

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ESTUDO DOS FATORES DE VIRULÊNCIA,
SOROGRUPOS, PATOGENICIDADE E
SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA DAS CEPAS DE
Escherichia coli ISOLADAS DE PINTAINHAS DE
REPOSIÇÃO DE POSTURA**

Elisabete Aparecida Lopes Guastalli

Bióloga

JABOTICABAL - SÃO PAULO – BRASIL

2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ESTUDO DOS FATORES DE VIRULÊNCIA,
SOROGRUPOS, PATOGENICIDADE E
SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA DAS CEPAS DE
Escherichia coli ISOLADAS DE PINTAINHAS DE
REPOSIÇÃO DE POSTURA**

Elisabete Aparecida Lopes Guastalli

Orientação: Prof. Dr. Fernando Antonio de Ávila

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia (Microbiologia Agropecuária).

Jaboticabal – São Paulo – Brasil
Outubro de 2010

Guastalli, Elisabete Aparecida Lopes
G917e Estudo dos fatores de virulência, sorogrupos, patogenicidade e susceptibilidade antimicrobiana das cepas de *Escherichia coli* isoladas de pintainhas de reposição de postura / Elisabete Aparecida Lopes Guastalli. -- Jaboticabal, 2010
xv, 75 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2010
Orientador: Fernando Antonio de Ávila
Banca examinadora: Hélio José Montassier, Antonio José Piantino Ferreira
Bibliografia

1. *Escherichia coli*. 2. Postura comercial. 3. sorotipos. 4. . PCR multiplex I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 616.98:636.5

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.
e-mail da autora: guastalli@biologico.sp.gov.br



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CAMPUS DE JABOTICABAL

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: ESTUDO DOS FATORES DE VIRULÊNCIA, SOROGRUPOS, PATOGENICIDADE E SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA DAS CEPAS DE *Escherichia coli* ISOLADAS DE PINTAINHAS DE REPOSIÇÃO DE POSTURA

AUTORA: ELISABETE APARECIDA LOPES GUASTALLI

ORIENTADOR: Prof. Dr. FERNANDO ANTONIO DE AVILA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM MICROBIOLOGIA AGROPECUÁRIA, pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. FERNANDO ANTONIO DE AVILA

Departamento de Patologia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Prof. Dr. HELIO JOSÉ MONTASSIER

Departamento de Patologia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Prof. Dr. ANTONIO JOSÉ PIANTINO FERREIRA

Departamento de Patologia / Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - USP / São Paulo/SP

Data da realização: 26 de outubro de 2010.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

ELISABETE APARECIDA LOPES GUASTALLI – Filha de Antonio Lopes Segóvia e Aparecida Passafaro Lopes, nascida em 09 de outubro de 1967, no município de Tupã, São Paulo, Brasil. Em 1986 iniciou o curso superior de Ciências – Licenciatura de 1º Grau na Faculdade de Filosofia e Letras de Tupã. No mesmo ano foi aprovada em concurso público para o cargo de Técnico de Laboratório no Instituto Biológico/CAPTAA/Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento de Bastos (UPDB). Em 2000 concluiu o Curso de Biologia, Licenciatura plena, na Faculdade Adamantina Integrada. Em 2005, após ter sido aprovada em concurso público assumiu o cargo de pesquisador científico na UPDB. Em agosto de 2008 ingressou no curso de pós-graduação em Microbiologia, nível mestrado área de concentração em Microbiologia Agropecuária, na Universidade Estadual Paulista, Campus de Jaboticabal.

E-mail: guastalli@biologico.sp.gov.br

“Existe um tempo certo para cada coisa, momento oportuno para cada propósito debaixo do sol: tempo para nascer, tempo para morrer; tempo de plantar, tempo de colher”.

(Eclesiastes 3:1-2)

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

(Madre Teresa de Calcutá)

DEDICO,

Ao meu esposo Miguel, por suas orações, compreensão e principalmente pelo amor que recebi e que me deu forças para a realização deste curso.

Aos nossos filhos Bruno e Rodrigo, pelo apoio de cada um deles e pelo amor demonstrado nos gestos de carinho.

A minha querida mãe (in memória), que com sua sabedoria, me abençoou no início desta caminhada, pois sabia que sem a sua benção este sonho não teria se concretizado e mesmo tendo partido, sei que está presente em tudo o que eu faço, vejo ou sinto.

Ao meu pai (in memória) e aos meus irmãos Erivelto e Edivaldo por fazerem parte da minha vida.

A minha querida avó Rosa que me ensinou a admirar e almejar as coisas simples da vida, onde encontramos a riqueza de simplesmente ser feliz.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus, por estar sempre ao meu lado, me fortalecendo e me capacitando. A ti Senhor, as primícias de tudo em minha vida.

Ao Prof. Dr. Fernando Antonio de Ávila, meu orientador, por sua orientação, confiança, apoio e amizade.

A médica veterinária Dra. Nilce Maria Soares do Instituto Biológico/CAPTAA/UPDBastos, por ter sido a primeira pessoa a acreditar e incentivar a realização deste curso, antes mesmo que eu mesma acreditasse.

Aos meus amigos do Instituto Biológico/CAPTAA/UPDBastos, Marcos, Cristina, Rogério, Milta, Regiane, Angélica, Lucimar, Néia, Márcia, Linete, Angélica e Maria Angélica, pela ajuda e incentivo.

Ao Prof. Dr. Domingos da Silva Leite, á bióloga Mirtes Ferraz, a doutoranda Claudia e toda equipe do Laboratório de Antígenos Bacterianos II do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, pela ajuda, paciência, ensinamento e confiança em usar o Laboratório para a realização das análises de sorotipagem.

As pesquisadoras do Instituto Biológico, Dra. Alice Akimi Ikuno e Dra. Vera Cecília Annes Ferreira, que gentilmente disponibilizaram o seu tempo e também o laboratório, para a realização das análises de PCR.

Ao meu filho Bruno Henrique Lopes Guastalli futuro médico veterinário, do qual me orgulho muito, por sua valiosa colaboração.

A minha amiga Vânia pelo acolhimento, companheirismo e ensinamentos.

Ao amigo Renato Pariz Maluta, do Laboratório de Microbiologia da UNESP, pelo apoio necessário.

Aos meus amigos do Laboratório de Microbiologia da UNESP, Ana Claudia, Clarissa e Livia, pelo agradável convívio.

Ao técnico do Laboratório de Microbiologia Veterinária, João L. Quintana, pela acolhida.

À secretaria da Microbiologia Edna M. T. Dáquila pela atenção.

A amiga Aline Botelho, pelo auxílio e companheirismo.

Aos meus amigos Henrique, Ketherson, Greice e Fúlvia, pelos momentos de descontração.

Aos proprietários das granjas do município de Bastos, que mais uma vez confiaram em nosso trabalho e gentilmente, nos deixaram entrar em suas propriedades para coleta de material, demonstrando que acreditam na pesquisa científica.

A Secretaria da Agricultura e Abastecimento/Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios/Instituto Biológico pelo afastamento concedido durante a realização deste curso.

À instituição FAPESP e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico-CNPq, pelo auxílio financeiro para a realização deste projeto.

A CAPES pela concessão de bolsa de estudo.

A todos que direta ou indireta contribuíram para realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	página
Lista de Abreviaturas.....	iv
Lista de Tabelas.....	vi
Lista de Figuras.....	vii
Resumo.....	viii
Summary.....	ix
I. INTRODUÇÃO.....	1
II. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 <i>Escherichia coli</i>	4
2.2 Etiologia.....	5
2.2.1 Estruturas antigênicas.....	5
2.3 Colibacilose aviária.....	7
2.4 Epidemiologia das infecções por APEC.....	11
2.5 Fatores de virulência de APEC.....	13
2.5.1 Colicinas.....	14
2.5.2 Sistema de aquisição de ferro.....	14
2.5.3 Adesinas.....	15
2.5.4 Resistência sérica.....	17
2.5.5 Toxinas.....	18
2.6 PCR- Para a detecção de gene de virulência em APEC.....	18
2.7 Resistência aos antimicrobianos.....	19
III. OBJETIVOS.....	21
3.1 Geral.....	21

3.2 Específicos.....	21
IV. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
4.1 Lotes de aves.....	22
4.2 Coletas das amostras.....	22
4.3 Procedimento microbiológico para o isolamento e identificação de <i>Escherichia coli</i>	22
4.3.1 Pré-cultivo.....	23
4.3.2 Plaqueamento.....	23
4.3.3 Identificação bioquímica.....	23
4.4 Teste de patogenicidade em pintos de um dia.....	24
4.5 Determinação dos fatores de virulência através da Reação de Cadeia pela Polimerase.....	25
4.5.1 Cepas bacterianas.....	25
4.5.2 Extração do DNA.....	25
4.5.3 Procedimento para detecção dos genes.....	26
4.5.4 Eletroforese em gel de agarose.....	27
4.6 Sorotipagem.....	28
4.6.1 Determinação do sorogrupo (antígeno O).....	28
4.6.2 Determinação do antígeno “H”.....	29
4.7 Teste de susceptibilidade antimicrobiana.....	30
V. RESULTADOS.....	31
5.1 Patogenicidade das estirpes.....	31
5.2 Sorotipagem (O:H).....	32
5.3 Determinação dos genes de virulência.....	32
5.4 Susceptibilidade antimicrobiana.....	38

VI. DISCUSSÃO.....	41
VII. CONCLUSÃO.....	47
VIII. REFERÊNCIAS.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS

APEC	<i>E. coli</i> patogênica aviária
astA	Gene codificador da toxina enteroagregativa termo estável
bp	Par de bases (do inglês “base pair”)
cva/cvi	Gene codificador do plasmídio da colicina V
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Deoxirribonucleotídeo
EAGGEC	<i>E. coli</i> enteroagregativa
EIEC	<i>E. coli</i> enteroinvasora
EHEC	<i>E. coli</i> enterohemorrágica
EPEC	<i>E. coli</i> enteropatogênica
ETEC	<i>E. coli</i> enterotoxigênica
EDTA	Ácido dietilenodiaminotetracético
irp2	Gene codificador do sistema de aquisição de ferro
iss	Gene codificador da proteína para aumento de sobrevivência no soro
iucD	Gene codificador da aerobactina
Kb	Kilobases
M	Molar
mL	Mililitro (10^{-3})
MNEC	<i>E. coli</i> de meningite neonatal
mM	Milimolar (10^{-3} Molar)

<i>papC</i>	Gene codificador do pili associado com pielonefrite
PCR	Reação em cadeia pela polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
<i>tsh</i>	Gene codificador da hemaglutinina sensível a temperatura
REDEC	<i>E. coli</i> enteropatogênica de coelho
μg	Micrograma (10^{-6} grama)
UPEC	<i>E. coli</i> uropatogênica
μL	Microlitro (10^{-6} litro)
μM	Micromolar (10^{-6} Molar)
V	Volt
<i>vat</i>	Gene codificador da toxina de vacuolização

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1 – Sequência de oligonucleotídeos iniciadores utilizados na reação de PCR Multiplex para amplificação dos fragmentos dos genes <i>astA</i> , <i>iss</i> , <i>irp2</i> , <i>papC</i> , <i>iucD</i> , <i>tsh</i> , <i>vat</i> , <i>cva/cvi</i> de <i>E.coli</i>	27
Tabela 2. - Número de estirpes <i>Escherichia coli</i> analisadas e percentual de ocorrência dos genes de virulência.....	33
Tabela 3 - Resultados dos ensaios fenótipos (sorotipagem e patogenicidade) e genótipos (PCR), segundo os lotes e órgãos de procedência, das 44 estirpes.....	35
Tabela 4: Perfis genéticos, número de estirpes de <i>E. coli</i> de alta e intermediária patogenicidade, órgãos de isolamento e sorogrupo.....	37
Tabela 5 - Susceptibilidade antimicrobiana apresentada por 90 estirpes de <i>E. coli</i> frente a 11 antimicrobianos testados.....	38
Tabela 6: Porcentagem de estirpes de <i>E. coli</i> sensíveis aos antimicrobianos, de acordo com a classificação do grau de patogenicidade.....	40

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. - Foto gel de agarose 1,5% do produto da PCR multiplex para a detecção dos genes *astA*, *iss*, *irp2*, *papC*, *iucD*, *tsh*, *vat*, *cva/cvi* de *E.coli*.....34

ESTUDO DOS FATORES DE VIRULÊNCIA, SOROGRUPOS, PATOGENICIDADE E SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA DAS CEPAS DE *Escherichia coli* ISOLADAS DE PINTAINHAS DE REPOSIÇÃO DE POSTURA

RESUMO – Foram isoladas 90 estirpes de *E. coli* de fígados e de intestinos, de pintainhas de postura comercial, com sete dias de idade. Com o objetivo de caracterizar as estirpes isoladas, a patogenicidade das mesmas foi determinada, em inoculação “in vivo”. O teste revelou 44 estirpes de alta ou de intermediária patogenicidade, que foram analisadas por PCR multiplex quanto á presença de oito genes de virulência (*astA*, *iss*, *iucD*, *irp2*, *papC*, *tsh*, *vat* e *cva/cvi*) e tiveram os sorotipos O:H identificados. Os resultados demonstraram que todas as estirpes analisadas continham pelo menos um dos oito genes pesquisados e que a maioria (93,20%) possuíam o gene *iss*. Foram detectados 17 perfis genéticos diferentes, sendo 15 deles com combinações de dois ou mais genes, representando 70,45% do total de estirpes analisadas. Onze sorogrupos e onze antígenos “H” foram identificados, sendo O8 (15,89%) e o H17 (23,8%) os mais frequentes. Com o objetivo de verificar a susceptibilidade das estirpes aos antimicrobianos: ampicilina, enrofloxacina, eritromicina, espectinomicina, estreptomicina, fosfomicina, kanamicina, lincomicina, norfloxacina, sulfa+trimetoprim e tetraciclina, comumente utilizados na avicultura, todas as estirpes de *E. coli* isoladas foram analisadas. O antimicrobiano que apresentou maior atividade antibacteriana foi a espectinomicina (92,2%) e o de menor atividade foi a lincomicina. Nenhuma das estirpes foi sensível a todos os antimicrobianos testados. Os resultados demonstraram uma diversidade de sorotipos e de genes de virulência envolvidos no quadro clínico de colibacilose estudado, como também sorogrupos que não haviam sido relatados em APEC e a alta incidência de resistência antimicrobiana.

Palavras-Chave: *Escherichia coli*, postura comercial, sorotipos, PCR multiplex

**STUDY OF VIRULENCE FACTORS, SEROGROUPS, PATHOGENICITY AND
ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY OF *Escherichia coli* STRAINS ISOLATED
FROM REPLACEMENT COMMERCIAL LAYER CHICKS**

SUMMARY – A total of 90 strains of *E. coli* were isolated from the livers and intestines of seven-day-old commercial layer chicks. With the objective of characterising the isolated strains, their pathogenicity levels were determined by *in vivo* inoculation. These tests identified 44 strains with high or intermediate levels of pathogenicity, which were then analysed by multiplex PCR for the presence of eight virulence genes (*astA*, *iss*, *iucD*, *irp2*, *papC*, *tsh*, *vat* e *cvi/cva*) and the serotypes O:H were identified. The results demonstrated that these isolated strains contained at least one of the eight genes of interest, and the majority (93.20%) possessed the *iss* gene. Seventeen different genetic patterns were detected, 15 of which had combinations of two or more genes, representing 70.45% of all analysed strains. Eleven serogroups and eleven antigens “H” were identified, O8 (15.89%) and H17 (23.80%) were most frequent. Aiming to verify the susceptibility of strains to antimicrobial agents: ampicillin, enrofloxacin, erythromycin, spectinomycin, streptomycin, fosfomicin, kanamycin, lincomycin, norfloxacin, trimethoprim sulfa and tetracycline, commonly used in poultry, all strains of *E. coli* isolates were analyzed. The antibiotics that showed the highest antibacterial activity was spectinomycin (92.2%) and less activity was the lincomycin (100%) strains were resistant. None of the strains were sensitive to all antibiotics tested. The results showed a diversity of serotypes and virulence genes involved in the clinical study of colibacillosis, as well as serogroups that had not been reported in APEC and the high incidence of antimicrobial resistance.

Keywords: *Escherichia coli*, commercial layer, serotypes, multiplex PCR

I. INTRODUÇÃO

Segundo a Organização das Nações Unidas (ONU), a população mundial em 2050 deve passar dos atuais 6,6 bilhões de habitantes para aproximadamente 9,2 bilhões.

Hoje a fome atinge cerca de um bilhão de pessoas no mundo e segundo estimativas esse quadro tende a se intensificar nos próximos anos. Se alimentar hoje toda a população mundial já é uma grande dificuldade, como aumentar a produção de alimentos para atender a demanda, uma vez que os recursos naturais tendem a se tornar cada vez mais escassos?

Graças a vários fatores importantes, mas principalmente por sermos privilegiados pela disponibilização de recursos naturais, dentre eles a água doce, o Brasil vem se tornando uma potência agrícola global.

Este fato nos assegura um fator diferencial único para o futuro de nossa avicultura, que nos últimos anos vem se destacando como atividade de criação animal de caráter intensivo, caracterizada por rápido ciclo de produção, alta densidade de animais, advento constata de novas tecnologias de criação e manejo.

O Brasil ocupa a 6ª posição em relação ao volume total de produção mundial de ovos e o Estado de São Paulo é o maior produtor nacional. O município de Bastos (SP), conhecida como a “capital do ovo”, possui o maior plantel de galinhas de postura comercial do Brasil. O município possui uma área de 173 Km², sendo 4,60 Km² de área urbana e 168,40 Km² de área rural, onde estão instaladas 130 granjas de postura comercial. No município e região estão alojadas 3,3 milhões de aves em período de cria e recria e 16,3 milhões em produção, que produzem cerca de 12,8 milhões de ovos por dia, o que corresponde a 40% da produção paulista e de 20% da produção nacional de ovos.

Atualmente, Bastos representa um modelo de criação intensiva e manter a sanidade desses plantéis é fundamental, uma vez que a criação com alta densidade de aves é uma realidade no município, favorecendo assim a propagação de

microrganismos patogênicos entre aves. Dentre esses microrganismos pode-se citar a bactéria *Escherichia coli* (*E. coli*), que tem sido subestimada nos últimos anos, não sendo vista como um potencial patógeno, devido aos patógenos emergentes que foram introduzidos na avicultura nos últimos anos.

Escherichia coli é o patógeno de maior importância na avicultura industrial em todo o mundo. *Escherichia coli* patogênica para ave (APEC) pode causar vários quadros infecciosos como: enterite, artrite, onfalite, coligranuloma, salpingite, septicemia, aerossaculite, etc. Os prejuízos econômicos acontecem devido ao aumento da mortalidade embrionária, menor desenvolvimento das aves, do aumento do índice de conversão alimentar, aumento da mortalidade e dos custos com medicamentos.

A bactéria acomete aves em todas as idades, porém a susceptibilidade das aves a APEC e a severidade da enfermidade é maior em aves mais jovens.

O cuidado com as aves nas primeiras semanas de vida é fundamental para que a futura poedeira possa atingir seu índice zootécnico. Nas granjas de postura comercial, as pintainhas são recebidas com um dia de idade e podem chegar infectadas por APEC. A infecção pode acontecer ainda no incubatório, através da transmissão transovariana de galinhas infectadas para as pintainhas, ou através da contaminação dos ovos por fezes, a bactéria pode penetrar a casca do ovo, alcançar seu interior e infectar o embrião. As pintainhas infectadas que sobrevivem aos primeiros quatro dias de vida, podem resultar em casos de infecções graves e ter o seu desenvolvimento comprometido, permanecendo portadoras e veiculadoras de amostras patogênicas de *E. coli* ao ambiente, comprometendo assim as outras aves da granja, como também as aves das granjas vizinhas.

A manifestação de sinais clínicos nas pintainhas infectadas por *E. coli* ocorre de maneira inespecífica. A bactéria pode causar desuniformidade do lote, aumento de mortalidade, sonolência ou prostração, baixo consumo de ração e ganho de peso e diarreia.

Os avanços nas pesquisas, e especialmente nas ferramentas utilizadas no diagnóstico da colibacilose vêm resultando no maior entendimento dos mecanismos de patogenicidade da bactéria e cada vez mais é demonstrada a grande importância da

interação dos diversos fatores de virulência na determinação da patogenicidade dessas bactérias.

O conhecimento dos sorotipos e dos genes de virulência envolvidos nos casos de colibaciloses, associados ao teste “in vivo”, pode proporcionar um conhecimento mais completo das propriedades biológicas dessas bactérias, seu grau de patogenicidade, assim como sua capacidade de invadir, colonizar e se replicar em seu hospedeiro natural.

Paralelamente, a resistência bacteriana às drogas antimicrobianas constitui-se em sério problema por limitar as possibilidades terapêuticas de tratamento das doenças bacterianas em aves. Esta resistência assume especial importância no tratamento de infecções sistêmicas causada por *E. coli*, por sua incidência ser economicamente significativa. No entanto, ainda há escassez de informações na literatura sobre amostras de *E. coli* isoladas de galinhas de postura comercial.

No presente estudo, estirpes de *E. coli* isoladas de pintainhas com sete dias de idade, apresentado sinal clínico de emplastamento de fezes na cloaca e aves de menor tamanho, foram caracterizadas fenotipicamente por meio do teste de patogenicidade “in vivo” e as estirpes consideradas potencialmente patogênicas, ou seja, as de alta ou intermediária patogenicidade, foram sorotipadas e genotipadas quanto a presença de genes de virulência pela reação em cadeia pela polimerase, sendo que todas estas estirpes foram investigadas com relação a susceptibilidade antimicrobiana.

II. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Escherichia coli*

As bactérias da espécie *Escherichia coli* (*E. coli*) foram primeiramente descritas por Theodor Escherich, que em 1885, a partir de fezes de crianças saudáveis isolou e atribuiu-lhe o nome de *Bacterium coli commune* (BETTELHEIM, 1994).

Em aves o primeiro relato foi realizado por Lignieres, em 1894 (PALMER & BAKER, 1923). A bactéria foi isolada de órgãos e posteriormente inoculada em aves, cobaias e coelhos, confirmando assim a patogenicidade da bactéria somente para as aves. Após esse relato, vários casos foram associados a *E. coli*, incluindo várias espécies de aves, como: cines, perus, codornas e aves comerciais (PALMER & BAKER, 1923).

Essa bactéria faz parte da microbiota entérica de mamíferos e aves, sua colonização no intestino ocorre logo após o nascimento embora o seu papel na microbiota entérica ainda não tenha sido completamente elucidado. Durante muito tempo foi considerada como um microrganismo não patogênico, no entanto, alguns sorogrupos começaram a ser associados a diversas patologias no homem e nos animais domésticos (FERREIRA & KNÖBL, 2009).

Atualmente, *E. coli* tem sido amplamente estudada, devido aos diferentes mecanismos de virulência da bactéria, e por estar relacionada com diversas doenças no homem e nos animais (NAKAZATO et al., 2009).

Estudos relacionados à patogenicidade de *E. coli* mostraram, que amostras patogênicas possuem mecanismos de virulência específicos. Com base nesses fatores de virulência, essas amostras foram classificadas em patótipos: enteropatogênicos (EPEC), enterotoxigênicos (ETEC), enteroinvasivos (EIEC), enterohemorrágicos (EHEC), enteroagregativos (EAGGEC), uropatogênicos (UPEC), meningite neonatal (MNEC), enteropatogênicos de coelhos (REDEC) e patogênicos para aves (APEC) (FERREIRA et al., 2009).

Vários estudos têm demonstrado que alguns sorotipos de *E. coli* normalmente associados a mamíferos, dos grupos de cepas enterotoxigênicas (ETEC), verotoxigênicas (VTEC) e “attaching and effacing” (AEEC) pode estar hábil para colonizar o trato intestinal das aves e em alguns casos causar alterações histopatológicas (JOYA et al., 1990; STAVRIC et al., 1993; SCHOENI & DOYLE, 1994; SUEYOSHI et al., 1997; BEST et al., 2003; DIPINETO et al., 2006).

2.2. Etiologia

E. coli é uma bactéria pertencente à família *Enterobacteriaceae*, é um bastonete curto, com coloração Gram negativa, não esporulado, cujo tamanho varia de 1,1 a 1,5 µm por 2-6 µm. Em sua maioria, são móveis, devido à existência de flagelos peritríqueos. Em meios nutrientes sólidos, as colônias apresentam cerca de 1 a 3 mm de diâmetro podendo apresentar duas formas, lisa e rugosa, mas podem existir colônias com características intermediárias e mucóides. Colônias lisas são convexas e brilhantes, possuem bordas regulares, enquanto colônias rugosas apresentam um aspecto e aparência grosseira, contornos irregulares (EDWARDS & EWING'S 1986; FERREIRA & KNÖBL, 2009).

Essa bactéria possui metabolismo respiratório e fermentativo, pois é anaeróbio facultativo. A sua temperatura ideal de multiplicação é 37°C, porém consegue multiplicar em temperaturas de 18 a 44°C. Nas provas bioquímicas é positiva para vermelho de metila (VM) e produção de indol, enquanto para as provas de catalase, oxidase, utilização do citrato e Voger Proskauer (VP) é negativa. Não é capaz de utilizar a uréia como única fonte de nitrogênio, descarboxila os aminoácidos arginina, lisina e ornitina e possui como principal característica, fermentar glicose produzindo ácido e gás (EDWARDS & EWING'S 1986).

2.2.1. Estruturas antigênicas

O corpo da bactéria é composto de estruturas antigênicas que contribuem para a classificação de vários sorotipos de *E. coli* (TRABULSI et al., 2005; EDWARDS & EWING'S 1986).

Uma das principais contribuições para a caracterização da *E. coli* foi o estabelecimento dos métodos sorológicos proposto por KAUFFMAN (1947), esse autor propôs que amostras de *E. coli* fossem identificadas tendo-se como base seus principais antígenos de superfície, que são os antígenos O (somáticos), antígenos K (capsulares), antígenos H (flagelares) e antígenos F (fimbriais).

Na literatura são encontrados diferentes números de antígenos conhecidos. Segundo YERUSHALMI et al. (1990) são 177 antígenos O, 100 antígenos K e 56 antígenos flagelares H. Contudo, outro autor (LIOR, 1994) relata o conhecimento de 167 antígenos O, 74 antígenos K, 53 antígenos H e 17 fimbriais. Existem ainda as amostras rugosas, que são auto-aglutinantes e não podem ser sorotipadas (BARNES et al., 2003).

O antígeno somático "O" corresponde a uma das frações do principal componente da parede celular das bactérias Gram negativas, o lipopolissacarídeo (LPS). Este é constituído por três frações, uma delas é o antígeno somático (cadeia de polissacarídeo que se projeta para o espaço extracelular, cuja composição é extremamente variável entre as bactérias da mesma espécie) o que determina a existência de vários sorogrupos. A segunda fração é o lipídeo A, altamente conservado entre os membros da família *Enterobacteriaceae*, é conhecido como endotoxina, sendo liberado durante a fase de multiplicação ou após a morte bacteriana. A outra fração é intermediária e liga covalentemente o lipídeo A ao antígeno somático (GYLES, 1994; FERREIRA & KNÖBL, 2009).

O antígeno flagelar "H" é de natureza protéica, conhecida como flagelina. ØRSKOV & ØRSKOV (1975) descreveram o último antígeno reconhecido pela comunidade científica internacional, o H56. Atualmente são conhecidos 56 antígenos "H", os quais são numerados de 1 a 56.

Aos antígenos O e H se somam os antígenos capsulares “K” constituído de um ácido polimérico contendo 2% de açúcares reduzidos e o antígeno fimbrial “F”, constituídos de moléculas de natureza protéica (TRABULSI et al., 2005).

Graças à presença desses antígenos, é possível a identificação sorológica das amostras de *E. coli*, e estabelecer correlação com algumas doenças (ØRSKOV & ØRSKOV, 1992).

Segundo BLANCO et al. (1994), os patótipos de *E. coli* tendem a ser grupos clonais que definem os sorogrupos (somente antígeno O) ou sorotipos (onde o antígeno H deve ser pesquisado, O:H).

2.3. Colibacilose aviária

E. coli patogênica para aves (APEC) são responsáveis por diferentes quadros infecciosos, atuando como agente primário ou secundário. A bactéria pode afetar praticamente todos os órgãos das aves, causando infecções intestinais e extra-intestinais, conhecidas por colibacilose (BARNES et al., 2003).

No trato digestivo das aves, *E. coli* pode ser encontrada em concentrações acima de 10^6 unidade formadora de colônia por grama de fezes. Esse número pode ser ainda maior em aves jovens, aves sem a microbiota normal estabelecida (LEITHNER & HELLER, 1992). Desse total, de 10 a 20% são potencialmente patogênicas e através das fezes, são liberadas para o ambiente, havendo assim, uma excreção contínua de *E. coli* patogênica, tornando sua distribuição cosmopolita. As cepas permanecem nas criações por longos períodos, contaminando o ar, o alimento e a água que servirão como via de disseminação (FERREIRA & KNÖBL, 2009).

A ocorrência da colibacilose resulta da interação e alteração do equilíbrio entre bactéria, hospedeiro e o meio ambiente. As condições ambientais e de manejo contribuem muito para a ocorrência da doença, pois a bactéria é considerada um patógeno oportunista. Altas concentrações de amônia no galpão, deficiências na ventilação de ambientes avícolas, extremos de temperatura, umidade da cama, criações com alta densidade e deficiência no processo de desinfecção são

considerados os principais fatores ambientais predisponentes (FERREIRA & KNÖBL, 2009).

Um importante aspecto a ser considerado na colonização da bactéria no intestino das aves, é o fato do órgão servir como porta de entrada da bactéria para a circulação sanguínea. LEITNER & HELLER (1992) demonstraram experimentalmente que os fatores de estresse, como a privação de comida e água ou exposição ao calor pode conduzir à propagação de clones de *E. coli* patogênicas do intestino para a corrente sanguínea das aves, resultando em mortalidade significativa, quando comparado ao grupo controle que não sofreram estresse.

Embora seja abundante a literatura disponível que menciona a infecção intestinal das aves por *E. coli* como uma enfermidade incomum, há relatos no sentido de que a bactéria seja responsável por lesões histológicas no intestino de pombos e de pintinhos (WADA et al., 1995; SUEYOSHI et al., 1997).

Vários sorogrupos de *E. coli* estão relacionados com colibacilose aviária (EDWARDS & EWING'S 1986; DHO-MOULIN & FAIRBROTHER, 1999). HARRY & HEMSLEY (1965) demonstraram que 10-15% dos isolados de *E. coli* da microbiota intestinal de aves saudáveis, pertenciam a sorogrupos potencialmente patogênicos para aves, ou seja, sorogrupos associados com lesões de colibacilose, tais estudos na época já indicavam o intestino como reservatório para *E. coli* patogênicas.

Entre os sorogrupos APEC frequentemente descritos na literatura como associados à patogenicidade e que podem estar presentes na microbiota de aves sadias os mais frequentes são O1, O2 e O78 (DHO-MOULIN & FAIRBROTHER, 1999). BARNES (1994) cita os sorogrupos O1:K1, O2:K1, O36 e O78:K80, como os principais sorogrupos envolvidos nos casos de colibacilose aviária, porém admite a possibilidade de outros sorogrupos como O4, O6, O11, O21, O50, O88, O100 e O119 serem isolados.

Já, no Brasil, trabalhos indicam que os sorogrupos mais prevalentes são O2, O21, O36, O50, O78, O88, O119 e O152, como também que estirpes não tipáveis podem apresentar importância epidemiológica (FERREIRA, 1989; MENÃO et al., 2002; SILVEIRA et al., 2002).

Estudo realizado com sorogrupos de cepas de *E. coli* isoladas de pintainhas de postura comercial com um dia de idade, revelou uma grande diversidade entre os sorogrupos encontrados, das 22 amostras analisadas, foram identificados 14 sorogrupos: O1, O2, O5, O8, O15, O18, O22, O36, O64, O70, O75, O115, O132, O141, sendo que os sorogrupos O1, O2 e O36, frequentemente encontrados em aves com colibacilose somaram 13,67% das amostras analisadas (GUASTALLI et al., 2010).

FERREIRA & KNÖBL (2000) detectaram que a contaminação fecal da casca do ovo fértil como uma das principais vias de transmissão de *E. coli* patogênica para as pintainhas, devido à penetração da bactéria da superfície do ovo para o seu interior.

As pintainhas que são infectadas na fase embrionária e sobrevivem ao nascimento, à disseminação da bactéria nos primeiros quatro dias de vida da ave, podem apresentar casos de infecções graves e comprometer o seu desenvolvimento, tornando-as portadoras e susceptíveis a várias enfermidades. As perdas econômicas são elevadas, podendo estender-se por toda vida da ave (BARNES et al., 2003; VANDEKERCHOVE et al., 2004).

MONTGOMERY et al. (1999) avaliaram experimentalmente as conseqüências da infecção por *E. coli* em ovos embrionados. Nesse estudo os ovos embrionados foram separados em três grupos: grupo 1 - inoculado com *E. coli*, grupo 2 - não inoculado, mas, que tiveram contato com os ovos inoculados e o grupo 3 - controle negativo, ou seja, que não foram inoculados e não tiveram contato com os ovos inoculados. Para o preparo do inóculo, uma cepa de *E. coli* pertencente ao sorogrupo O35, resistente ao ácido nalidíxico, obtida de processo inflamatório subcutâneo de aves foi utilizada. A concentração do inóculo foi padronizada a uma concentração de 3×10^8 UFC/mL. No 12º dia de incubação, a inoculação foi realizada na cavidade alantóide dos ovos embrionados. Durante o restante do período de incubação, o grupo 3 (controle negativo), ficou em um equipamento de incubação separado dos outros dois grupos, e o grupo 1 e 2 ficaram em um mesmo equipamento. O índice da taxa de eclosão dos ovos do grupo 3 (controle negativo) e dos ovos do grupo 2 (que tiveram contato com os ovos inoculados) foi de 80,0%, enquanto que para os ovos que receberam a inoculação foi de apenas 20,0%. Todos os pintinhos que nasceram foram avaliados quanto ao seu

desenvolvimento corporal até o 21º dia de idade. O desenvolvimento das aves do grupo que recebeu o inóculo foi significativamente menor, quando comparado com os demais grupos.

Em aves com 4 a 9 semanas de idade, os quadros respiratórios causados pela *E. coli* são mais preocupantes. O trato respiratório superior é considerado a principal porta de entrada utilizada pela bactéria, que coloniza e se multiplica nesses tecidos, com posterior disseminação para os sacos aéreos e tecidos adjacentes (FERREIRA & KNÖBL, 2000).

Agentes infecciosos capazes de lesar o epitélio respiratório ou que interfiram no sistema imune podem tornar as aves mais suscetíveis a colibacilose. Dentre os principais agentes infecciosos associados à colibacilose podemos citar: *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae*, *Pasteurella multocida*, *Haemophilus paragallinarum*, Pneumovírus, vírus da Bronquite Infecciosa (IBV - incluindo vírus vacinal), Doença de Marek (MD) e de Newcastle (NCD), Doença Infecciosa Bursal (GB) (Gumboro) e presença de micotoxinas na ração (FERREIRA & KNÖBL, 2009).

As aves adultas são mais predispostas à ocorrência de salpingite, pois esta infecção foi amplamente associada ao nível hormonal da ave de postura. Infecções experimentais têm mostrado que a colonização do oviduto por *E. coli* é maior quando o nível de estrógeno está elevado (BARNES et al., 2003).

VANDEKERCHOVE et al. (2004a) relatam que na Europa casos de mortalidade aguda por colibacilose em galinhas de postura comercial têm sido observados desde meados dos anos 90. Foi descrita a ocorrência de casos de colibacilose no norte da Bélgica, onde 40 lotes de galinhas com idade de 21 a 87 semanas foram acompanhados, sendo 20 lotes com colibacilose e 20 lotes controles, os quais foram definidos segundo a mortalidade e isolamento da bactéria em órgãos. As amostras isoladas de *E. coli* foram analisadas quanto ao sorogrupo e a detecção de fímbria P. O sorogrupo predominante dos lotes com colibacilose foi O78 e a presença da fímbria P foi maior entre os isolados dos lotes com colibacilose. As notificações dos casos de mortalidade ocorreram no período de pico de postura, ou seja, de 20 a 40 semanas,

chegando a 70% dos casos. Em um dos lotes do grupo com colibacilose a mortalidade chegou a 9,19% e a queda de produção foi de 2,2 a 5,6%.

VANDEKERCHOVE et al. (2004b), dando seguimento ao trabalho mencionado acima (VANDEKERCHOVE et al., 2004a), pesquisou nos mesmos lotes de aves a presença de anticorpos e títulos para os vírus da Bronquite Infecciosa, de Newcastle, do Pneuovírus Aviário, *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae* e *Ornithobacterium rhinotracheae*. Nenhuma associação significativa foi vista entre os casos de colibacilose e os anticorpos dos respectivos agentes, indicando que APEC pode ter atuado como patógeno primário da infecção.

Em um terceiro trabalho, dando seguimento aos trabalhos mencionados acima (VANDEKERCHOVE et al., 2004a; VANDEKERCHOVE et al. 2004b), os autores pesquisaram as distâncias entre as granjas e o número de aves alojadas na gaiola e concluíram que a proximidade entre as granjas e a densidade de aves alojadas na gaiola são importantes fatores de riscos para a transmissão de APEC em galinha de postura comercial (VANDEKERCHOVE et al., 2004c).

2.4. Epidemiologia das infecções por APEC

Partículas de poeira podem conter de 10^5 a 10^6 UFC de *E. coli* por grama. Através da inalação de partículas contaminadas as aves podem se infectar, pois a bactéria é facilmente isolada do trato respiratório superior das aves. As secreções das aves infectadas podem facilitar a disseminação da bactéria, ocorrendo através do contato com as outras aves ou da contaminação da água usada na dessedentação ou da ração (DHO-MOULIN & FAIRBROTHER, 1999).

Para as pintainhas a contaminação do ovo com fezes é a principal via de transmissão da bactéria, pois a mesma pode penetrar pelos poros da casca e contaminar o interior do ovo, causando no embrião um comprometimento do saco vitelino, ou até mesmo sua morte. Nesses quadros de infecção, a *E. coli* pode ser isolada em até 70,0%. Além da contaminação fecal da casca do ovo, existe também a

possibilidade de transmissão ovariana de galinhas infectadas para a progênie (BARNES et al., 2003).

As aves silvestres são consideradas importantes reservatórios naturais da bactéria. Estudos têm indicado que a bactéria pode ser facilmente isolada de várias espécies como de passeriformes “Starling” europeu e especialmente de aves aquáticas de vida livre, principalmente em patos (FALLACARA et al., 2001).

A mobilidade e a migração dessas aves são importantes fenômenos biológicos e um fator potencialmente crucial de epizootia. IKUNO et al. (2008) em estudo desenvolvido com aves silvestres (passeriformes) sem sinais clínicos de colibacilose, na cidade de São Paulo, isolaram 57 amostras de *E. coli* do trato respiratório, que foram analisadas quanto a presença de genes de virulência e quanto a resistência antimicrobiana. Os resultados mostraram que dos oito genes de virulência pesquisados (*cva/cvi*, *vat*, *tsh*, *iucD*, *irp2*, *papC*, *iss* e *astA*), sete deles estavam presentes entre os isolados, sendo que a maioria destes isolados (61,4%) foram positivos para o gene *irp2* e quando associado ao gene *iucD* (24,6%) foram positivos e com gene *iss* (24,7%). Neste mesmo trabalho, quando o percentual de ocorrência de genes de virulência das amostras de *E. coli* isoladas de aves silvestres foram comparados ao percentuais de ocorrência para os mesmos genes de virulência isolados galinha de postura comercial em trabalho desenvolvido por IKUNO et al. (2006), apenas o gene *astA* apresentou baixa porcentagem (1,7%) entre os isolados de aves silvestres. Quanto à resistência antimicrobiana dos isolados de aves silvestres, foram observados estirpes com resistência múltipla (três ou mais antibióticos) e todas as estirpes estudadas foram resistentes a lincomicina.

E. coli patogênicas podem ser introduzidas em lotes de aves comerciais através da água (NAGI, 1972). GAMA et al. (2004) estudaram a água de poços de captação, reservatório e galpões de 20 granjas de galinha produtoras de ovos comerciais no Estado de São Paulo e constataram que 48,3% das amostras de água estudadas estavam contaminadas por *E. coli*. Dentre as amostras positivas, 50,0% foram coletadas de poços de captação, 20,0% de reservatórios e 75,0% de galpões.

A qualidade microbiológica da água de dessedentação oferecida às galinhas pode influenciar em seu desempenho. TOGASHI et al. (2008) compararam a concentração de coliformes na água de dessedentação das aves em dois tipos de bebedouros utilizados em instalações comerciais, o tipo “nipple” e o tipo taça. Os resultados indicaram que na água oferecida as galinhas em bebedouro tipo taça a concentração de coliformes totais foi superior quando comparada as amostras do bebedouro tipo “nipple”. Os resultados demonstraram que em galinhas criadas com bebedouro “nipple”, onde a concentração de coliformes foi menor, houve uma maior produção de ovos e melhor conversão alimentar.

Fezes de roedores frequentemente contêm *E. coli* patogênica (BARNES et al., 2003). Moscas e ácaros como o *Dermanyssus gallinae* podem atuar também como vetores na transmissão de APEC para as aves (AXTELL & ARENDS, 1990; ZANDER et al., 1997).

E. coli pode ser introduzida na granja através da ração oferecida às aves ou através da matéria prima para o preparo da mesma. Em um estudo realizado em Portugal, foram isoladas 163 estirpes de *E. coli*, provenientes de 23 amostras de ração de frango de corte e de 66 amostras de matéria prima (DA COSTA et al., 2007).

2.5. Fatores de virulência de APEC

Algumas estirpes possuem estruturas, produtos ou estratégias que contribuem para aumentar sua capacidade em causar uma infecção, que são chamados de fatores de virulência (SIRCILLI & TRABULSI, 2005).

Para as aves, apenas estirpes patogênicas, podem causar a colibacilose, ou seja, aquelas que apresentam os fatores de virulência associados às amostras de origem aviária (FERREIRA et al., 2009). Entre as APECs, vários potenciais fatores de virulência têm sido identificados e acredita-se ser multifatorial, porém os mecanismos de patogenicidade ainda não foram completamente compreendidos (JANN & JANN, 1997).

Entre os principais fatores de virulência podemos citar: a presença de antígenos capsulares K1 e K80, a produção de colicinas (Col V), produção de sideróforos (Aerobactina), presença de fímbrias, produção de citotoxinas, endotoxinas (LPS) e os fatores de resistência sérica (FERREIRA & KNÖBL, 2009).

2.5.1. Colicinas

Certas amostras de *E. coli* patogênica para o homem, bovino, suínos, aves e outros animais, apresentam a capacidade de sintetizar determinadas substâncias que inibem o crescimento de diferentes espécies bacterianas no nicho onde está presente, denominadas de colicinas (REEVES, 1972). Tais substâncias possuem duas subunidades protéicas. A subunidade maior é responsável pela lesão celular bacteriana, enquanto a menor tem como função a autoproteção contra sua própria colicina (HARDY et al., 1975). Dessa forma, estas colicinas inibem o crescimento de diferentes espécies bacterianas no nicho onde está presente (DHO & LAFONT, 1982).

Essas colicinas são produzidas por genes localizados nos plasmídeos colicinogênicos (plamídios Col), sendo as colicinas Ia, IB, E1, E2, E3, I, K, B e V, as mais conhecidas (FANTINATTI et al., 1994; SILVEIRA et al., 2002).

A maioria das cepas APECs tem o plasmídeo colicina V (WRAY & WOODWARD, 1997). O gene *cva/cvi* responsável pela produção de colicina V está localizado no plasmídeo bacteriano (KAWANO et al., 2006).

Vários genes de virulência estão localizados no plasmídeo ColV, mutações neste plasmídeo, demonstraram a diminuição da virulência bacteriana, sugerindo que alguns genes ligados a este plasmídeo estão envolvidos no estabelecimento de infecção aviária (SKYBERG et al., 2008).

2.5.2. Sistema de aquisição de ferro

.A capacidade de se multiplicar em meios com restrição do íon ferro é um fator de virulência comum em microrganismos que causam infecções sistêmicas em humanos e animais (GRIFFITHS, 1997; SUSSMAN, 1997).

Apesar do ferro ser encontrado em abundância nos tecidos e fluidos corporais, a quantidade disponível é extremamente pequena, essa limitada disponibilidade de ferro é um mecanismo de defesa do hospedeiro, pois impede o desenvolvimento dos microrganismos que necessitam desse elemento. Nas condições fisiológicas, o ferro se encontra ligado a glicoproteínas ou está em forma insolúvel. Para superar esta limitação a bactéria pode possuir sistemas especiais de assimilação, através dos quais ela capta o ferro necessário via componentes ligantes de ferro de baixo peso molecular, chamados sideróforos (NEILANDS, 1981).

E. coli podem efetuar o transporte deste mineral por meio dos sistemas ferricromo, citrato, enterobactina e aerobactina (WOODROW et al., 1978). A aerobactina, é a forma de captação e transporte de ferro mais utilizada pela bactéria, é um sideróforo de 565 KDa, produzida por um operon biossintético que codifica enzimas da via metabólica. É sintetizada principalmente na fase exponencial e na fase estacionária de crescimento (STUART et al., 1980).

Este sideróforo é excretado ao meio e se liga ao íon férrico formando um complexo estável, através do qual o ferro é transportado para o citoplasma. É importante salientar que a aerobactina após cumprir sua função é reciclada continuamente no interior da célula e exportada para carrear outro íon ferro, o que implica em economia de energia (BRAUN, 2003).

Em APEC, o gene *irp2*, encontrado no cromossomo bacteriano, que codifica uma proteína envolvida na biossíntese de um sideróforo, descrito em *Yersinia* spp e em linhagens de *E. coli* enteroagregativas e o gene *iucD* que codifica para a aerobactina, também foram encontrados com alta frequência (JANßEN et al., 2001; KAWANO et al., 2006).

2.5.3. Adesinas

A aderência da bactéria nas células do hospedeiro pode ser considerada um pré-requisito para a ocorrência da colonização, multiplicação bacteriana e invasão de tecidos (BEACHEY, 1981).

Segundo ISAACSON (1985), qualquer estrutura presente na superfície celular bacteriana que medeia sua adesão a uma célula animal é uma adesina e as que se ligam a eritrócitos são denominadas hemaglutininas.

A fímbria P é considerada uma adesina importante em infecções por *E. coli*, foi inicialmente encontrada em estirpes de *E. coli* associadas a infecção do trato urinário em humanos (KALLENIUS et al., 1980) e tem sido encontrada também em linhagens APEC (DOZOIS et al., 1992).

Uma das características utilizadas na identificação de fímbrias é através de suas propriedades adesivas, que são inibidas ou não pelo carboidrato D-manose, receptor celular da fímbria. A fímbria P é considerada D-manose resistente (MOON, 1990).

POURBAKSHS et al., (1997) demonstraram a expressão “in vivo” das fímbrias P e após a inoculação experimental em aves concluíram que a fímbria P estaria envolvida na colonização de órgãos internos e no desenvolvimento de septicemias. A fímbria P é codificada pelo operon *pap* (pili associado com pielonefrite) (NORMARK et al., 1983). O gene *papC* responsável pelo fator de adesão que codifica para a fímbria P é encontrado no cromossomo bacteriano (KAWANO et al., 2006).

Outra adesina, afimbrial, importante na adesão bacteriana, é a proteína “Temperature Sensitive Hemagglutinin” (TSH). Esta proteína, codificada pelo gene *tsh*, está relacionada à atividade de hemaglutinação de eritrócitos de galinhas, sendo preferencialmente expressa a baixas temperaturas (26-30°C) e reprimida a 42°C em linhagens de APEC (PROVENCE & CURTISS, 1994). O gene *tsh* essa proteína é encontrado no plasmídeo ColV (KAWANO et al., 2006).

Estudos realizados por STATHOPOULOS et al., (1999) sugerem que a proteína (TSH) seja proteoliticamente processada durante sua maturação resultando em 2 proteínas: uma proteína secretada de 106 KDa (denominada Tsh_s) e uma outra proteína de membrana externa de 33 KDa (denominada Tsh_β). Observações demonstraram que a secreção de Tsh_s ocorre principalmente a 42°C (temperatura corporal da ave), e que a atividade de hemaglutinação ocorre somente em baixas temperaturas (26°C), sugerem que a forma não processada de *tsh* seja responsável pela atividade de hemaglutinação e que a secreção de Tsh_s ocorra no interior do hospedeiro. Ademais a presença do

gene *tsh* em 46% dos isolados clínicos de *E. coli* e sua completa ausência nos isolados de aves saudáveis sugere sua relação com a patogenicidade de APEC (MAURER et al., 1998). DOZOIS et al. (2000) e DELICATO et al. (2003) constataram que a presença desse gene (*tsh*) contribui para o desenvolvimento de lesões com depósito de fibrina no saco aéreo das aves e aumenta a proporção de colonização da bactéria nesse local.

2.5.4. Resistência sérica

A capacidade de certos microrganismos em resistir aos fatores séricos inibitórios do hospedeiro, especialmente o sistema complemento, tem sido alvo de vários estudos e é considerado como um importante mecanismo de virulência para APEC, sendo considerado fundamental na patogenia da colibacilose aviária, visto que bactérias sensíveis ao soro são incapazes de colonizar órgãos internos (MELLATA et al., 2003).

Aparentemente, existem diversos componentes bacterianos envolvidos no fenômeno de resistência sérica, dentre os quais podemos destacar o lipopolissacarídeo (LPS), a presença de cápsula e a expressão de proteínas de membrana externas, como a proteína Iss “increased serum survival” (WOOLCOCK, 1988; LA RAGIONE & WOODWARD, 2002; LYNNE et al., 2007).

A proteína Iss, codificada pelo gene *iss*, é uma lipoproteína de 10-11 KDa localizada na membrana externa bacteriana, contém 102 aminoácidos e é resistente a hidrólise ácida (NOLAN et al., 2003). Esta proteína é responsável pelo bloqueio do complexo terminal do sistema complemento que atua na membrana celular causando a lise bacteriana (BINNS et al., 1982). A habilidade em restringir o depósito da proteína C3 do sistema complemento sobre a superfície bacteriana confere ao microrganismo a capacidade de sobreviver na presença do soro (DHO-MOULIN & FAIRBROTHER, 1999), driblando o sistema complemento, o qual é o principal mecanismo de defesa do hospedeiro contra infecções bacterianas, já que promove a opsonização ou mesmo a lise do agente infeccioso (BINNS et al., 1982). O gene *iss* foi encontrado no plasmídeo ColV e no cromossomo bacteriano (JONHSON et al., 2006; PFAFF-MCDONOUGH et al., 2000; WATERS & CROSA, 1991).

PFAFF-McDONOUGH et al., (2000) estudaram a presença do gene *iss* em cepas consideradas patogênicas e não patogênicas e obtiveram uma maior frequência do gene entre as cepas patogênicas, sugerindo que o fator *Iss* esteja associado com a patogenicidade das APEC.

NOLAN et al. (2002) e GIBBS et al. (2003) indicam o gene *iss* como um marcador de virulência de estirpes patogênicas nas aves, uma vez que a expressão desse gene frequentemente prediz seus efeitos patogênicos.

2.5.5. Toxinas

Algumas linhagens de *E. coli* são capazes de produzir toxinas, como por exemplo, as enterotoxinas termolábeis (LT) e termoestáveis (ST) (SMITH & GYLES, 1970), e as verotoxinas, conhecidas também como “shiga-like toxins” (SLT) (EMERY et al., 1992; FANTINATTI et al., 1994; PARREIRA & YANO, 1998).

PARREIRA & GYLES (2003) descreveram uma toxina de vacuolização que foi expressa em cepas APEC. Esta toxina é codificada pelo gene *vat* “vacuolating toxina autotransporter” que pertence a uma ilha de patogenicidade e induz a formação de vacúolos intracelulares, resultando em efeitos citotóxicos. Ilhas de patogenicidade (PAIs) são regiões no genoma de certas bactérias patogênicas, que incluem gene de virulência que são ausentes em cepas não patogênicas (HACKER et al., 1997).

PARREIRA & GYLES, (2003), em estudo realizado com cepa mutante, EC222 demonstraram que a exclusão do gene *vat* na cepa acarretou a perda da virulência em modelos de infecção respiratória e celulite da doença em frangos de corte, indicando que o gene *vat* pode estar envolvido na patogenicidade de *E. coli*.

Outra toxina expressa em cepas patogênicas para aves é chamada de *Escherichia coli* enteroagregativa endotoxina termo estável 1 (EAST1). O gene que codifica a toxina é o *astA*, do qual foi primeiramente observado em cepas de *E. coli* enteroagregativa (EAggEC) (MÉNARD et al., 2002). Tanto esse, como o gene *vat* são encontrados no cromossomo bacteriano (KAWANO et al., 2006).

2.6. PCR – Para a detecção de genes de virulência em APEC

Trabalhos envolvendo a inoculação experimental seguidos por métodos de biologia molecular, como a PCR, têm auxiliado na compreensão da importância de alguns dos fatores de patogenicidade das APEC (DHO & LAFONT, 1982; POURBAKHS et al., 1997; MARC et al., 1998, MONROY et al., 2005).

Através da técnica da PCR foi possível fazer a amplificação de um segmento específico do genoma da *E. coli* analisada, permitindo a obtenção “in vitro” de várias cópias de determinada região do DNA. Sequências gênicas de determinado microrganismo podem ser amplificadas utilizando-se “primers” (sequências iniciadoras) complementares àquelas sequências em locais específicos do genoma. Ocorre a extensão do fragmento de DNA a partir dos “primers”, pela ação de uma DNA polimerase termoestável, a taq DNA polimerase. Antes da extensão o DNA é desnaturado e o “primer” anelado, sendo os ciclos (desnaturação; anelamento; extensão) repetidos várias vezes, permitindo a amplificação exponencial daquela sequência específica. A detecção de determinado agente é indicada pela formação de um produto de amplificação de tamanho definido e correspondente a região limitada pelos primers “forward” e “reverse”. Uma variação da PCR, a técnica multiplex PCR, usa múltiplos pares de “primers” dirigidos a vários genes que são capazes de amplificar fragmentos de diferentes genes.

Entre os genes de virulência que podem servir como marcadores para a identificação de surtos da infecção (EWERS et al., 2005) destacam-se o gene para fímbria-P (*papC*), relacionado ao fenômeno de adesão, o gene *tsh*, que codifica para uma hemaglutinina sensível à temperatura, o gene *irp2* que codifica para o sistema de aquisição de ferro pela bactéria, o gene *iucD* que codifica a aerobactina, o gene *iss* que codifica uma proteína para aumento da sobrevivência no soro, o gene *cva/cvi* que codifica o plasmídeo da colicina V, o gene *astA*, que codifica uma toxina enterogregativa estável ao calor, assim como o gene *vat*, que codifica a toxina de vacuolização.

2.7. RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS

Os antimicrobianos são medicamentos vitais para o tratamento de infecções bacterianas em seres humanos e em animais (SILVA, 2008).

Na avicultura, um dos objetivos do uso dos antimicrobianos é a redução das perdas econômicas. O seu uso na prevenção de infecção é uma medida muito utilizada para minimizar os danos causados por infecções bacterianas e para reduzir a incidência de mortalidade associada com as doenças aviárias. No entanto, a utilização incorreta de antibiótico, o seu uso na alimentação animal com objetivos terapêuticos, profiláticos e de promoção de crescimento são os principais responsáveis pela presença da resistência aos antibióticos por bactérias patogênicas para animal e para o homem (SILVA, 2008).

Por sua vez, estas bactérias resistentes podem ser transferidas de animais para seres humanos, especialmente nos indivíduos que trabalham diretamente com animais ou em indústrias de processamento tecnológico de produtos de origem animal (PARSONNET & KASS, 1987; BARTON, 2000).

III. OBJETIVOS

3.1. Geral

Caracterizar fenotipicamente e genotipicamente estirpes de *E. coli* isoladas de pintainhas com sete dias de idade, apresentando menor tamanho e emplastamento de fezes na cloaca, das granjas para postura comercial de ovos de mesa, do município de Bastos no Estado de São Paulo.

3.2. Específicos

3.2.1 Isolar estirpes de *E. coli* de fígados e intestinos;

3.2.2. Determinar a patogenicidade dos isolados através de inoculação “in vivo”;

3.2.3. Determinar os sorotipos O:H das estirpes classificadas como patogênicas (de alta ou intermediária patogenicidade);

3.2.4. Pesquisar a presença de oito genes de virulência (*astA*, *iss*, *irp2*, *papC*, *iucD*, *tsh*, *vat*, *cva/cvi*), através da PCR multiplex das estirpes patogênicas (de alta ou intermediária patogenicidade);

3.2.5. Avaliar a susceptibilidade antimicrobiana de todas as estirpes isoladas.

IV. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Lotes de aves

Foram utilizados neste estudo 20 lotes de pintainhas de postura comercial com sete dias de idade, de variedade branca e leve e também vermelha e leve. As aves foram adquiridas para reposição por granjas de postura comercial do município de Bastos, Estado de São Paulo, durante o período de 03 de agosto de 2008 a 12 de março de 2009.

O número de pintainhas que se encontravam alojadas na granja em cada lote estudado variou de 2.396 a 33.0000 aves. Em todas as propriedades, as aves estavam alojadas em galpões convencionais, denominados galpões de “cria”, com instalações de gaiola galvanizada com bebedouros tipo taça ou “nipple”, ou em piso com bebedouros tipo tubular.

4.2. Coletas das amostras

Quinze pintainhas de cada lote, apresentando menor tamanho e com cloaca emplastada de fezes foram selecionadas para o estudo.

As aves foram levadas à Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento de Bastos, onde foram necropsiadas e colhidos assepticamente um “pool” de fragmentos de fígados e intestinos (em frascos separados) de cada lote, para o isolamento e a identificação de *E. coli*.

4.3. Procedimento microbiológico para o isolamento e identificação de *Escherichia coli*

Para o isolamento e a identificação das estirpes de *E. coli* foi seguida a técnica descrita por FERREIRA & KNÖBL (2009).

4.3.1 Pré-cultivo

Os órgãos foram cultivados em Caldo BHI (Oxoid CM0225) e incubados a 37°C por 24 horas.

4.3.2. Plaqueamento

As amostras de fígados e intestinos cultivadas em caldo BHI foram plaqueadas, com o auxílio de uma alça de inoculação (loop), em ágar Eosina Azul de Metileno (EMB) (Oxoid CM 069). A seguir, as placas foram incubadas a 37°C por 24 horas.

4.3.3. Identificação bioquímica

Três a cinco colônias por placa, com características sugestivas de pertencerem ao gênero *E. coli* ou seja fermentadoras de lactose, esverdeadas com aspecto metálico, foram inoculadas individualmente, com o auxílio de estilete de níquel-cromo, em tubos contendo o ágar tríplice açúcar ferro (TSI) (Oxoid CM 0277) inclinado. Em seguida os tubos foram incubados a 37°C por 24 horas.

Quando a amostra semeada no TSI apresentou comportamento típico de *E. coli*, ou seja, fermentação da glicose e lactose, com produção de gás, as mesmas foram confirmadas pela série bioquímica, com base nos testes de utilização de citrato, produção de indol, reações de vermelho de metila e Voges-Proskauer (KONEMAN et al., 2001; QUINN et al., 2005).

Para o teste de utilização do citrato, o meio de cultura utilizado foi o ágar Citrato de Simmons (Difco 212138). Uma alçada do inóculo do tubo de TSI foi transferida para tubos contendo o meio de cultura e semeada em sua superfície inclinada. Logo após os mesmos foram incubados a 37°C por 24 horas. O crescimento foi indicativo de teste positivo com a viragem da cor do indicador azul de bromotimol de verde para azul e o não crescimento e a não alteração da cor do meio foi indicativa de teste negativo.

No teste de indol, foi utilizado tubo contendo solução salina peptonada 1% (Difco 21805), incubado a temperatura de 37°C por 24 horas. Após a incubação foram adicionadas, no interior do tubo, três a cinco gotas do Reativo de Kovacs. O

aparecimento de um anel vermelho na superfície caracterizou resultado positivo e a presença de anel amarelo caracterizou resultado negativo.

Para o teste do vermelho de metila e Voges-Proskauer, o meio de cultura utilizado foi o caldo MR-VP (Oxoid CM 0043). Os tubos contendo os meios foram inoculados e incubados a 37°C durante 24 horas. Após esse período de incubação foram adicionadas cinco gotas da solução de vermelho de metila e o aparecimento de uma coloração vermelha caracterizou a prova como positiva. Para o teste Voges-Proskauer, 20 gotas de solução de hidróxido de potássio a 40% e 7 gotas da solução de alfa-naftol a 5% foram adicionados. A produção de coloração vermelha indicou como reação positiva. A permanência do meio na cor do reagente, amarela ou ligeiramente verde, indicou teste negativo.

Como controle positivo foi utilizada a cepa EC 55 cedida pelo Laboratório de Ornitopatologia da USP.

Foram considerados como *E. coli* as amostras que apresentaram as seguintes características: Indol (+), Vermelho de Metila (+), Voges-Proskauer (-) e Citrato (-).

Todas as amostras isoladas foram conservadas em ágar Luria Bertani (LB), para posteriores análises.

4.4 . Teste de patogenicidade em pintos de um dia de idade

O teste foi conduzido no galpão experimental da Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento de Bastos do Instituto Biológico. As aves foram alojadas em gaiolas de arame galvanizado e receberam ração comercial esterilizada e água à vontade durante todo o período experimental.

O teste foi realizado de acordo com a metodologia descrita por KNÖBL (2005) e MONROY et al. (2005). Pintinhos com um dia de idade, foram inoculados com 0,1 mL de cada cultura bacteriana, no saco aéreo torácico esquerdo. Para a preparação do inóculo foi semeada uma colônia de cada estirpe bacteriana em 10 mL de caldo BHI (Oxoid CM0225), incubando-se por 18 horas a 37°C e em seguida diluindo a mesma

numa proporção de 1:10. A concentração do inóculo foi padronizada em 10^7 unidades formadoras de colônias/mL (UFC/mL). Para cada estirpe e também para os controles positivo e negativo, foram utilizados grupos de 10 aves.

E. coli isolada de frangos de corte com doença respiratória crônica (DRC) - EC 55 (sorogrupo O1, *iss+* *papC+* *iucD+* *cva/cvi+*) pertencente à coleção de culturas de *E. coli* do Laboratório de Ornitopatologia da USP, foi utilizada como controle positivo. As aves usadas como controle negativo foram inoculadas com caldo BHI.

As aves foram mantidas em observação durante 10 dias, e, de acordo com o índice de mortalidade, as estirpes foram classificadas em alta (mortalidade $\geq 80\%$), intermediária (mortalidade $> 50\%$ e $< 80\%$), baixa patogenicidade (mortalidade $\leq 50\%$) e não-patogênica (mortalidade zero).

Neste período as aves foram avaliadas clinicamente (ausência ou presença de sinais clínicos). Todas as aves foram necropsiadas (as que morreram antes dos 10 dias e as que sobreviveram até o final do teste).

4.5. Determinação dos fatores de virulência através da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

4.5.1 Cepas bacterianas

Todas as estirpes classificadas no teste de patogenicidade como de alta e de intermediária patogenicidade foram analisadas através da PCR multiplex.

Como controle positivo foram utilizadas as cepas EC 29 (*iss+*, *irp2+*, *iucD+*, *tsh+*, *vat+*, *cva-cvi+*) e EC 30 (*iss+*, *irp2+*, *iucD+*, *tsh+*, *vat+*, *cva/cvi+*). Estas cepas foram isoladas de galinhas de postura comercial e pertencem a bacterioteca do Laboratório de Imunologia do Instituto Biológico.

4.5.2. Extração do DNA

A extração do DNA das estirpes de *E. coli* foi realizada, utilizando-se o kit Wizard Genomic DNA Purification, cat #A1120 – Promega Corporation.

4.5.3. Procedimento para detecção dos genes

A reação de PCR multiplex foi realizada segundo descrito por EWERS et al. (2005), com algumas modificações.

As estirpes foram analisadas quanto à presença dos genes *astA*, *iss*, *irp2*, *papC*, *iucD*, *tsh*, *vat*, *cva/cvi* cujas sequências dos oligonucleotídeos, tamanho dos fragmentos e as referências bibliográficas utilizadas estão apresentadas na (Tabela 1).

A reação de PCR multiplex foi feita empregando os seguintes parâmetros: 2 µL de cada amostra de DNA extraído, adicionado a uma mistura de reação contendo de 1,25 a 2,5 µL de cada par de “primer” (0,5 a 1 µM) (IDT/PRODIMOL), 1 µL de cada dNTP (400 µM); 2,5 µL de tampão de PCR (10x), 4 µL de 4 mM de MgCl₂ e 2,5 U de *Taq* DNA polimerase (*Taq* DNA Polymerase, Fermentas), obtendo um volume total de 25 µL. O marcador de tamanho molecular utilizado foi o 100 bp DNA Ladder (Fermentas - Europe).

As amplificações foram feitas em um termociclador GeneAmp PCR Sytem 2400 Perkin Elmer nas seguintes condições: t₁, 3 min a 94° C; t₂, 30 seg a 94°C, t₃, 30 seg a 58°C; t₄, 3 min a 68°C; (t₂-t₄ 30 ciclos repetidos) e t₅ 10 min a 72°C.

Tabela 1. Sequência de oligonucleotídeos iniciadores utilizados na reação de PCR Multiplex para amplificação dos fragmentos dos genes *astA*, *iss*, *irp2*, *papC*, *iucD*, *tsh*, *vat*, *cva/cvi* de *E. coli*.

Gene	Primer (5'→3')	Localização no gene	Nº de acesso	Tamanho (pb)	Referência do "primer"
<i>astA</i>	TGC CAT CAA CAC AGT ATA TCC	797-817	AF143819	116	Sanger et al., 1977
	TCA GGT CGC GAG TGA CGG C	912-894			
<i>iss</i>	ATC ACA TAG GAT TCT GCC G	(-) 10- (-) 28	X52665	309	Dozois et al., 1992
	CAG CGG AGT ATA GAT GCC A	282- 264			
<i>irp2</i>	AAG GAT TCG CTG TTA CCG GAC	22-42	L18881	413	Janßen et al., 2001
	AAC TCC TGA TAC AGG TGG C	434-416			
<i>papC</i>	TGA TAT CAC GCA GTC AGT AGC	1284-1304	Y00529	501	Franck et al., 1998
	CCG GCC ATA TTC ACA TAA	1784-1767			
<i>iucD</i>	ACA AAA AGT TCT ATC GC TCC	239-259	M18968	714	Franck et al., 1998
	CCT GAT CCA GAT GAT GCT C	952-934			
<i>tsh</i>	ACT ATT CTC TGC AGG AAG TC	132-151	AF218073	824	Dozois et al., 1992
	CTT CCG ATG TTC TGA ACG T	955-937			
<i>vat</i>	TCC TGG GAC ATA ATG GTC AG	1076-1095	AY151282	981	Dozois et al., 1992
	GTG TCA GAA CGG AAT TGT	2056-2038			
<i>Cva A/B</i>	TGG TAG AAT GTG CCA GAG CAA G	1925-1904	AJ223631	1181	Dozois et al., 1992
<i>Cvi cvaC</i>	GAG CTG TTT GTA GCG AAG CC	10745-10764			

4.5.4 Eletroforese em gel de agarose

A análise dos produtos amplificados foram realizada por eletroforese (50V por 180 minutos) em gel de agarose a 1,5% em tampão TAE (Tris-acetado 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) e evidenciada com brometo de etídio (0,5 µg/mL). A imagem do gel sob luz

UV foi registrada em fotodocumentador Alpha Imager¹²²⁰ (Alpha Innotech Corp.) acoplado a um computador.

4.6 Sorotipagem

As estirpes de *E. coli* de alta e intermediária patogenicidade foram sorotipadas para a determinação dos antígenos O e H. As análises foram realizadas no Laboratório de Antígenos Bacterianos II, do Departamento de Microbiologia e Imunologia, do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, com a coleção de antissoros anti-O e anti-H do próprio Laboratório.

4.6.1 Determinação do sorogrupo (antígeno O)

A determinação do sorogrupo foi realizada de acordo com a técnica de soroaglutinação em microplaca (GUINÉE et al., 1972; BLANCO et al., 1992).

As estirpes foram semeadas em ágar Tryptic Soy (TSA) (Acumedia) a fim de obter um grande número de células e incubadas a 37°C por 24 horas. Após esse período as amostras bacterianas foram suspensas em salina 0,15 M, até que a turbidez fosse compatível ao tubo 6 ($1,8 \times 10^9$) da escala de MacFarland. Os tubos contendo as suspensões foram aquecidos a 100°C por 1 hora em banho-maria. Após esse procedimento, quando a temperatura da suspensão atingiu a temperatura ambiente, foi adicionado igual volume de salina com formol 0,5% e violeta genciana a 0,005% e mantidas sob refrigeração até o momento do uso. Observação: aquelas estirpes que apresentaram precipitado após o aquecimento foram consideradas rugosas.

As estirpes foram testadas em placas de poliestireno com fundo em V, utilizando-se 50 µL de amostra e igual volume de antissor, inicialmente diluído a 1:80. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. A leitura do resultado foi realizada de acordo com a presença ou ausência de botão, que foi observada a olho nu. A presença de botão era considerada reação negativa, ausência de botão a reação era considerada positiva. Considerou-se determinado o antígeno O, quando a maior diluição do antissor que

aglutinou com o antígeno homólogo. Foi utilizada a coleção de antissoros anti-O (O1 a O185).

4.6.2 Determinação do antígeno “H”

A determinação do antígeno H foi realizada segundo a técnica descrita por EDWARDS & EWING'S (1986). As estirpes de *E. coli* foram semeadas em tubos contendo meio de cultura semi-sólido MILI (TOLEDO et al., 1982) e incubadas a 37°C por 24 horas. Aquelas que se apresentaram imóveis foram classificadas como H⁻ (negativo). As amostras que apresentaram motilidade foram semeadas em tubos U contendo caldo BHI com 0,2% de ágar e incubadas a 37°C por 24 horas, ou até que o crescimento tivesse atingido a extremidade oposta á inicialmente semeada. Este procedimento foi repetido por cinco passagens consecutivas. Observando-se que o repique seguinte era obtido da extremidade oposta daquela inicialmente semeada.

A partir do último tubo U semeado, as amostras bacterianas foram repicadas para tubos contendo 7 mL de caldo BHI e incubadas a 37°C em estufa com agitação orbital por 6-8 horas ou até que a turbidez fosse compatível ao tubo 2 (6×10^8) da escala de MacFarland. Em seguida foram inativadas pela adição de igual volume de salina 0,15 M contendo 1,0% de formol e mantidas “overnight” em temperatura ambiente. As suspensões foram mantidas sob refrigeração até o momento de seu uso.

A determinação do antígeno H foi realizada através de reações de aglutinação em tubo “Khan”. Em cada tubo foram adicionados 250 µL da suspensão bacteriana (antígeno) e 250 µL de diferentes diluições dos antissoros, iniciando com a diluição 1:100. A mistura foi incubada em banho-maria a 45°C por 3 horas.

Reação positiva foi aquela em que se observou a formação de grumo no fundo do tubo e o sobrenadante com aspecto transparente, enquanto que na reação negativa o sobrenadante permaneceu turvo. O antígeno H da amostra de *E. coli* foi identificado, quando reagiu com o antissoro em título igual ao antígeno H padrão de controle.

4.7. Teste de susceptibilidade antimicrobiana

O teste de susceptibilidade a antimicrobianos foi realizado seguindo a metodologia proposta por BAUER e KIRBY (1966) e descrito pelo “National Commite for Clinical Standards” (NCCLS, 2003), atualmente denominado “Clinical and Laboratory Standard Institute” (CLSI), responsável por estabelecer os critérios e a padronização de “breakpoints” para os diferentes antimicrobianos.

Todas as estirpes de *Escherichia coli* isoladas foram semeadas em tubos contendo em 2 mL de caldo BHI (Oxoid CM 0225) e incubadas a 37°C por 18 horas. Após esse período, com o auxílio de uma pipeta “Pasteur” esterilizada, o inóculo foi transferido para tubos contendo 2 mL de solução salina 0,85% esterilizada, em quantidade suficiente para que se obtivesse uma turbidez compatível com o grau 0,5 da escala de MacFarland. Com um suabe de algodão esterilizado o inóculo foi espalhado uniformemente sobre a superfície seca de uma placa contendo ágar Mueller-Hinton (CM 0337). Com o auxílio de uma pinça flambada, foram colocados sobre a superfície do meio os discos dos seguintes antimicrobianos: ampicilina (10 mcg), enrofloxacina (5 mcg), eritromicina (15 mcg), espectinomicina (100 mcg) estreptomomicina (10 mcg), fosfomicina (200 mcg), kanamicina (30 mcg), licomicina (2 mcg), norfloxacina (10 mcg), sulfa+trimetoprim (25 mcg) e tetraciclina (30 mcg). Após esse procedimento as placas foram incubadas a 37°C durante 24 horas. A leitura foi realizada com o auxílio de uma régua milimétrica, medindo-se o diâmetro dos halos inibitórios de cada disco e comparando-se com uma tabela com o padrão interpretativo da zona de inibição em milímetros, determinando-se as estirpes em análise como sensíveis, resistentes ou intermediárias ao antimicrobiano testado.

V. RESULTADOS

Dos 20 lotes de pintainhas estudados, 19 foram positivos para o isolamento de *E. coli*, dos quais foram isoladas 90 estirpes. O número de estirpes isoladas por lote variou de um a seis.

5.1. Patogenicidade das estirpes

A inoculação dos isolados no saco aéreo de pintainhos de um dia de idade, revelou que 23 (25,5%) e 21 (23,3%) das estirpes foram de alta e intermediária patogenicidade respectivamente, enquanto que as estirpes de baixa patogenicidade e não patogênicas tiveram o mesmo número de estirpes para cada classificação, ou seja, 23 (25,5%).

Dezessete lotes (A, B, C, D, E, F, I, J, K, L, M, O, P, Q, R, S, T) apresentaram isolados de alta ou intermediária patogenicidade, que totalizaram 44 estirpes, sendo, 21 (44,7%) isoladas do fígado e 23 (53,5%) do intestino. Os lotes G, H e N, não apresentaram estirpes de alta e intermediária patogenicidade.

O índice de mortalidade das aves inoculadas foi maior no período de 12, 24, 36 e 48 horas pós-inoculação (PI). Após aproximadamente 36 horas (PI), foi observado nas aves infectadas, um quadro de diarreia, seguido de emplastamento de fezes na cloaca. Foi possível observar também que as aves que apresentaram este sinal clínico tiveram o seu desenvolvimento corporal prejudicado (aves de menor tamanho). Ainda, no decorrer desse teste, todas as aves do controle positivo morreram, enquanto que as aves do controle negativo permaneceram vivas até o final.

Lesões macroscópicas foram observadas nas aves que morreram após o quarto dia de inoculação, sendo que as de maior frequência foram: aerossaculite e a infecção do saco vitelino. Ocasionalmente, foram encontradas, pericardite, perihepatite e peritonite com depósito de fibrina e enterite. Tanto os sinais clínicos (diarreia e apatia)

quanto às lesões macroscópicas foram mais frequentemente detectadas em aves inoculadas com amostras de *E. coli* de alta ou de intermediária patogenicidade.

5.2. Sorotipagem (O:H)

Das 44 estirpes analisadas para a determinação do sorogrupo, 26 (59,1%) foram tipáveis das quais foram identificados 11 sorogrupos: O8 (15,9%), O9 (2,3%), O15 (4,5%), O23 (9,1%), O64 (4,5%), O75 (4,5%), O83 (6,8%), O112 (2,3%), O133 (4,5%), O140 (2,3%), O142 (2,3%). Dezoito (40,9%) estirpes foram não tipáveis (NT).

Para a determinação do antígeno H, foram analisadas 42 estirpes, pois 2 não puderam ser caracterizadas, por serem imóveis. Dentre as estirpes analisadas, 24 (57,4%) foram tipáveis do qual foram identificados 11 antígenos: H10 (4,8%), H14 (4,8%), H16 (2,4%), H 17 (23,8%), H18 (4,8%), H21 (2,4%), H40 (4,8%), H42 (2,4%), H46 (2,4%), H51 (2,4%), H53 (2,4%). Dezoito (42,6%) estirpes foram não tipáveis (NT).

Os sorotipos (O:H) de maior prevalência entre as estirpes foram: NT:H17 (20,4%), O23:NT (9,1%), O8:H10 (4,5%), O15:H14 (4,5%), O133:NT (4,5%).

5.3. Determinação dos genes de virulência

A pesquisa de oito genes de virulência associados a APEC realizada através da PCR multiplex revelou que, dentre as 44 estirpes analisadas, todas continham pelo menos um dos oito genes pesquisados. A figura 1 ilustra o eletroforograma de alguns desses perfis.

A Tabela 2 apresenta os resultados da PCR multiplex, de acordo com o número de estirpes e o percentual de ocorrência para cada um dos genes de virulência estudado.

Tabela 2. Número de estirpes *E. coli* e porcentual de ocorrência encontrado para cada genes de virulência estudado.

	Genes							
	<i>iss</i>	<i>iucD</i>	<i>astA</i>	<i>irp2</i>	<i>cva/cvi</i>	<i>tsh</i>	<i>vat</i>	<i>papC</i>
Nº de estirpes	41	19	18	12	8	6	4	3
%	93,2	43,2	40,1	27,3	18,2	13,6	9,1	6,8

Nenhuma dessas estirpes possuía todos os oito genes de virulência pesquisados, porém, trinta e uma (70,4%) apresentaram mais de um gene de virulência. Dezessete perfis genéticos foram identificados, dois deles apresentando apenas um gene, e quinze deles com associação de dois ou mais genes. Foi possível observar uma maior concentração de estirpes nos perfis P13 e P17 (Tabela 4).

A Tabela 3 ilustra os resultados dos ensaios de sototipagem, da PCR multiplex das estirpes classificadas como de alta e intermediária patogenicidade, de acordo com os lotes e órgãos de procedência dos isolados, onde foi possível observar que, estirpes provenientes de um mesmo lote, e de um mesmo órgão apresentaram sorogrupos diferentes com um mesmo perfil genético (lotes C, P, S e T), como também perfis genéticos e sorogrupo diferentes em isolados de um mesmo lote (lotes D, K, L, T).

A Tabela 4 apresenta os perfis genéticos das estirpes de *E. coli* de alta e intermediária patogenicidade, associados aos sorogrupos e a procedência dos órgãos de isolamento.

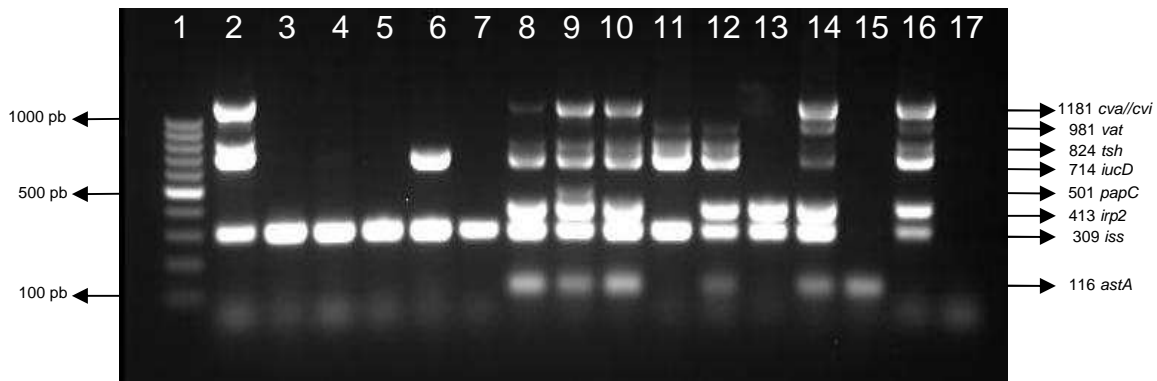


Figura 1. Foto gel de agarose 1,5% do produto da PCR multiplex para a detecção dos genes *astA*, *iss*, *irp2*, *papC*, *iucD*, *tsh*, *vat*, *cva/cvi* de *E. coli*. Colunas: 1 = marcador padrão de tamanho molecular 100 pb DNA ladder (Fermentas); 2 = estirpe M44, positivo para *iss*, *iucD*, *tsh* e *cva/cvi*; 3 = estirpe M45, positivo para *iss*; 4 = estirpe M46, positivo para *iss*; 5 = estirpe M47, positivo para *iss*; 6 = estirpe M51, positivo para *iss* e *iucD*; 7 = estirpe M60, positivo para *iss*; 8 = estirpe M63, positivo para *astA*, *iss*, *irp2*, *iucD*, *tsh* e *cva/cvi*; 9 = estirpe M64 positivo para *astA*, *iss*, *irp2*, *papC*, *iucD*, *tsh* e *cva/cvi*; 10 = estirpe M66, positivo para *astA*, *iss*, *irp2*, *iucD*, *tsh* e *cva/cvi*; 11 = estirpe M67, positivo para *iss*, *iucD*, *tsh* e *vat*; 12 = estirpe M72, positivo para *astA*, *iss*, *irp2*, *iucD*, *tsh* e *vat*; 13 = estirpe M75, positivo para *iss* e *irp2*; 14 = estirpe M76, positivo para *astA*, *iss*, *irp2*, *iucD*, *vat* e *cva/cvi*; 15 = estirpe M77, positivo para *astA*; 16 = controle positivo EC 29 (*iss*, *irp2*, *iucD*, *tsh*, *vat* e *cva/cvi*); 17 = controle negativo.

Tabela 3: Resultados dos ensaios fenótipos (sorotipagem e patogenicidade) e genótipos (PCR), segundo os lotes e órgãos de procedência, das 44 estirpes de alta e intermediária patogenicidade.

Lotes	Órgãos	Sorotipo “O:H”	<i>cva/cvi</i>	<i>vat</i>	<i>tsh</i>	<i>iucD</i>	<i>papC</i>	<i>irp2</i>	<i>iss</i>	<i>astA</i>	Patogenicidade
A	Fígado	NT ^a :NT	-	-	-	-	-	-	+	-	Alta
	Fígado	NT:H18	-	-	-	-	-	-	+	-	Alta
	Fígado	NT:H53	-	-	-	-	-	-	+	+	Alta
B	Fígado	O8:H21	-	-	-	-	-	-	+	+	Intermediária
	Fígado	O8:H10	-	-	-	-	-	-	+	+	Intermediária
	Fígado	O8:H10	-	-	-	-	-	-	+	+	Alta
C	Fígado	O23:NT	-	-	-	+	-	-	+	-	Alta
	Intestino	NT:NT	+	-	-	+	-	-	+	-	Intermediária
	Intestino	O64:NT	-	-	-	+	-	-	+	-	Intermediária
	Intestino	O23:NT	-	-	-	+	-	-	+	-	Intermediária
D	Fígado	O23:NT	-	-	-	+	-	-	+	-	Alta
	Fígado	O23:NT	-	-	-	+	-	-	+	+	Intermediária
	Intestino	NT:NT	+	-	-	+	+	+	+	+	Alta
	Intestino	NT:NT	-	-	-	-	-	-	+	-	Alta
E	Intestino	O9:H40	-	-	-	-	-	+	+	+	Alta
F	Intestino	O75:H40	-	-	-	-	-	+	+	-	Alta
	Intestino	O75:H17	-	-	-	-	-	+	+	-	Alta
I	Intestino	O112:H-	-	-	-	+	-	-	+	+	Alta
J	Fígado	NT:H16	-	-	-	-	-	-	+	+	Intermediária
K	Fígado	O83:H42	-	-	-	+	-	-	+	-	Intermediária
	Fígado	O83:H18	-	-	-	+	-	-	+	-	Intermediária
	Intestino	O140:NT	-	-	-	+	-	-	+	-	Alta
L	Fígado	O133:NT	+	-	+	+	-	-	+	-	Alta
	Fígado	O133:NT	-	-	-	-	-	-	+	-	Alta
	Intestino	O15:H14	-	-	-	-	-	-	+	-	Alta
	Intestino	O15:H14	-	-	-	-	-	-	+	-	Intermediária

Tabela 3: Resultados dos ensaios fenótipos (sorotipagem e patogenicidade) e genótipos (PCR), segundo os lotes e órgãos de procedência, das 44 estirpes.

Lotes	Órgãos	Sorotipo “O:H”	<i>cva/cvi</i>	<i>vat</i>	<i>tsh</i>	<i>iucD</i>	<i>papC</i>	<i>irp2</i>	<i>iss</i>	<i>astA</i>	Patogenicidade
M	Intestino	O142:H46	-	-	-	+	-	-	+	-	Intermediária
O	Intestino	NT:NT	-	-	-	-	-	-	+	-	Alta
P	Fígado	NT:H17	+	-	+	+	-	+	+	+	Intermediária
	Fígado	NT:NT	+	-	+	+	+	+	+	+	Intermediária
	Intestino	O8:H-	+	-	+	+	-	+	+	+	Intermediária
Q	Intestino	NT:H17	-	+	+	+	-	+	+	+	Alta
	Fígado	NT:H17	-	-	-	-	-	+	+	-	Intermediária
	Fígado	NT:H17	+	+	-	+	-	+	+	+	Alta
R	Intestino	NT:H17	-	-	-	-	-	-	-	+	Intermediária
	Intestino	NT:H17	-	-	-	-	-	-	-	+	Intermediária
	Intestino	NT:H17	-	-	-	-	-	-	-	+	Intermediária
	Intestino	NT:H17	-	-	-	-	-	+	+	+	Intermediária
S	Fígado	NT:H17	+	+	-	-	-	+	+	-	Alta
	Intestino	O8:NT	-	-	-	-	-	-	+	-	Alta
	Intestino	O83:NT	-	-	-	-	-	-	+	-	Alta
T	Fígado	O8:H51	-	-	-	-	-	-	+	-	Intermediária
	Fígado	O64:NT	-	-	-	-	+	-	-	+	Intermediária
	Intestino	O8:NT	-	-	-	-	-	-	+	-	Alta
Total			8/44	4/44	6/44	19/44	3/44	12/44	41/44	18/44	

^a NT – Não tipável

Tabela 4: Perfis genéticos, número de estirpes de *E. coli* de alta e intermediária patogenicidade, órgãos de isolamento e sorogrupo.

Perfil	Genótipo	Nº de estirpes	Órgãos	Sorogrupo
1	<i>astA+</i> , <i>iss+</i> , <i>iucD+</i> , <i>irp2+</i> , <i>papC+</i> , <i>tsh+</i> , <i>cva/cvi+</i>	2	Fígado/ Intestino	O8 / NT ^a
2	<i>astA+</i> , <i>iss+</i> , <i>iucD+</i> , <i>irp2+</i> , <i>tsh+</i> , <i>cva/cvi+</i>	1	Fígado	NT
3	<i>astA+</i> , <i>iss+</i> , <i>iucD+</i> , <i>irp2+</i> , <i>vat+</i> , <i>cva/cvi+</i>	1	Fígado	NT
4	<i>astA+</i> , <i>iss+</i> , <i>iucD+</i> , <i>irp2+</i> , <i>tsh+</i> , <i>vat+</i>	1	Intestino	NT
5	<i>astA+</i> , <i>iss+</i> , <i>irp2+</i> , <i>papC+</i> , <i>cva/cvi+</i>	1	Intestino	NT
6	<i>iss+</i> , <i>iucD+</i> , <i>tsh+</i> , <i>cva/cvi+</i>	1	Fígado	O133
7	<i>iss+</i> , <i>iucD+</i> , <i>tsh+</i> , <i>vat+</i>	1	Intestino	NT
8	<i>iss+</i> , <i>irp2+</i> , <i>vat+</i> , <i>cva/cvi+</i>	1	Fígado	NT
9	<i>iss+</i> , <i>iucD+</i> , <i>cva/cvi+</i>	1	Intestino	NT
10	<i>astA+</i> , <i>iss+</i> , <i>irp2+</i>	2	Intestino	O9 / NT
11	<i>astA+</i> , <i>iss+</i> , <i>iucD+</i>	2	Fígado/ Intestino	O23 / O112
12	<i>astA+</i> , <i>iss+</i>	5	Fígado	O8 / NT
13	<i>iss+</i> , <i>iucD+</i>	8	Fígado/ Intestino	O23 / O64/ O83/O140/ O142
14	<i>iss+</i> , <i>irp2+</i>	3	Fígado/ Intestino	O75 / NT
15	<i>astA+</i> , <i>papC+</i>	1	Intestino	O64
16	<i>astA+</i>	2	Intestino	O8 / NT
17	<i>iss+</i>	11	Fígado/ Intestino	O8 / O15 / O83 / O133/ NT

^a NT – Não tipável

5.4. Susceptibilidade antimicrobiana

O teste de susceptibilidade antimicrobiana foi realizado com todas as 90 estirpes de *E. coli* isoladas frente a 11 antimicrobianos. A Tabela 5 indica os índices percentuais encontrados em cada perfil de susceptibilidade.

Tabela 5 - Susceptibilidade antimicrobiana apresentada por 90 estirpes de *E. coli* frente a 11 antimicrobianos testados.

Antimicrobianos	Sensível Nº (%)	Intermediária N(%)	Resistência Nº (%)
Espectinomicina	83 (92,2)	5 (5,6)	2 (2,2)
Fosfomicina	82 (91,1)	0 (0)	8 (8,9)
Kanamicina	56 (62,2)	4 (4,4)	30 (33,3)
Sulfa+Trimetoprim	48 (53,3)	0 (0)	42 (46,7)
Norfloxacina	41 (45,6)	0 (0)	49 (54,4)
Enrofloxacina	35 (38,9)	7 (7,8)	48 (53,3)
Tetraciclina	18 (20,0)	0 (0)	72 (80,0)
Ampicilina	15 (16,7)	2 (2,2)	73 (81,1)
Estreptomina	10 (11,1)	18 (20,0)	62 (68,9)
Eritromicina	0 (0)	4 (4,4)	86 (95,6)
Lincomicina	0 (0)	0 (0)	90 (100)

Nenhuma das estirpes foi sensível a todos os antimicrobianos testados. Todas demonstraram resistência a duas ou mais drogas, sendo cinco estirpes resistentes a apenas dois antimicrobianos e as demais multi-resistentes (resistência a três ou mais antimicrobianos). Seis estirpes foram resistente a três antimicrobianos, 12 resistentes a quatro antimicrobianos, 10 a cinco antimicrobianos, 14 estirpes resistentes a seis, 12

resistentes a sete antimicrobianos, 15 estirpes resistente a oito antimicrobianos, 13 estirpes resistentes a nove antimicrobianos e duas estirpes resistentes a 10 antimicrobianos. Uma estirpe apresentou resistência a todos os 11 antimicrobianos testados.

Os antimicrobianos que apresentaram maior atividade antibacteriana foram a espectinomicina (92,2%) de estirpes sensíveis e a fosfomicina (91,1%), sendo duas estirpes sensibilidade somente a espectinomicina. Os antimicrobianos kanamicina, sulfa+trimetoprim e norflorxacina apresentaram moderada atividade antibacteriana (62,2% a 45,6%) de estirpes sensíveis. Enquanto que para os antimicrobianos enrofloxacina, tetraciclina, ampicilina e estreptomicina, a sensibilidade revelada pelas estirpes de APEC foi mais baixa (38,9% a 11,1%). Todos os isolados apresentaram resistência a lincomicina e 95,6% deles foram resistentes a eritromicina.

Quando os resultados de susceptibilidade antimicrobiana foram associados ao índice de patogenicidade das estirpes, determinado por inoculação “in vivo”, os mesmos demonstraram que estirpes não patogênicas tiveram menor sensibilidade aos antimicrobianos ampicilina, enrofloxacina e fosfomicina e maior sensibilidade ao antimicrobiano estreptomicina, quando comparado aos resultados obtidos pelas estirpes de alta patogenicidade. Não houve diferença de susceptibilidade antimicrobiana para eritromicina e lincomicina, pois não foi detectado sensibilidade para nenhum dos quatro índices de patogenicidade (Tabela 6).

Tabela 6: Porcentagem de estirpes de *E. coli* sensíveis aos antimicrobianos, de acordo com a classificação do grau de patogenicidade.

Antimicrobianos	GRAU DE PATOGENICIDADE %			
	Alta	Intermediária	Baixa	Não patogênica
Ampicilina	30,43	9,52	4,35	13,04
Enrofloxacina	39,13	28,57	47,83	34,78
Eritromicina	0	0	0	0
Estreptomicina	0	0	21,74	21,74
Espectinomicina	86,96	100,0	82,61	100,0
Fosfomicina	95,65	85,71	95,65	86,96
Kanamicina	60,87	47,62	65,22	69,56
Lincomicina	0	0	0	0
Norfloxacina	39,13	28,57	65,22	47,87
Sulfa+Trimetoprim	52,17	38,09	60,87	60,87
Tetraciclina	17,39	9,52	30,43	21,74

VI. DISCUSSÃO

Há várias décadas, inúmeras pesquisas envolvendo testes fenotípicos e genotípicos têm sido realizadas com isolados de *E. coli* de origem aviária com o objetivo de diferenciar as estirpes patogênicas e não patogênicas.

Para WON et al. (2009), a patogenicidade das cepas de *E. coli* está baseada na presença e expressão de potenciais fatores de virulência. Segundo MELLATA et al. (2003), a habilidade da bactéria em resistir aos fatores séricos inibitórios, permitindo que a mesma escape da ação do sistema complemento nos processos de infecção é o fator de virulência de maior correlação com a patogenicidade da bactéria.

O gene *iss* que codifica uma proteína que desempenha o papel da resistência sérica é um importante marcador desse fator de virulência (PFAFF-McDONIUGH et al., 200). O gene *iss* tem sido detectado com elevada frequência em APEC. Neste trabalho foram encontradas 41 (93,9%) estirpes *iss+*, dado compatível com a literatura que aponta percentuais de positividade variando entre 80 e 100% (EWERS et al., 2004; ZHAO et al., 2005; SOMEYA, et al., 2007; KWON et al., 2008).

A epidemiologia das *E. coli* é complexa e envolve seres humanos, animais, ambientes e as interações entre esses componentes. Segundo IKUNO et al. (2006), a presença de gene de virulência associados a estirpes de *E. coli* comensal, pode ser usada como indicador de potenciais riscos, pois tais bactérias podem ser reservatórios dos genes de virulência. Os autores analisaram estirpes de *E. coli*, isoladas de diferentes origens, ou seja, das galinhas em fase de produção, do ambiente da granja, da água de dessedentação das aves e da casca do ovo. O gene *iss* foi detectado em maior frequência, quando comparado aos demais genes pesquisados, como também foi encontrado em todas as diferentes origens das amostras, totalizando 50% de ocorrência entre as amostras analisadas.

Em outros estudos realizados no Brasil com aves silvestres, o gene (*iss*) foi detectado com uma variação de 24,6 % a 100,0% (IKUNO et al., 2008, KNÖBL et al., 2008).

Ademais, a participação de determinados genes no desenvolvimento da colibacilose tem sido apoiada por estudos epidemiológicos que demonstraram uma frequência significativamente maior destes genes em isolados de aves doentes se comparados aos isolados de amostras fecais de aves saudáveis (McPEAKE et al., 2005; VANDEKERCHOVE et al., 2005). No entanto, a frequência de alguns genes tem apresentado variações de forma significativa em diversos trabalhos com APEC.

O gene *astA*, que codifica uma enterotoxina estável ao calor (EAST), encontradas em bactérias diarreiogênicas foi detectado em 88,5% das APEC analisadas por SOMEYA et al. (2007), em 20,0% das estirpes analisadas por EWERS et al. (2004) e 17,8% por estirpes estudadas por WON et al. (2009). No presente trabalho, o percentual de estirpes *astA*⁺ foi de 40,1%. Da mesma forma, resultados diversos tem sido atribuídos à presença do gene *iucD*, que codifica a aerobactina, neste trabalho foi encontrado o percentual de 43,2% nas estirpes analisadas. SOMEYA et al. (2007) detectaram esse gene em 100,0% de APEC analisadas, EWERS et al. (2004) em 78,0% e WON et al. (2009) em 47,5%.

O gene *tsh*, responsável pela síntese de uma proteína de aderência termo-sensível e com capacidade hemaglutinante, apontada como um importante marcador em APEC foi detectado neste estudo em baixo percentual (13,6%) se comparados aos resultados obtidos por ZHAO et al. (2005) e WON et al. (2009), que aponta a presença deste gene em 84% e 53,9% respectivamente. Contudo alguns estudos têm detectado um percentual menor de estirpes *tsh*⁺, como é o caso de IKUNO et al. (2006) com apenas 10,0% de estirpes *tsh*⁺.

O gene que codifica a fimbria P (*papC*) foi detectado, em menor percentual (6,8%) estirpe positiva. Esse percentual foi considerado baixo se compará-lo com os dados obtidos por WON et al. (2009) que relatam a presença deste gene em 15,0% e com EWERS et al. (2004) em 22,7% de estirpes *papC*⁺. No entanto, alguns pesquisadores não encontraram o gene em nenhuma das estirpes isoladas de aves com sinais clínicos de colibacilose, como é o caso de IKUNO et al. (2006).

A presença dos genes *iss* ou *astA* pode ter sido fundamental para a patogenia das aves estudadas, uma vez que os mesmos estavam presentes em todas as estirpes

de alta ou de intermediária patogenicidade e em treze dessas estirpes foi detectado apenas um desses dois genes de virulência.

Para a determinação de sorogrupos envolvidos em APEC, várias pesquisas têm sido realizadas em diferentes partes do mundo. Os autores DHO-MOULIN & FAIRBROTHER, (1999) associam a identificação dos sorogrupos O1, O2 e O78, como cepas altamente patogênicas. No entanto, os resultados encontrados neste estudo demonstraram que nenhuma das estirpes patogênicas pertencia aos sorogrupos mencionados. Os sorogrupos O8, O9, O15, O23, O64, O75, O83, O112 e O140 representando 81,8% das estirpes sorotipadas neste estudo, já foram citados na literatura, em vários países (BLANCO et al., 1998; SILVEIRA et al., 2002; JEFFREY et al., 2004; ROSARIO et al., 2004; VANDEKERCHOVE et al., 2005; ZHAO et al., 2005; GUASTALLI et al., 2010, KNÖBL et al., 2008) por estarem envolvidos com colibacilose aviária, tanto em galinhas de postura quanto em frango de corte.

BLANCO et al. (1998) relataram que nas últimas décadas diferentes estudos têm demonstrado uma grande diversidade antigênica entre as APEC, havendo em sua maioria uma predominância de três a cinco sorogrupos em cada estudo. Neste estudo os sorogrupos de maior frequência foram O8 (15,9%), O23 (9,1%) e O83(6,8%). Para SILVEIRA et al. (2002), a diversidade de sorogrupos envolvidos com colibacilose, podem refletir as diferenças regionais associadas à prevalência de diferentes grupos clonais de cepas.

No México, ROSARIO et al. (2004), em trabalho desenvolvido em um incubatório de aves comerciais, com isolados provenientes de ovos inférteis e do saco da gema de embriões mortos, encontraram os sorogrupos: O8, O9, O15, O23, O83 e O112, que neste estudo, representaram 54,0% do total de sorogrupos caracterizados. No Brasil, um estudo com pintainhas de postura comercial, com um dia de idade, com estirpes de *E. coli* isoladas do fígado, GUASTALLI et al. (2010) identificou 14 sorogrupos diferentes, dos quais quatro deles O8, O15, O64 e O75 também foram identificados neste trabalho. O envolvimento destes sorogrupos nos estudos mencionados sugere a participação dos mesmos em casos de colibacilose em aves jovens ou em desenvolvimento embrionário.

O grande número de APEC não tipáveis dificulta os diagnósticos fundamentados na sorologia (DHO-MOULIN & FAIRBROTHER, 1999). No presente estudo, 18 (40,9%) estirpes não foram tipáveis, estando de acordo com os descritos na literatura que apontam para um percentual de 14,8 a 60,0% (SILVEIRA et al., 2002; VANDEKERCHOVE et al., 2004; MONROY et al., 2005; ZHAO et al., 2005; JOHNSON et al., 2008).

As estirpes pertencentes aos sorogrupos O133 e O142 encontradas no presente estudo, foram de alta e intermediária patogenicidade, provocando 100,0% e 70,0% de mortalidade dos pintainhos inoculados, no entanto, ainda não haviam sido relatados com envolvimento em APEC na literatura consultada.

Correlacionado os resultados obtidos na PCR com os sorotipos, pode-se observar que a variação de combinações foi muito diversa, caracterizando assim que, no campo as estirpes de *E. coli* possuem vários perfis para obedecerem a um padrão.

O tratamento com antibióticos é uma das formas de diminuir o impacto causado pela colibacilose na avicultura (FERREIRA & KNÖBL, 2009). Porém, estudos indicam que são cada vez maiores os índices de resistência de APEC frente aos agentes antimicrobianos, indicando que o controle da enfermidade pode se tornar ainda mais difícil no futuro (JOHNSON et al., 2008).

Através deste estudo, foi possível verificar que as estirpes de *E. coli* isoladas das aves jovens, com apenas uma semana de vida, apresentaram resistência a vários antimicrobianos testados.

Nenhuma das estirpes apresentou sensibilidade a todos os antimicrobianos. Dentre os onze antimicrobianos testados, a espectinomicina foi a que demonstrou maior sensibilidade para a maioria das estirpes isoladas, com uma porcentagem de sensibilidade de 92,2%, índices diferentes foram verificados em outros países. Em Marrocos, por exemplo, em trabalho realizado com estirpes de *E. coli* isoladas de frangos e galinhas, 68,0% foi sensível a espectinomicina (AMARA et al., 1995). Nos Estados Unidos, HUANG et al. (2009), estudaram 445 estirpes *E. coli*, 387 estirpes de *Salmonella* spp. e 80 estirpes de *Pasteurella multocida*, todas isoladas de frango e constataram que as estirpes de *E. coli* tiveram 48,0% de sensibilidade, ao

antimicrobiano espectinomicina, enquanto que as estirpes *Salmonella* spp tiveram uma sensibilidade menor, ou seja de 31,5% e todas os isolados de *P. multocida* foram sensíveis ao antimicrobiano.

O segundo antimicrobiano de maior sensibilidade para as estirpes estudadas foi a fosfomicina que apresentou 91,1% de sensibilidade. O mesmo índice também foi verificado por ZANATTA et al. (2004) em estudo realizado no Brasil com estirpes isoladas de matrizes de postura comercial e frangos de corte.

Os antimicrobianos kanamicina e sulfa+trimetoprim, apresentaram neste estudo, moderada sensibilidade com índices de 62,2% e 53,3%. No Brasil em trabalho realizado com frangos de corte as estirpes apresentaram uma sensibilidade menor ao antimicrobiano sulfa+trimetoprim, com um índice de 33,3% (CARDOSO et al., 2002).

Os índices de resistência a enrofloxacina e norfloxacina neste estudo, foram praticamente iguais para as duas drogas com 53,3% e de 54,4%. Em um trabalho realizado na China com frango de corte, com estirpes de *E. coli* isoladas durante um período de 5 anos, foi detectado um índice menor de sensibilidade para a enrofloxacina, ou seja, 32,5%. Em outro trabalho, realizado na Itália, com estirpes isoladas de matrizes de frango e galinhas de postura em fase de produção, 100,0% dos isolados foram resistente a enrofloxacina (ZANELLA et al., 2000; GIOVANARDI et al., 2005).

A contaminação dos ovos por *E. coli* proveniente das fezes durante a postura, tem sido alvo de estudo, pois há uma preocupação com o aumento da emergência da resistência microbiana aos antibióticos, que podem ser transmitida a patógenos humanos (AKOND et al., 2009). ADESIYUN et al., (2007) isolaram 118 estirpes da casca e do conteúdo de ovos de mesa e detectaram 58,5% das estirpes resistentes a tetraciclina e 78,8% a estreptomicina. No presente estudo os índices de resistência aos antimicrobianos tetraciclina e estreptomicina foram de 80,0% e 68,9%.

Antimicrobianos usados na avicultura industrial por um longo período podem resultar em alto índice de resistência as drogas. Índices de 79,0% a 100,0% ao antimicrobiano tetraciclina com estirpes de *E. coli* de origem aviária, pode ser constatada em trabalhos realizados em diversas partes do mundo (ZANELLA et al.,

2000; GIOVANARDI et al., 2005; ZHAO et al., 2005; MILES et al., 2006; ROY et al., 2006; SABERFAR et al., 2008; HUANG et al., 2009; SHARADA et al., 2009).

No presente trabalho, todas as estirpes foram resistentes à lincomicina resultados compatíveis com o trabalho realizado na Itália com galinha de postura (ZANELLA et al., 2000).

Segundo MARSHALL et al. (1990) as cepas de *E. coli* não patogênicas do intestino dos animais são importantes reservatórios de genes de resistência às drogas antimicrobianas e podem colonizar o intestino de humano. Em estudo realizado por IKUNO et al. (2008), com aves silvestres, todas as estirpes de *E. coli* analisadas foram 100,0% resistentes para lincomicina. Neste trabalho, estirpes isoladas do intestino das aves e classificadas como não patogênicas no teste “in vivo” também foram resistentes a vários antimicrobianos.

A transmissão de genes de virulência e resistência plasmidial entre diferentes gêneros e espécies bacterianas ocorre amplamente (DAVIES, 1994; BUERIS, 2005). Portanto os resultados do presente trabalho são importantes não apenas para a avicultura como também para a medicina humana.

VII. CONCLUSÃO

- As estirpes de *E. coli* apresentaram diversidade de sorotipos e de genes de virulência;
- Através do ensaio de infecção experimental pode-se constatar que estirpes que apresentaram apenas um gene de virulência eram de alta ou de intermediária patogenicidade;
- A presença dos genes *iss* ou *astA* pode ter sido fundamental para a patogenia do quadro de colibacilose estudado;
- Foram encontrados sorogrupos de *E. coli* que ainda não haviam sido relatados em APEC;
- Nenhuma das estirpes apresentou sensibilidade a todos os antimicrobianos testados;
- A espectinomicina foi o antimicrobiano que apresentou maior atividade antimicrobiana;
- Todas as estirpes foram resistentes à lincomicina;
- Estirpes não patogênicas ou de baixa patogenicidade apresentaram multi resistência.

VIII. REFERÊNCIAS:

ADESIYUN, A.; OFFIAH, N.; SEEPERSADSINGH, N.; RODRIGO, S.; LASHLEY, V.; MUSAI, L. Antimicrobial resistance of *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* isolated from table eggs. **Food Control**, Guildford , v. 18, n. 4, p. 306-311, 2007.

AKOND, M. A.; HASSAN, A. M. R.; ALAM, S.; SHIRIN, M. Antibiotic resistance of *Escherichia coli* isolated from poultry and poultry environment of Bangladesh. **American Journal of Environment Sciences**, v. 5, n.1, p. 47-52, 2009.

AMARA, A.; ZIANI, Z.; BOUZOUBAA, K. Antibioresistance of *Escherichia coli* strains isolated in Morocco from chickens with colibacillosis. **Veterinary Microbiology** Amsterdam, v. 43, p. 325-330, 1995.

AXTELL, R. C.; ARENDS, J. J. Ecology and management of arthropod pests of poultry. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 35, p. 101-126, 1990.

BARNES, H. J. Pathogenesis of respiratory *Escherichia coli* and *Pasteurella multocida* infections in poultry. In: SYMPOSIUM RESPIRATORY DISEASES OF CHICKEN AND TURKEYS, 1994, San Francisco. **Proceedings...**p. 26-35.

BARNES, H. J.; VAILLANCOURT, J.; GROSS, W. B. Colibacillosis. In: SAIF, Y.M. (Ed.). **Dieases of poultry**. 11th ed. Ames: Iowa State University Press, 2003. chap. 18, p. 631-652.

BARTON, M. D. Antibiotic use in animal feed and its impact on human health. **Nutrition Research Reviews**, Cambridge, v. 13, n. 2, p. 279-299, 2000.

BAUER, A. M.; KIRBY, W. M. M. Antibiotic susceptibility by standardized single disc method. **American Journal of Clinical Pathology**, Philadelphia, v. 45, n. 4, p. 493-496, 1966.

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

BEST, A.; LA RAGIONE, R. M.; COOLEY, W. A.; O'CONNOR, C. D., VELGE, P.; WOODWARD, M. J. Interaction with avian cells and colonization of specific pathogen-free chicks by Shiga-toxin negative *Escherichia coli* O157:H7 (NCTC 12900). **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 93, n. 3, p. 207-222, 2003.

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.

BINNS, M. M.; MAYDEN, J.; LEVINE, R. P. Further characterization of complement resistance conferred on *Escherichia coli* by the plasmid genes traT of R100 and *iss* of ColV, I-K94. **Infection and Immunity**, Washington, v. 35, n. 2, p. 654-659, 1982.

BLANCO, J.; BLANCO, M.; ALONSO, M. P.; BLANCO, J. E.; GARABAL, J. I.; GONZALEZ, E. A. Serogroups of *Escherichia coli* strains producing cytotoxic necrotizing factors CNF1 and CNF2. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 96, n. 3, p. 155-160, 1992.

BLANCO, M.; BLANCO, J.; BLANCO, J. E.; GONZALEZ, E. A.; GOMES T. A.; ZERBINI L. F.; YANO T.; DE CASTRO A. F. Genes coding for Shiga-like toxins in bovine verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) strains belonging O:K:H serotypes. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 42, n. 2-3, p. 105-110, 1994.

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

BRAUN, V. Iron uptake by *Escherichia coli*. **Frontiers in Bioscience**, Atlanta, v. 8, p. 1409-1421, 2003.

BUERIS, V. Genética da Virulência. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. (Ed.). **Microbiologia**. 4th ed. São Paulo: Atheneu, 2005. cap.18, p.163-168.

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

DA COSTA, P. M.; OLIVEIRA, M.; BICA, A.; VAZ-PIRES, P.; BERNARDO, F. Antimicrobial resistance in *Enterococcus spp.* and *Escherichia coli* isolated from poultry feed ingredients. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 120, n. 1-2, p. 122-131, 2007.

DAVIES, J. Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. **Science**, Washington, v. 264, p. 375-382, 1994.

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

DHO, M.; LAFONT, J. P. *Escherichia coli* colonization of the trachea in poultry: comparison of virulent and avirulent strains in gnotoxenic chickens. **Avian Diseases**, kennett Square, v. 26, n. 4, p. 787-797, 1982.

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

DIPINETO, L.; SANTANIELLO, A.; FONTANELLA, M.; LAGOS, K. FIORETTI, A.; MENNA, L. F. Presence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 in living layer hens. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 43, p. 293-295, 2006.

DOZOIS, C. M.; FAIRBROTHER, J. M.; HAREL J.; BOSSE M. *pap*-and *pil*- related DNA sequences and other virulence determinants associated with *Escherichia coli* isolated from septicemic chickens and turkeys. **Infection and Immunity**, Washington, v. 60, n. 7, p. 2648-2656, 1992.

DOZOIS, C. M.; DHO-MOLULIN, M., BREE, A.; FAIRBROTHER, C.; CURTIS, R. Relationship between the *Tsh* autotransporter and pathogenicity of avian *Escherichia coli* isolated from septicemic chickens and turkeys. **Infection and Immunity**, Washington, v. 68, p. 713-716, 2000.

EDWARDS, P. R.; EWING'S, W.H. The genus *Escherichia*. In:----- . **Edwads and Ewing's identification of enterobacteriaceae**. 4th ed. . New York: Elsevier Science Publishing, 1986. chap. 6, p. 93-134.

EMERY, D. A.; NAGARAJA, K. V.; SHAW, D. P.; NEWMAN, J. A. ; WHITE, D. G. Virulence factors of *Escherichia coli* associated with colisepticemia in chicken and turkeys. **Avian Diseases**, kennett Square, v. 36, n. 3, p. 504-511, 1992.

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

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

FALLACARA, D. M.; MONAHAN C. M.; MORISHITA T. Y.; WACK R. F. Fecal shedding and antimicrobial susceptibility of selected bacterial pathogens and a survey of intestinal parasites in free-living waterfowl. **Avian Diseases**, kennett Square, v. 45, n.1, p. 128-135, 2001.

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

FERREIRA, A. J. P. **Fatores de patogenicidade de *Escherichia coli* de origem aviária. Estudo comparativo entre amostras patogênicas e apatogênicas.** 1989. 121f. Tese (Mestrado)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1989.

FERREIRA, A. J. P.; KNÖBL, T. Colibacilose aviária. In: BERCHIERI JR, A; MACARI, M. (Ed.). **Doença das aves.** Campinas: FACTA, 2000. cap. 4.2, p. 197-208.

FERREIRA A. J. P.; REVOLLEDO, L.; FERREIRA, C. S. A. Colibacilose. In: REVOLLEDO, L.; FERREIRA A. J. P.(Ed.). **Patologia aviária.** Barueri: Manole, 2009. cap. 7, p. 67-74.

FERREIRA, A. J. P.; KNÖBL, T. Colibacilose. In: BERCHIERI JUNIOR A.; SILVA, E. N., Di FABIO, J.; SESTI, L.; ZUANAZE, M. A. F. (Ed.). **Doença das aves.** 2th ed. Campinas: FACTA, 2009. cap. 4.2, p. 457-471.

FRANCK, S. M.; BOSWORTH B. T.; MOON H. W. Multiplex PCR for enterotoxigenic, attaching and effacing and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from calves. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 36, n. 6, p. 1795-1797, 1998.

GAMA, N. M. S. Q.; GUASTALLI, E. A. L.; PAULLILO A. C. Isolamento de *Escherichia coli* de amostras de água de dessedentação de galinhas poedeiras. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 71, p. 245, 2004. Suplemento.

GIBBS, P. S.; MAURER, J. J.; NOLAN, L. K.; WOOLEY, E. Prediction of chicken embryo lethality with the avian *Escherichia coli* traits complement resistance, colicin V production, and presence of increased serum survival gene cluster (*iss*). **Avian Diseases**, Kennett Square, v. 47, n. 2, p. 370-379, 2003.

GIOVANARDI, D.; CAMPAGNARI, E.; RUFFONI, S.; PESENTE, P.; ORTALI, G.; FURLATTINI, V. Avian pathogenic *Escherichia coli* transmission from broiler breeders to their progeny in an integrated poultry production chain. **Avian Pathology**, Huntington, v. 34, n. 4, p. 313-318, 2005.

GRIFFITHS, E. Iron and the virulence of *Escherichia coli*. In: SUSSMAN, M. (Ed.). ***Escherichia coli: mechanisms of virulence***. United Kingdom: Cambridge University Press, 1997. p. 331-371.

GUASTALLI, E. A. L.; GAMA, N. M. S. Q.; BUIM, M. R.; OLIVEIRA, R. A.; FERREIRA A.J. F.; LEITE, D. S. Índice de patogenicidade, produção de hemolisina e sorogrupo de amostras de *Escherichia coli* isoladas de aves de postura comercial. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 77, n. 1, p. 153-157, 2010.

GUINÉE, P. A. M.; AGTERBER, C. M.; JANSEN, W. H. *Escherichia coli* O typing by means of a mechanized microtechnique. **Applied Microbiology**, Washington, v. 24, n. 1, p. 127-131, 1972.

GYLES, C. L. (Ed.). *Escherichia coli in domestic animals and humans*. United Kingdom: Cab International, 1994.

HACKER, J.; BLUM-OEHLER, G.; MUHLDOERFER, I.; TSCHAPE, H. Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. **Molecular Microbiology**, New York, v. 23, n. 6, p. 1089-1097, 1997.

HARDY, K. G. Colicinogeny and related phenomena. **Bacteriological Reviews**, Baltimore, v. 39, p. 464-515, 1975.

HARRY, E. G.; HEMSLEY L. A. The association between the presence of septicaemia strains of *Escherichia coli* in the intestinal tracts of chickens and the occurrence of coli septicaemia. **Veterinary Record**, London, v. 77, p. 35-40, 1965.

HUANG, T. M.; LIN, T. L.; WU, C. C. Antimicrobial susceptibility and resistance of chicken *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., and *Pasteurella multocida* isolates. **Avian Diseases**, Kennett Square, v. 53, n. 1, p. 89-93, 2009

IKUNO, A. A.; GUASTALLI E. A. L.; BUIM, M. R.; GAMA N. M. S. Q.; FRANÇA, S. B.; ALONSO, A. C.; FUJIKURA, L. M.; FERREIRA V. C. A. Genes de virulência associados em *Escherichia coli* (APEC) isoladas de poedeiras comerciais, do meio ambiente e de água de dessedentação de granjas de postura de ovos. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 68, p. 132-135, 2006.

IKUNO, A. A.; GAMA N. M. S. Q.; GUASTALLI E. A. L.; GUIMARÃES, M. B.; FERREIRA V. C. A. Características de isolados de *Escherichia coli* provenientes de aves silvestres quanto a genes de virulência e resistência a antibióticos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 18., 2008, Gramado, **Anais...** Disponível em

<<http://www.sovergs.com.br/conbravet/2008/anais/cd/resumos/1269>>. Acesso: 11 fev. 2010.

ISAACSON, R. E. Pilus adhesins. In: SAVAGE, D. C.; FLETCHER, M. **Bacterial adhesion: mechanisms and physiological significance**. New York: Pleum Press, 1985.

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

JANN, K.; JANN, B. J. Capsules of *Escherichia coli*. In: Sussman M. (Ed.). **Escherichia coli: mechanisms of virulence**. Cambridge: Cambridge University Press, 1977. p.113-143.

JEFFREY, J. S.; SINGER, R. S.; O'CONNOR, R.; ATWILL, E. R. Prevalence of pathogenic *Escherichia coli* in the broiler house environment. **Avian Diseases**, kennett Square, v. 48, n. 1, p. 189-195, 2004.

JOHNSON, T. J.; WANNEMUEHLER, Y.; DOETKOTT, C.; JOHNSON. S. J.; ROSENBERGER, S. C.; NOLAN, L. K. Identification of minimal predictors of avian pathogenic *Escherichia coli* virulence for use as a rapid diagnostic tool. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 46, n. 12, p. 3987-3996, 2008.

JOYA, J. E.; TSUJI, T.; JACALNE, A. V.; ARITA, M.; TSUKAMOTO, T., HONDA, T.; MIWATANI, T. Demonstration of enterotoxigenic *Escherichia coli* in diarrheic broiler chicks. **European Journal of Epidemiology**, Dordrecht, v. 6, n. 1, p. 88-90, 1990

KALLENIIUS, G.; MOLLBY, R.; SVENSON, S. B.; WINBERG, J.; HULTBERG, H. Identification of a carbohydrate receptor recognized by uropathogenic *Escherichia coli*. **Infection**, Munchen, v. 8, n. 3, p. 288-293, 1980. Supplement.

KAUFFMANN, F. The serology of the Coli group. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 57, p. 71-100, 1947.

KAWANO, M.; YAGUCHI, K.; OSAWA, R. Genotypic analyses of *Escherichia coli* isolated from chickens with colibacillosis and apparently healthy chickens in Japan. **Microbiology and immunology**, Tokyo, v. 50, n. 12, 961-966, 2006.

KONEMAN E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C. WINN JR, W. C. **Diagnóstico microbiológico**. 5 ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2001. 1488 p.

KNÖBL, T. **Caracterização epidemiológica molecular e de virulência de *Escherichia coli* *sfa+* isoladas de aves**. 2005. 100f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2005.

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

KWON, S.; CHA, S.; CHOI E.; KIM, B.; SONG, H.; JANG, H. Epidemiological prevalence of avian pathogenic *Escherichia coli* differentiated by multiplex PCR from commercial chickens and hatchery in Korea. **Journal of Bacteriology and Virology**, Washington, v.38, n.4, p.179-188, 2008.

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

LEITHNER, G.; HELLER, E. D. Colonization of *Escherichia coli* in young turkeys and chickens. **Avian Diseases**, kennett Square, v. 36, p. 211-220,1992.

LIOR, H. Classification of *Escherichia coli*. In: GYLES C. L. (Ed.). **Escherichia coli in Domestic Animals and Humans**. United Kingdon: Cab International, 1994. p. 31-72.

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 serium complement. **Avian Diseases**, kennett Square, v. 51, n. 3, p. 771-776, 2007.

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

MARSHALL, B.; PETROWSKI, D.; LEVY, S.B. Inter and intraspecies spread of *Escherichia coli* in a farm envionmental in the absence of antibiotic usage. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America, Microbiology**, Washington, v. 87, p. 6609-6613, 1990.

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**, kennett Square, v. 42, n. 1, p.106-118, 1998.

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

MÉNARD, L. P.; DUBREUIL, J. D. Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 (EAST1): a new toxin with an old twist. **Critical Reviews in Microbiology**, Boca Raton, v.28, n. 1, p. 43-60, 2002.

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

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

MILES, T. D.; McLAUGHLIN, W.; BROWN, P. D. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolated from broiler chickens and humans. **BMC Veterinary Research**, Chichester, v. 2, n. 7, p. 1-9.

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

MONTGOMERY, R. D.; BOYLE, C. R.; LENARDUZZI, T. A.; JONES, L. S. Consequences to chicks hatched from *Escherichia coli* inoculated embryos. **Avian Diseases**, kennett Square, v. 43, n. 3, p. 553-563, 1999.

MOON, H. W. Colonization factor antigens of enterotoxigenic *Escherichia coli* in animals. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, Berlin, v. 151 p. 148-165, 1990.

NAGI, M. S.; L. G. RAGGI. Importance to 'airsac' disease of water supplies contaminated with pathogenic *Escherichia coli*. **Avian Diseases**, kennett Square, v. 16, n. 4, p. 718-723. 1972.

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

NATIONAL COMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Performance standards for antimicrobial susceptibility tests. **Twelfth Informational Supplement**, Pennsylvania, v.22, n.1, M100-S12, 2003.

NEILANDS, J. B. Iron absorption and transport in microorganism. **Annual Review of Nutrition**, Palo Alto, v. 1, p. 27-46, 1981.

NOLAN, L. K. , GIDDINGS, C. W.; HORNE, S. M.; DOETKOTT, C.; GIBBS, P. S.; WOOLEY, R. E.; FOLEY, S. L. Complement resistance, as determined by viable count and flow cytometric methods, and its association with the presence of iss and the virulence of avian *Escherichia coli*. **Avian Diseases**, kennett Square, v. 46, n. 2, p. 386–392, 2002.

NORMARK , S.; LARK, D.; HULL, H.; NORNGREN, M.; BRAGA. M. O.; HANLEY, P.; SCHOOLNIK, G.; FALKOW, S. Genetics of digalactoside-binding from a uropathogenic *Escherichia coli* strain. **Infection and immunity**, Washington, v. 41, n. 3, p. 942-949, 1983.

ØRSKOV, F.; ØRSKOV, I. Two new *Escherichia coli* O antigens, O 162 and O 163, and one new H antigen, H56 withdrawal of H antigen H50. **Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica**, Copenhagen, v. 83, n. 2, p. 121-124, 1975.

ØRSKOV, I.; ØRSKOV, F. *Escherichia coli* serotyping and in man and animals. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 38, p. 699-704, 1992.

PALMER, C. C.; BAKER, H. R. Studies on infectious enteritis of poultry caused by bacterium coli communis. **American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 63, p. 85-96, 1923.

PARREIRA, V. R.; ARNS, C. W.; YANO, T. Virulence factors of avian *Escherichia coli* associated with swollen head syndrome. **Avian Pathology**, Huntington, v. 27, n. 2, p.148-154, 1998.

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

PARSONNET, K. C.; KASS, E. H. Does prolonged exposure to antibiotic-resistant bacteria increase the rate of antibiotic-resistant infection?. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Bethesda , v. 31, n. 6, p. 911-914, 1987.

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* isolated from apparently healthy birds and birds with colibacillosis. **Avian Diseases**, kennett Square, v. 44, n. 1, p. 23-33, 2000.

POURBAKSH, S. A.; DHO-MOULIN, M.; BRÉE, A.; DESAULTELS, C.; DOIZE, B. M.; FAIRBROTHER, J. M. Localization of the in vivo expression of P and F1fimbriae in

chickens experimentally inoculated with pathogenic *Escherichia coli*. **Microbial Pathogenesis**, London, v. 22, p. 331-341, 1997.

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

QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; CARTER, M. E.; DONNELLY, W. J.; LEONARD, F. C. Família *Enterobacteriaceae*. In: _____ **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. Porto Alegre: Artmed, 2005. cap. 18, p. 115-130.

REEVES, P. The bacteriocins. In: KLEINZELLER, A.; SPRINGER, G. F.; WITTMANN, H. G. (Ed.). **Molecular biology biochemistry and biophyscs**. New York: Springer Verlag, 1972. p. 1-142.

ROSARIO, C. C.; LÓPEZ, C. C.; TÉLLEZ, I. G.; NAVARRO, O. A.; ANDERSON, R. C.; ESLAVA, C. C. Serotyping and virulence genes detection in *Escherichia coli* isolated from fertile and infertile eggs, dead-in-shell embryos, and chickens with yolk sac infection. **Avian Diseases**, kennett Square, v. 48, p. 791-802, 2004.

ROY, P.; PURUSHOTHAMAN, V.; KOTEESWARAN, A.; DHILLON, A. S. Isolation, characterization, and antimicrobial drug resistance pattern of *Escherichia coli* isolated from Japanese quail and their environment. **Journal of Applied Poultry Research**, Athens, v. 15, n. 3, p. 442-446, 2006.

SADERFAR, E.; POURAKBARI, B.; CHABOKDAVAN, K.; DOLATSHAHI, F. T. Antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolated from Iranian broiler chicken flocks, 2005-2006. **Journal of Applied Poultry Research**, Athens, v. 17, p. 302-304, 2008.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of América**, Washington, v. 74, p. 5463-5467, 1977.

SCHOENI. J. L.; DOYLE. M. P. Variable colonization of chickens perorally inoculated with *Escherichia coli* O157:H7 and subsequent contamination of eggs. **Applied and environmental microbiology**, Washington, v. 60, p. 2958-2962, 1994.

SHARADA, R.; RUBAN, S.; THIYAGEESWARAN, M. Antibiotic resistance pattern of *Escherichia coli* isolated from poultry in Bangalore. **The Internet Journal of Microbiology**, v. 7, n. 1, 2009.

SILVA, P. L. Utilização consciente de medicamentos. In: CURSO DE ATUALIZAÇÃO EM AVICULTURA PARA POSTURA COMERCIAL, 5., 2008, Jaboticabal. **Anais...** Jaboticabal: Funep, 2008. p. 139-155.

SILVEIRA, W. D. S; FERREIRA, A.; BROCCHI, M.; HOLLANDA, L. M.; PESTANA DE CASTRO, A. F.; YAMADA, A. T.; LANCELLOTTI, M. Biological characteristics and pathogenicity of avian *Escherichia coli* strains. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 85, n. 1, p. 47-53, 2002.

SIRCILI, M. P.; TRABULSI, L. R. Fatores de Virulência I: Adesão, Invasão e Sideroforos. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. (Ed.). **Microbiologia**. 4th ed. São Paulo: Atheneu, 2005. cap.17.1, p.143-148.

SKYBERG, J. A.; JOHNSON, T. J.; NOLAN, L. K. Mutational and transcriptional analyses of an avian pathogenic *Escherichia coli* ColV plamid. **BMC Microbiology**, Chichester, v. 29, p. 8-24, 2008.

SMITH, H. W.; GYLES, C. L. The relationship between two apparently different enterotoxins produced by enteropathogenic strains of *Escherichia coli* of porcine origin. **Journal of Medical Microbiology**, London, v. 3, p. 387-401, 1970.

SOMEYA, A.; OTSUKI, K., MURASE, T. Characterization of *Escherichia coli* strains obtained from layer chickens affected with colibacillosis in a commercial egg-producing farm. **Journal of Veterinary Medical Science**, Tokyo, v. 69, n. 10, p.1009-1014, 2007.

STAVRIC, S.; BUCHANAN, B.; GLEESON, T. M. Intestinal colonization of young chicks with *Escherichia coli* O157:H7 and other verotoxin-producing serotypes. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 74, n. 5, p. 557-563, 1993.

STATHOPOULOS, C.; PROVENCE, D. L.; CURTISS, R. III. Characterization of the avian pathogenic *Escherichia coli* hemagglutinin Tsh, a member of the immunoglobulin A protease-type family of autotransporters. **Infection and Immunity**, Washington, v. 67, n. 2, p. 772-781, 1999.

STUART, S. T.; GREENWOOD, K. T.; LUKE, R. K. Hydroxamate-mediate transport of iron controlled by ColV plasmids. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 143, n. 1, p. 35-42, 1980.

SUEYOSHI, M.; NAKAZAWA, M.; TANAKA, S. A chicks model for the study of attaching and effacing *Escherichia coli* infection. **Avances in Experimental Medicine and Biology**, New York, v. 412, p. 99-102, 1997.

SUSSMAN, M. *Escherichia coli* and human disease. In: SUSSMAN, M. **Escherichia coli mechanisms of virulence**. Cambridge: University Press, 1997. p. 3-48.

TOGASHI, C. K.; DA ANGELA H. L.; FREITAS E. R.; GUASTALLI, E. A. L.; BUIM, M. R.; GAMA, N. M. S. Efeitos do tipo de bebedouro sobre a qualidade da água e o

desempenho e a qualidade dos ovos de poedeiras comerciais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 37, n. 8, p. 1450-1455, 2008.

TOLEDO, M. R. F.; FONTES, C. F.; TRABULSI, L. R. MILI-Um meio para a realização dos testes de motilidade, indol e lisina descaboxilase. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 13, p. 230-235, 1982.

TRABULSI, L. R.; ORDOÑEZ, J. G.; MARTINEZ, M. B. Enterobacteriaceae. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. (Ed.). **Microbiologia**. 4th ed. São Paulo: Atheneu, 2005. cap. 35, p. 269-275.

VANDEKERCHOVE, D.; DE HERDT, P.; LAEVENS, H.; PASMANS, F. Colibacillosis in caged layer hens: characteristics of the disease and the aetiological agent. **Avian Pathology**, Huntingdon, v. 33, n. 2, p. 117-125, 2004a.

VANDEKERCHOVE, D.; DE HERDT, P.; LAEVENS, H.; BUTAYE, P.; MEULEMANS, G.; PASMANS, F. Significance of interactions between *Escherichia coli* and respiratory pathogens in layer hens flocks suffering from colibacillosis-associated mortality. **Avian Pathology**, Huntingdon, v. 33, n. 3, p. 298-302, 2004b.

VANDEKERCHOVE, D.; DE HERDT, P.; LAEVENS, H.; PASMANS, F. Risk factors associated with colibacillosis outbreaks in caged layer flocks. **Avian Pathology**, Huntingdon, v. 33, n. 3, p. 337-342, 2004c.

VANDEKERCHOVE, D.; VANDEMAELE, F.; ADRIAENSEN, C.; ZALESKA, M.; HERNALSTEENS, J. P.; DE BAETS L.; BUTAYE, P.; VAN IMMERSSEEL, F.; WATTIAU, P.; LAEVENS, H.; MAST, J.; GODDEERIS, B.; PASMANS, F. Virulence-associated in avian *Escherichia coli*: comparison between isolates from colibacillosis-affected and clinically healthy layer flocks. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 108, n. 1, p. 75-87, 2005.

WADA, Y.; KONDO, H.; NAKAZAWA, M.; KUBO, M. Natural infection with attaching and effacing *Escherichia coli* and adenovirus in the intestine of a pigeon with diarrhea. **The Journal Veterinary Medical Science**, Tokyo, v. 57, p. 531-533, 1995.

WATERS, V. L., CROSA J. H. Colicina V virulence plasmids. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 55, n. 3, p. 437-450, 1991

WON, G.; MOON, B.; OH, I.; MATSUDA, K.; CHAUDHARI, A. A.; HUR, J.; EO, S.; YU, I.; LEE, Y.; LEE, Y.; KIM, B.; LEE, J. H. Profiles of virulence-associated of avian pathogenic *Escherichia coli* isolates from chickens with colibacillosis. **Poultry Science**, Savoy, v. 46, n. 3, p. 260-266, 2009.

WOODROW, G. C.; LANGMAN, L.; YOUNG, I. G.; GIBSON, F. Mutations affecting the citrate-dependente iron uptake system in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 133, n. 3, p. 1524-1526, 1978.

WOOLCOCK, J. B. Bacterial resistance to humoral defense mechanisms: an overview. In: ROTH, J. A. (Ed.). **Virulence mechanisms of bacterial pathogens**. Washington: American Society for Microbiology, 1988. p. 73-93.

WRAY C.; WOODWARD M. J. *Escherichia coli* infections in farm animals. In: SUSSMAN M. (Ed.). **Escherichia coli mechanism of virulence**. Cambridge: University Press, 1997. p. 49-85.

YERUSHAMI, Z.; SMODODINSKY N. I.; NAVEH M. W.; RON, E. Z. Adherence pili of avian strains of *Escherichia coli* O78. **Infection and Immunity**, Washington, v. 58, n. 4, p. 1129-1130, 1990.

ZANATTA, G. F.; KANASHIRO, A. M. I.; CASTRO, A. G. M.; CARDOSO, A. L. S. P.; TESSARI, E. N. C.; PULICI, S. C. P. Suscetibilidade de amostras de *Escherichia coli* de

origem aviária a antimicrobianos. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 71, n. 3, p. 283-286, 2004.

ZANELLA, A.; ALBORALI, A. L.; BARDOTTI, M.; CANDOTTI, P.; GUADAGNINI, P. F.; ANNA MARTINO, P.; STONFER, M. Severe *Escherichia coli* O111 septicaemia and polyserositis in hens at the start of lay. **Avian Pathology**, Huntington, v. 29, n. 4, p. 311-317, 2000.

ZANDER, D. V.; BERMUDEZ, A. J.; MALLINSON, E. T. Principles of disease prevention: diagnosis and control. In: CALNEK B.W. (Ed.). **Diseases of poultry**. 10th ed. Ames: Iowa State University Press, 1997. chap. 34, p. 3-45.

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

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)