

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

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 doxaciiclina, a espectiomicina, a estreptomicina, a lincomicina-espectiomicina, 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.

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.

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 Iss 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.

PFAFF-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.

POURBAKHSH, 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.; SEBAIHIA, 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.