teste de AFLP utilizou-se somente uma enzima de restrição, o que possivelmente pode explicar a ausência de alterações de bandas na cepa EC 713, embora tenha ocorrido alteração na patogenicidade e escore de lesões. Nesta cepa pode ter ocorrido modificações genéticas que possibilitaram a atenuação de sua patogenicidade, apesar de não ter ocorrido alterações nos genes de virulência estudados.

Os pintinhos *SPF* utilizados no teste de patogenicidade são sensíveis a *E. coli*, entretanto algumas cepas selecionadas como patogênicas não foram assim classificadas. Isto pode ser atribuído à perda de plasmídeo no armazenamento destas cepas e consequente alteração do resultado de patogenicidade.

A atenuação induzida por mutação pode representar uma opção para o desenvolvimento dessas vacinas atenuadas. Peighmbari et al. (2002) testaram duas vacinas elaboradas com cepas de *E. coli* com mutações, dos sorogrupos O2 e O78, em frangos de corte e concluíram que as aves vacinadas com o sorogrupo O2 apresentaram diferença significativa na redução de lesões em sacos aéreos quando comparadas as aves do grupo controle.

Kwaga et al. (1994) testaram uma cepa de *E. coli* do sorogrupo O2, com mutação no gene *carAB*, por via oral, em perus de quatro semanas de idade e concluíram que as aves foram completamente protegidas da infecção após o desafio com a cepa homóloga.

A grande maioria das vacinas contra a colibacilose aviária disponíveis no mercado são inativadas com adjuvante oleoso o que inviabiliza a sua utilização em frango de corte. Vacinas vivas com cepas atenuadas são consideradas alternativas atraentes para a vacinação de aves, pois o tratamento da colibacilose aviária passou a ser dificultado nos últimos anos devido à maioria das amostras de *E. coli* presentes no campo apresentarem resistência a inúmeros antibióticos, provocada pelo extensivo uso de agentes antimicrobianos como promotores de crescimento por via água de bebida ou ração e também utilizados como terapêutica (BYWALTER, 2005).

Outras vantagens para a utilização de vacinas vivas são o custo mais baixo, a possível utilização de vacinação por via aerossol ou água de bebida. Entretanto, o processo de atenuação destas cepas não é rápido e simples, por isso diferentes métodos foram utilizados como a indução de modificações genéticas e consequente atenuação da bactéria (PEIGHAMBARI et al., 2002; REVOLLEDO; FERREIRA, 2010; AMOAKO et al., 2004).

Lynne et al. (2006) desenvolveram uma vacina contra a colibacilose aviária com os sorotipos O2 e O78, com a proteína recombinante *iss* e encontraram que as aves desenvolveram títulos de anticorpos após a vacinação. As aves vacinadas tiveram lesões menores após o desafio com as cepas homólogas quando comparadas as aves não vacinadas.

Amoako et al. (2004) desenvolveram uma vacina viva atenuada de *E. coli* para administração por via oral ou aerossol. Esta possui cepas que apresentaram mutações espontâneas e dependentes de estreptomicina (*str*-dependentes), geradas a partir de cepas virulentas com mutação na região *fur* do cromossomo bacteriano. Após a vacinação das aves e desafio com as cepas homólogas a vacina só produziu proteção significativa quando foram administradas três doses, com um, 14 e 28 dias de idade.

O teste de patogenicidade realizado neste estudo mostrou que cinco cepas analisadas modificaram a patogenicidade após a exposição à substância mutagênica, ocorrendo redução na patogenicidade e indicando uma atenuação da virulência pela substância mutagênica utilizada. Ocorreu uma exceção, a cepa EC

1889 foi classificada inicialmente como apresentando patogenicidade intermediária e após a exposição à substância química foi definida como de alta patogenicidade. Como esta classificação se baseia no número de pintinhos mortos, em dez dias de observação e a alteração de classificação foi devido à morte de apenas uma ave, a realização de outros experimentos, com este objetivo devem ser realizados para a comprovação deste resultado.

Em duas cepas analisadas ocorreu atenuação da patogenicidade a pintinhos e redução no escore de lesão após a exposição à substância mutagênica. Desta forma, estas apresentam um potencial para o desenvolvimento de vacinas para aves.

CONCLUSÕES

8 CONCLUSÕES

- A substância mutagênica não alterou a suscetibilidade das nove cepas que apresentavam um perfil de multirresistência.
- Os antimicrobianos utilizados como marcadores genéticos foram eficientes na indução de resistência nas cepas de *E. coli* selecionadas.
- A substância mutagênica utilizada alterou o perfil de genes de virulência em três cepas de *E. coli* estudadas.
- O perfil de bandas no AFLP se modificou em oito cepas, após a exposição à substância mutagênica.
- A exposição à substância mutagênica foi eficiente na diminuição da patogenicidade a pintinhos em quatro cepas analisadas.
- Ocorreu atenuação na patogenicidade a pintinhos com as cepas EC 713 M e EC 1869 M, pela redução da patogenicidade e escore de lesões, e estas apresentam potencial de serem usadas na produção de vacinas.

REFERÊNCIAS

- ABDUL-AZIZ, T. A.; EL-SUKHON, S. N. Chickens hyperimmunized with *Escherichia coli* J5 strain are protected against experimental challenge with *Escherichia coli* O78 serotype. **Veterinary Research Communications**, v. 22, 7-9, 1998.
- AMOAKO, K. K.; PRYSLIAK, A. A.; POTTER, A. A.; COLLINSON, S. K.; KAY, W. W.; ALLAN, B. J. Attenuation of an avian pathogenic *Escherichia coli* strain due to mutation in the *rpsL* gene. **Avian Diseases**, v. 48, p. 19-25, 2004.
- ANDREATTI FILHO, R. L. **Saúde aviária e doenças**. São Paulo: Roca, 2007. 314 p.
- ANTÃO, E. M.; WIELER, I. H.; EWERS, C. Adhesive threads of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. **Gut Pathologens**, v. 1, p.1-22, 2009.
- APINCO. **Associação dos produtores de pintos de corte**. Disponível em: <www.facta.org.br>. Acesso em 12 de nov. de 2012.
- ARAUJO, J. A.; SILVA, J. H. V.; AMÂNCIO, A. L. L.; LIMA, M. R.; LIMA, C. B. Uso de aditivos na alimentação de aves. **Acta Veterinária Brasileira**, v. 1, p. 69-77, 2007.
- ARP, L. H.; JENSEN, A. E. Piliation, hemagglutination, motility and generation time of *Escherichia coli* that are virulent or avirulent of turkeys. **Avian Diseases**, v. 24, p. 153-161, 1980.
- BARNES, H. J.; VAILLANCOURT, J. P.; GROSS, W. B. Colibacillosis. In: Saif, Y. M. **Diseases of poultry**. 11. ed. Ames, Iowa State: University Press, 2003. p. 631-656.
- BAUER, A. W, KIRBY, E. M. Antibiotic Susceptibility Testing by Standardized Single Disk Method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, p. 493-496, 1966.
- BETTELHEIM, K. A. Biochemical characteristics of *Escherichia coli*. In: GYLES, C. L. (Ed.). **Escherichia coli in domestic animals and humans**. UK: Cab International, 1994. chap. 1, p. 3-30.
- BHAKDI, S.; MACKMAN, N.; NICAUD, J. M.; HOLLAND, I. B. *Escherichia coli* hemolysin may damage target cell membranes by generating transmembrane pores. **Infection and immunity**, v.52, p.63-69, 1986.
- BOOM, R.; SOL, C. J. A.; SALIMANS, M. M. M.; JANSEN, C. L.; WERTHEIN-VAN DILLEN, P. M. E.; VAN DER NOORDAA, J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **Journal of Clinical Microbiology**, v.28, p.495-503, 1990.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Disponível em <http://www.agricultura.gov.br/animal/exportacao>. Acesso em: 30 abr. 2012.
- BRÉE, A.; DHO, M.; LAFONT, J. P. Comparative infectivity for axenic and specific-pathogen-free chickens of O2 *Escherichia coli* strains with or without virulence factors. **Avian Diseases**, v. 33, p. 134-139, 1989.

- BUTAYE, P.; DEVRIESE, L. A.; HAESEBROUK, F. Antimicrobial growth promoters used in animal feed: effects of less well known antibiotics on gram-positive bacteria. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, p. 175-188, 2003.
- BYWALTER, R. J. Identification and surveillance of antimicrobial resistance dissemination in animal production. **Poultry Science**, v. 84, p. 644-648, 2005.
- CAMPOS, T. A.; STEHLING, E. G.; FERREIRA, A.; CASTRO, A. F. P.; BROCCHI, A.; SILVEIRA, W. D. Adhesion properties fimbrial expression and PCR detection of adhesion-related genes of avian *Escherichia coli* strain. **Veterinary Microbiology**, v. 106, p. 275-285, 2005.
- CIRCELLA, E.; PENNELLI, D.; TAGLIABUE, S.; CAMARDA, A. Virulence-associated genes in avian pathogenic *Escherichia coli* from laying hens in Apulia, Southern Italy. **British Poultry Science**, v. 53, p. 465-470, 2012.
- COOKSEY, R. C.; MORLOCK, G.P.; MCQUEEN, A.; GLICKMAN, S. E.; CRAWFORD, J.T. Characterization of streptomycin resistance mechanism among *Mycobacterium tuberculosis* isolates from New York City. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, p.1186-1188, 1996.
- CLARKE, C. R. Antimicrobial resistance. **Veterinary Clinics Small Animal Practice**, v. 36, p. 987-1001, 2006.
- CROFTON, J.; MITCHISON, D. A. Streptomycin Resistance in Pulmonary Tuberculosis. **British Medical Journal**, v. 11, p. 1009-1015, 1948.
- CYRIL, R. C. Antimicrobial resistance. **Veterinary Clinics Small Animal Practice**, v. 36, p. 987-1001, 2006.
- DELICATO, E. R.; BRITO, B. G.; KONOPATZKI, A. P.; GAZIRI, L. C.; VIDOTTO, M. C. Occurrence of the temperature-sensitive hemagglutinin among avian *Escherichia coli*. **Avian Diseases**, v. 46, p. 713-716, 2002.
- DHO-MOULIN, M.; FAIRBROTHER, J. M. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). **Veterinary Research**, v. 30, p. 299-316, 1999.
- DOZOIS, M. C.; CLÉMENT, S.; DESAULTELS, C.; OSWALD, E.; FAIRBROTHER, J. M. Expression of P, S and F1C adhesins by cytotoxic necrotizing factor 1-producing *Escherichia coli* from septicemic and diarrheic pigs. **FEMS Microbiology Letters**, v. 152, p. 307-312, 1997.
- 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, p. 355-366, 2008.
- EDELMAN, S.; LESKELA, S.; RON, E.; APAJALAHTI, J.; KORHOMEN, K. *In vitro* adhesion of an avian pathogenic *Escherichia coli* O78 strain to surfaces of the chicken intestinal tract and to ileal mucus. **Veterinary Microbiology**, v. 91, p. 41-56, 2003.

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

EWERS, C., 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, p. 163-176, 2007.

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

FERREIRA, A. J. P.; KNÖBL, T. Colibacilose Aviária. In: BERCHIERI JR., A.; SILVA, E. N.; DI FABIO, J.; SEST, L.; ZUANAZE, M. A. **Doenças das Aves**, 2ª Ed. Campinas: Ed. Facta, 2009. 1102 p.

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

FLEMMING, J. S. **Utilização de leveduras, probióticos e mananoligossacarídeos (MOS) na alimentação de frangos de corte**. 2005. 109 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Paraná, Paraná, 2005.

FRANCO, B. D. G. M.; LANFGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Editora Atheneu, 2006. 182 p.

FROMER, A., FREIDLIN, P. J.; BOCK, R. R., LEITNER, G.; CHAFFER, M.; HELLER, E. D. Experimental vaccination of young chickens with a live, non-pathogenic strain of *Escherichia coli*. **Avian Pathology**, v. 23, p.425-433, 1994.

GARVIN, R.T., BISWAS, D.W., GORINI, L. The effects of streptomycin or dihydrostreptomycin binding to 16S rRNA or to 30S ribosomal subunits. **Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America**, v. 71, p. 3814-3818, 1974.

GIMENO, E. Doenças aviárias na América Latina. In: REVOLLEDO, L.; FERREIRA, A. J. P. **Patologia Aviária**. Barueri: Manole, 2009, p. 2-5.

GOMIS, S. M.; RIDDELL, C.; POTTER, A. A.; ALLAN, B. J. Phenotypic and genotypic characterization of virulence factors of *Escherichia coli* isolated from broiler chickens with simultaneous occurrence of cellulitis and other colibacillosis lesions. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 65, p. 1-6, 2001.

GOMIS, S.; BABIUK, L.; ALLAN, B.; WILSON, P.; WATERS, E. HECKER, R.; POTTER, A. Protection of chickens against a lethal challenge of *Escherichia coli* by vaccine containing CpG oligodeoxynucleotides as an adjuvant. **Avian Diseases**, v. 51, p. 78-83, 2007.

GOREN, E. Observations on experimental infection of chicken with *Escherichia coli*. **Avian Pathology**, v. 7, p.213-224, 1978.

GREGERSEN, R. H.; CHRISTENSEN, H.; EWERS, C.; BISGAARD, M. Impact of *Escherichia coli* vaccine in parent stock mortality, first week mortality of broilers and population diversity of *E. coli* vaccinated flocks. **Avian Pathology**, v. 39, p. 287-295, 2010.

HELLER, E. D.; LEITNER, G.; DRABKIN, N.; MELAMED, D. Passive immunisation of chicks against *Escherichia coli*. **Avian Pathology**, v. 19, p. 345-354, 1990.

HIRSH, D. C.; ZEE, Y. C. **Microbiologia veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003, 446p.

HOPELMAN, A. I. M.; TUOMANEM, E. I. Consequences of microbial attachment: directing host cell functions with adhesins. **Infection and Immunity**, v. 60, p.1729–1733, 1992.

HOLLAND, B. I.; BLIGHT, M. A.; KENNY, B. The mechanism of secretion of hemolysin and other polipeptides from Gram-negative bacteria. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 22, p. 473-491, 1990.

HOPKINS, K. L.; ARNOLD, C.; THRELFALL, E. J. Rapid detection of gyrA and parC mutations in the quinolone-resistant *Salmonella enterica* using Pyrosequencing technology. **Journal of Microbiological Methods**, v. 68, p. 163-171, 2007.

HORNE, S. M.; PFAFF-MCDONOUGH, 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, p.179-184, 2000.

IKE, K.; KAWAHARA, H.; DANBARA, H.; KUME, K. Serum resistance and aerobactin iron uptake in avian *Escherichia coli* mediated by conjugative 100-megadalton plasmid. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 54, p. 1091-1098, 1992.

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

JOHNSON, T.; WANNEMUEHLER, Y.; DOETKOTT, C.; JOHNSON, S. J.; ROSENBERGER, S.; NOLAN, L. Identification of minimal predictors of avian pathogenic *Escherichia coli* virulence for use as rapid diagnostic tool. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, p. 3987-3996, 2008.

JOUINI, A.; BEN SLAMA, K.; SÁENZ, Y.; KLIBI, N.; COSTA, D.; VINUÉ, L.; ZARAZAGA, M. BOUDABOUS, A.; TORRES, C. Detection of multiple-antimicrobial resistance and characterization of the implicated genes in *Escherichia coli* isolates

from foods of animal origin in Tunis. **Journal of Food Protection**, v. 72, p. 1082-1089, 2009.

KALLENIIUS, G.; MOLBY, R.; SVENSON, S. B.; WINBERG, J.; HULTBERG, H. Identification of a carbohydrate receptor recognized by uropathogenic *Escherichia coli*. **Infection**, v.8, p. 288-293, 1980.

KHARDORI, N. Antibiotics – Past, present, and future. **The Medical Clinics of North America**, v. 90, p. 1049-1076, 2006.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCRECKENBERGER, W. C. **Diagnóstico microbiológico**. 5 ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 2001. 1465 p.

KOO, H. J.; WOO, G. J. Distribution and transferability of tetracycline resistance determinants in *Escherichia coli* isolated from meat and meat products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 145, p. 407-413, 2011.

KOSKATAKIOTI, M.; STATHOPOULOS, C. Functional analysis of the Tsh autotransporter from avian pathogenic *Escherichia coli* strain. **Infection and Immunity**, v. 72, p. 5548-5554, 2004.

KWAGA, J. K.; ALLAN, B. J.; VAN DER HURK, J. V.; SEIDA, H., POTTER, A. A. A carAB mutant of avian pathogenic *Escherichia coli* serogroup O2 is attenuated and effective as a live oral vaccine against colibacillosis in turkeys. **Infection and Immunity**, v. 62, p. 3766-3772, 1994.

LAFONT, J. P.; DHO, M. D.; D'HAUTEVILLE, H. M.; BREE, A.; SANSONETTI, P. J. Presence and expression of aerobactin genes in virulent strains of *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 55, p. 193-197, 1987.

LATHAM, R. H.; STAMM, W. E. Role of fimbriated *Escherichia coli* in urinary tract infections in adult women: Correlation with localization studies. **Journal of Infectious Diseases**, v. 149, p. 835-840, 1994.

LEBEK, G.; GRUENIG, H. M. Relation between the hemolytic property and iron metabolism in *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v.50, p.682-686, 1985.

LI, G.; LATURNUS, C.; EWERS, C.; WIELER, L. H. Identification of genes required for avian *Escherichia coli* septicemia by signature tagged mutagenesis. **Infection and Immunity**, v. 73, p. 2818-2827, 2005.

LODDI, M. M. **Probiótico, prebiótico e acidificantes orgânicos em dietas para frangos de corte**. 2003. 52 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2003.

LYNNE, A. M.; SKYBERG, J. A.; LOGUE, C. M.; DOETKOTT, C.; FOLEY, S. L.; NOLAN, L. K. Characterization of a series of transconjugant mutants of an avian

pathogenic *Escherichia coli* isolate for resistance to serum complement. **Avian Diseases**, v. 51, p. 771-776, 2007.

LYNNE, A. M.; KARIYAWASSAM, S.; WANNEMUEHLER, Y.; 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 lss as a potencial vaccine for avian colibacillosis. **Avian Diseases**, v. 56, p. 192-199, 2012.

MACKMAN, N.; NICAUD, J. M.; GRAY, L.; HOLLAND, I. B. Secretion of haemolysin by *Escherichia coli*. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v.125, p.159-181, 1986.

MCLAUCHLIN, J.; RIPABELLI, G.; BRETT, M. M.; THREFALL, E. J. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis of *Clostridium perfringens* for epidemiological typing. **International Journal of Food Microbiology**, v. 56, p. 21–28, 2000.

MC PEAKE, S. J.; SMYTH, J. A; BALL, H. J. Characterization of avian *Escherichia coli* (APEC) associated with colisepticemic compared to faecal isolates from healthy birds. **Veterinary Microbiology**, v. 110, p. 245-253, 2005.

MARC, D.; DHO-MOULIN, M. Analysis of the cluster of na avian O2 strain of *Escherichia coli*: serogroup-specific sites within *fimA* and nucleotide sequence of *fimI*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 44, p. 444-452, 1996.

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, p.106-118, 1998.

MELAMED, D.; LEITNER, G.; HELLER, E. D. A vaccine against avian colibacillosis based on ultrasonic inactivation of *Escherichia coli*. **Avian Diseases**, v. 35, p. 17-22. 1991.

MELLATA, M.; DHO-MOULIN, M.; DOZOIS, C. M.; CURTISS III, R.; LEHOUX, B.; FAIRBROTHER, J. M.; Role of Avian Pathogenic *Escherichia coli* Virulence Factors in Bacterial Interaction with Chicken Heterophils and Macrophages. **Infection and Immunity**, v. 71, p. 494-503, 2003.

MENÃO, M. C.; FERREIRA, C. S. A.; CASTRO, A. G. M.; KNÖBL, T.; FERREIRA, A. J. P. Sorogrupos de *Escherichia coli* isolados de frangos com doença respiratória crônica. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 69, n. 4, p.15-17, 2002.

MENÃO, M. C. Biologia da vacinação. In: REVOLLEDO, L.; FERREIRA, A. J. P. **Patologia Aviária**. Barueri: Editora Manole Ltda, 2008, p. 386-393.

MILES, T.D.; McLAUGHLIN, W.; BROWN, P.D. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolates from broiler chickens and humans. **Veterinary Research**, v. 2, n. 7, 2006.

- MINISHEW, W. H.; JORGENSEN, J.; COUNTS, G. W.; FALKOW, S. Association of hemolysin production, hemagglutination of human erythrocytes, and virulence for chicken embryos of extra intestinal *Escherichia coli* isolates. **Infection and Immunity**, v. 20, p. 50-54, 1978.
- MOL, O.; OUDEGA, B. Molecular and structural aspects of fimbriae biosynthesis and assembly in *Escherichia coli*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 19, p. 25-52, 1996.
- MOON, H. W. Colonization factor antigens of Enterotoxigenic *Escherichia coli* in animals. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 151, p. 148-165, 1990.
- NAGANO, T; KITAHARA, R.; NAGAI, S. An attenuated mutant of avian pathogenic *Escherichia coli* serovar O78: a possible live vaccine strain for prevention of avian colibacillosis. **Microbiology and Immunology**, v. 56, p. 605-612, 2012.
- NAGARAJA, K. V. Patogenicidad de la *Escherichia coli* y los factores de stress en los pollos de engorde. **Avicultura Profesional**, v.10, p. 176-180, 1993.
- NAKAZATO, G.; CAMPOS, T. A.; ATEHLING, E. G.; BROCCHI, M.; SILVEIRA, W. O. Virulence factors of avian pathogenic *Escherichia coli*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, p. 479-486, 2009.
- NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, p. 142-201, 1998.
- NAVEH, M. W.; ZUSMAN, T.; SKUTLSKY, E.; RON, E. Z. Adherence Pili in Avian Strains of *Escherichia coli* – Effect on Pathogenicity. **Avian Diseases**, v. 28, n. 3, p.651-661, 1984.
- NEILANDS, J. B. Iron absorption and transport in microorganism. **Annual Review of Nutrition**, v. 1, p. 27-46, 1981.
- NOLAN, L.K.; WOOLEY, R. E.; COOPER, R. K. Transposon mutagenesis used to study the role of complement resistance in the virulence of an avian *Escherichia coli* isolate. **Avian Diseases**, v. 36, p. 398-402. 2002.
- NOLAN, L. K.; HORNE, S. M.; GIDDINGS, G. W.; FOLEY, S. L.; JOHNSON, T. J.; LYNNE, A. M.; SKYBERG, J. Resistance to serum complement *in vivo*, and virulence of avian *Escherichia coli* isolate. **Veterinary Research Communications**, v. 27, p. 101-110, 2003.
- OBENG, A. S.; RICKARD, H.; NDI, O.; SEXTON, M. Antibiotic resistance, phylogenetic grouping and virulence potential of *Escherichia coli* isolated from faeces of intensively farmed and free range poultry. **Veterinary Microbiology**, v. 154, p. 305-314, 2012.
- OFEY, I.; DOYLE, R. J. Regulation and expression of bacterial adhesins. In: OFEK, I.; DOYLE, R.J. (Ed.). **Bacterial adhesion to cells and tissues**. New York: Chapman & Hall, 1993. p. 239-320.

OLSEN, A.; JONSSON, A.; NORMARK, S. Fibronectin binding mediated by a novel class of surface organelles on *Escherichia coli*. **Nature**, v.338, p.652-5, 1989.

ORSKOV, I.; ORSKOV, F. Serology of *Escherichia coli* Fimbriae. **Progress in Allergy**, v. 33, p.80-105, 1983.

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

PEIGHAMBARI, S. M.; HUNTER, D. B.; SHEWEN, P. E.; GYLES, C. L. Safety, immunogenicity, and efficacy of two *Escherichia coli cya crp* mutants as vaccines for broilers. **Avian Diseases**, v. 46, p. 287-297, 2002.

PFÄFF-McDONOUGH, S.J.; HOME, S.M.; GIDDINGS, C.W., EBERT, J. O.; DOETKOTT, C.; SMITH, M. H.; NOLAN, L. K. Complement resistance-related traits among *Escherichia coli* isolates from apparently health birds and birds with colibacillosis. **Avian Diseases**, v.44, p. 23-33, 2000.

POURBAKHS, S. A.; DHO-MOULIN, M.; BREÉ, A.; DESAUTELS, C.; MARTINEAU-DOIZE B.; FAIRBROTHER, J. B. Localization of the in vivo expression of P and F1 fimbriae in chickens experimentally inoculated with pathogenic *Escherichia coli*. **Microbial Pathogenesis**, v. 22, p. 231-341, 1997.

PROVENCE, D.L.; CURTISS, R. Role of *crl* in avian pathogenic *Escherichia coli* : a knockout mutation of *crl* does not affect hemagglutination activity, fibronectin binding, or curli production. **Infection and Immunity**, v.60, p.4460-7, 1992.

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

RASKO, D. A.; ROSOVITZ, M. J.; MYERS, G. S.; MONGODIN, E. F. FRICKE, W. F.; GAJER, P.; CRABTREE, J.; SEBAIHA, M.; THOMSON, N. R.; CHAUDHURI, R.; HENDERSON, I. R.; SPERANDIO, V.; RAVEL, J. The pangenome structure of *Escherichia coli*: comparative genomic analysis of *E. coli* commensal and pathogenic isoaltes. **Journal of Bacteriology**, v. 190, p. 6881- 6893, 2008.

REVOLLEDO, L.; FERREIRA, A. J. *Salmonella* antibiotic-mutant strains reduce fecal shedding and organ invasion in broiler chicks. **Poultry Science**, v. 89, p. 2130-2140, 2010.

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

ROE, M. T.; PILLAI, S. D. Monitoring and identifying antibiotic resistance mechanisms in bacteria. **Poultry Science**, v. 82, p. 622-626, 2003.

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

ROSSI, F.; ANDREAZZI, D. B. **Resistência bacteriana: interpretando o antibiograma**. São Paulo: Atheneu, 2005. 118 p.

SALLE, C. T. P.; MORAES, H. L. S. Prevenção de doenças/Manejo profilático/Monitoria. In: In: BERCHIERI JR., A.; SILVA, E. N.; DI FABIO, J.; SEST, L.; ZUANAZE, M. A. **Doenças das Aves**, 2ª Ed. Campinas: Ed. Facta, 2009. p. 1-17.

SCHOULER, C.; KOFFMANN, F.; AMORY, C.; LEROY-SÉTRIN, S.; MOULIN-SCHOULER, M. Genomic subtraction for the identification of putative new virulence factors of an avian pathogenic *Escherichia coli* strain of O2 serogroup. **Microbiology**, v. 150, p. 2973-2984, 2004.

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 Immunity**, v. 66, p. 480-485, 1998.

SILVA, E. N. Probiótico e prebiótico na alimentação de aves. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2000, Campinas, São Paulo. **Anais...** Campinas: FACTA, 2000, v. 2, p. 241-251.

SILVEIRA, W. D., FANTINATTI, F.; CASTRO, A. P. Transposon mutagenesis and membrane protein studies in avian colisepticaemic *Escherichia coli* strain. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 17, p. 9-14, 1994.

SINGER, R. S.; HOFACRE, C. L. Potential impacts of antibiotic use in poultry production. **Avian Diseases**, v. 50, 161-172, 2006.

STATHOPOULOS, C.; PROVENCE, D. L.; CURTISS III, R. Characterization of the avian *Escherichia coli* hemagglutinin Tsh, a member the immunoglobulin A protease-type family of autotransporter. **Infection and Immunity**, v. 67, p. 772-781, 1999.

STREVATSAN, S.; PAN, X.; STOCKBAUER, K. E.; WILLIAMS, D. L.; KREISWIRTH, B. N.; MUSSER, J. M. Characterization of rpsL and rrs mutations in streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from diverse geographic localities. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 40, p. 1024-1026, 1996.

SUNDE, M.; NORSTRÖM, M. The prevalence of associations between and conjugal transfer of antibiotic resistance genes in *Escherichia coli* isolated from Norwegian meat and meat products. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 58, p. 741-747, 2006.

SUSSMAN, M. *Escherichia coli* and human disease. In: SUSSMAN, M. **Escherichia coli Mechanisms of virulence**. Cambridge: University Press, 1997.

- TENOVER, F. C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. **The American Journal of Medicine**, v. 119, p. S3-S10, 2006.
- THANASSI, D. G.; SAULINO, E. T.; HULTGREN, S. J. The chaperone/usher pathway: a major terminal branch of the general secretory pathway. **Current Opinion in Microbiology**, v. 1, p. 223-231, 1998.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 8 ed. Porto Alegre: Artmed 2005. 920 p.
- TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 4. São Paulo: Atheneu, 2005, 718 p.
- 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.
- TUNTUFYE, H. N.; LEBEER, S.; GWAKISA, P. S.; GODDEERIS, B.M. Identification of avian pathogenic *Escherichia coli* genes that are induced in vivo during infection in chickens. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, p. 3343-3351, 2012.
- TURNIDGE, J. Antibiotic use in animals – prejudices, perceptions and realities. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 53, p. 26-27, 2004.
- VIDOTTO, M. C., MÜLLER, E. E., De FREITAS, J. C., ALFIERI, A. A.; GUIMARÃES, I. G.; SANTOS, D. S. Virulence factors of avian *Escherichia coli*. **Avian Diseases**, v.34, p.531-538, 1990.
- WAKSMAN, G.; HULTGREN, S. J. Structural biology of the chaperone-usher pathway of pilus biogenesis. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, p. 765-774, 2009.
- WEGENER, H. C.; AARESTRUP, P.; GERNER-SMIDT, P.; BAGER, F. Transfer of antibiotic resistant bacteria from animals to man. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 92, p. 51-57, 1999.
- WOOLEY, R. E.; GIBBS, P. S.; BROWN, T. P.; GLISSON, J. R.; STEFFENS W. L.; MAURER, J. J. Colonization of the chicken trachea by avirulent avian *Escherichia coli* transformed with plasmid pHK 11. **Avian Diseases**, v. 42, p. 194-198, 1998.
- YAGUCHI, K.; OGITANI, T.; OSAWA, R.; KAWANO, M.; KOKUMAI, N.; KANESHIGE, T.; NORO, T.; MASUBUCHI, K.; SHIMIZU, Y. Virulence factors of avian pathogenic *Escherichia coli* strains isolated from chickens with colisepticemia in Japan. **Avian Diseases**, v. 51, p. 656-662, 2007.
- YAGUCHI, K.; OHGITANI, T.; NORO, T.; SHIMIZU, Y. Vaccination of chicken with liposomal inactivated avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) vaccine by egg dropp or coarse spray administration. **Avian Diseases**, v. 53, p. 245-249, 2009.

YAMAMOTO, S.; TERAJ, 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, p. 85-90, 1995.

YAMAMOTO, S.; 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, p. 1441-1445, 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, p.3483-3489, 2004.

YUNIS, R.; BEM-DAVID, A. HELLER, E. D.; CAHANER, A. Immunocompetence and viability under commercial conditions of broiler groups differing in growth rate and in antibody response to *Escherichia coli* vaccine. **Poultry Science**, v. 79, p. 810-816, 2000.

ZANATTA, G. F.; KANASHIRO, A. M. I.; CASTRO, 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, p. 283-286, 2004.