

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
CAMPUS DE ARAGUAÍNA – CAMUARAG
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL

**FATORES DE VIRULÊNCIA DE *ESCHERICHIA COLI* ISOLADAS DE
AVES ABATIDAS NO ESTADO DO TOCANTINS**

KARINA ALMEIDA MACIEL

ARAGUAÍNA
2016

KARINA ALMEIDA MACIEL

**FATORES DE VIRULÊNCIA DE *ESCHERICHIA COLI* ISOLADAS DE AVES
ABATIDAS NO ESTADO DO TOCANTINS**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, junto ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal Tropical da Universidade Federal do Tocantins.

Área de concentração: Produção Animal
Linha de pesquisa: Higiene e Tecnologia de Alimentos

Orientador (a): Prof(a). Dra. Silvia Minharro Barbosa
Co- orientadores (a): Prof(a). Dra. Francisca Elda Dias
Prof(a). Dra. Helcileia Dias Santos

ARAGUAÍNA
2016

KARINA ALMEIDA MACIEL

**FATORES DE VIRULÊNCIA DE *ESCHERICHIA COLI* ISOLADAS DE AVES
ABATIDAS NO ESTADO DO TOCANTINS**

Dissertação apresentada como requisito parcial para
obtenção do título de Mestre, junto ao Programa de
Pós-graduação em Ciência Animal Tropical da
Universidade Federal do Tocantins.

Orientador (a): Prof(a). Dra. Silvia Minharro Barbosa

Aprovada em: 26/02/2016

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dra. Silvia Minharro Barbosa (Orientadora)

Prof^a. Dra. Bruna Alexandrino

Prof^a. Dra. Francisca Elda Ferreira Dias

“Porque Dele por Ele, para Ele são todas as coisas.”

AGRADECIMENTOS

À Profª Dra. Silvia Minharro pela orientação, paciência, ensinamentos e confiança na minha capacidade.

Aos meus avós, José Luiz e Eunice Izabel, que sempre acreditaram em mim. Obrigada pelo amor, carinho, confiança e apoio que sempre me deram, tudo que sou devo à vocês.

À minha amada mãe Eudilene por tanto empenho, esforço, amor, dedicação em minha criação e pelas vezes que colocou seus projetos e sonhos em segundo plano para que eu pudesse alcançar os meus.

Aos amigos que ganhei e sempre levarei comigo, Carla, Ingrid, Valmarcia e Raquel por toda ajuda, amizade e momentos de alegria que passamos.

A CAPES pelo apoio financeiro para o desenvolvimento deste projeto de pesquisa.

A todas as pessoas que, de qualquer forma, contribuíram e colaboraram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!!

RESUMO

Fatores de virulência de *Escherichia coli* isoladas de aves abatidas no Estado do Tocantins

O setor avícola desempenha importante papel na economia brasileira. Com a intensificação da produção de aves surge a necessidade de ferramentas que auxiliem na detecção correta dos microrganismos responsáveis por perdas produtivas. O Tocantins por possuir território disponível e condições climáticas, tais como calor e umidade que aperfeiçoam a produção desta espécie, propicia também a proliferação de patógenos, necessitando de diagnósticos precoces. A *Escherichia coli* (*E. coli*) é uma bactéria Gram-negativa encontrada na microbiota normal de animais de produção. No entanto, existem espécies patogênicas que são responsáveis por perdas produtivas na avicultura devido a problemas como as condenações durante o abate. Atualmente, estas cepas estão separadas em categorias de acordo com seus fatores de virulência, responsáveis pelos mecanismos de fisiopatogenia, tanto animal quanto em humano. Os fatores de virulência vão desde a liberação de toxinas, até a presença de genes específicos que estabelecem a patogenia no hospedeiro. A correta identificação de cada categoria desta bactéria por meio da detecção da presença de fatores de virulência com o auxílio da biologia molecular assume papel fundamental para possíveis decisões em profilaxia e aprimoramento do manejo, com intuito de minimizar perdas produtivas. Atualmente, são escassos trabalhos que identifiquem lesões extras intestinais em aves ocasionadas por *E. coli* diarreinogênicas, assim o objetivo do presente trabalho foi demonstrar a associação de lesões em aves com patótipos de *E. coli* comumente detectadas em mamíferos.

Palavras-chave: Inspeção. DEIC. Colibacilose.

ABSTRACT

***Escherichia coli* virulence factors isolated from poultry slaughtered in the state of Tocantins**

The poultry sector plays an important role in the Brazilian economy. With the intensification of poultry production comes the need for tools to assist in the correct detection of microorganisms responsible for production losses. Tocantins to own land available and weather conditions such as heat and humidity that enhance the production of this species, also favors the proliferation of pathogens, requiring early diagnosis. *Escherichia coli* (*E. coli*) is a Gram-negative bacteria found in the normal microflora of farm animals. However, there are pathogenic species which are responsible for production losses in poultry due to problems such as sentences during slaughter. Currently, these strains are separated into categories according to their virulence factors responsible for the pathogenesis mechanisms, both animal and human. The virulence factors ranging from the release of toxins to the presence of specific genes which provide for the pathogenesis in the host. The correct identification of each category of the bacteria through detecting the presence of virulence factors with the aid of molecular biology plays a critical role in possible decisions prophylaxis and improvement of handling, in order to minimize production losses. Currently, there are few studies that identify intestinal extra injuries caused by poultry *E. coli* diarrheagenic, so the aim of this study was to demonstrate the association of diseases in poultry with pathotypes of *E. coli* commonly found in mammals.

Keywords: Inspection. DEIC. Colibacillosis.

LISTA DE SIGLAS

- DNA - Ácido desoxirribonucleico
dNTP - Deoxinucleotídeo trifosfatado
EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético
EHEC – *Escherichia coli* Enterohemorrágica
EIEC - *Escherichia coli* Enteroinvasora
EPEC - *Escherichia coli* Enteropatogênica
ETEC - *Escherichia coli* Enterotoxigênica
LTS - Toxina Termolábil
PCR – Reação em Cadeia de Polimerase
STEC - *Escherichia coli* Produtora de Toxina Shiga
STS – Toxina Termoestável
STX1/STX2 - Shiga toxinas (verotoxinas)
SIF - Serviço de Inspeção Federal
TGI - Trato Gastrointestinal
DEIC - Categoria Diarreinogênica
A/E – Ataque e esfarelamento (lesão)

ANEXOS

Figura 1. Perfil eletroforético em gel de agarose 1,5% dos fragmentos amplificados em reações de PCR para detecção dos genes *bfpA*, *eae* e *elt* isolados de *E. coli* em aves abatidas pelo SIF no Estado do Tocantins entre agosto de 2010 e junho de 2012.....65

Figura 2. Perfil eletroforético em gel de agarose 1,5% dos fragmentos amplificados em reações de PCR para detecção do gene *stx1* isolado de *E. coli* em aves abatidas pelo SIF no Estado do Tocantins entre agosto de 2010 e junho de 2012.....66

Figura 3. Perfil eletroforético em gel de agarose 1,5% dos fragmentos amplificados em reações de PCR para detecção do gene *est* isolado de *E. coli* em aves abatidas pelo SIF no Estado do Tocantins entre agosto de 2010 e junho de 2012.....66

LISTA DE QUADROS

CAPÍTULO I

Quadro 1 . Genes característicos de virulência de *E. coli* diarreinogênicas utilizados em diagnóstico laboratorial.....17

CAPÍTULO II

Quadro 1. Oligonucleotídeos utilizados neste trabalho e o tamanho dos amplicons.....31

CAPÍTULO III

Quadro 3. Oligonucleotídeos utilizados neste trabalho e o tamanho dos amplicons.....50

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Tabela 1. Percentual de presença de genes de virulência de *E. coli* presentes em vísceras e sistema respiratório superior de aves abatidas sob Inspeção no Estado do Tocantins entre agosto de 2010 a junho de 2012.....33

Tabela 2. Distribuição dos genes de virulência de *E. coli* e associações em fígado, coração e sistema respiratório superior de aves condenadas sob Inspeção Sanitária no Estado do Tocantins entre agosto de 2010 a junho de 2012.....35

Tabela 3. Distribuição de presença de genes de virulência de *E. coli* presentes em vísceras e sistema respiratório superior de aves com lesões abatidas sob Inspeção no Estado do Tocantins entre agosto de 2010 a junho de 2012 e seus respectivos Estados de origem.....38

Tabela 4. Distribuição de genes de virulência de *E. coli* e associações de acordo com as Unidades Federativas de origem de aves condenadas abatidas sob Inspeção Sanitária no Estado do Tocantins entre agosto de 2010 a junho de 2012.....41

CAPÍTULO III

Tabela 1. Percentual de presença de genes de virulência de *E. coli* presentes em vísceras e sistema respiratório superior de aves sem lesões abatidas liberadas para consumo sob Inspeção no Estado do Tocantins entre agosto de 2010 a junho de 2012.....52

Tabela 2. Distribuição de genes de virulência de *E. coli* e associações em fígado, coração e sistema respiratório superior de aves liberadas para consumo sob Inspeção Sanitária no Estado do Tocantins entre agosto de 2010 a junho de 2012.....54

Tabela 3. Percentual de presença de genes de virulência de *E. coli* presentes em vísceras e sistema respiratório superior de aves sem lesões abatidas sob Inspeção no Estado do Tocantins entre agosto de 2010 a junho de 2012 e seus respectivos Estados de origem.....55

Tabela 4. Distribuição de genes de virulência de *E. coli* e associações de acordo com as Unidades Federativas de origem de aves liberadas para consumo sob Inspeção Sanitária no Estado do Tocantins entre agosto de 2010 a junho de 2012.....59

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	13
1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 <i>ESCHERICHIA COLI</i>	16
2.1.1 <i>Escherichia coli</i> enteropatogênica (EPEC)	17
2.1.2 <i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica (EHEC)	18
2.1.3 <i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica (ETEC)	19
2.1.4 <i>Escherichia coli</i> enteroinvasora (EIEC)	20
REFERÊNCIAS	22
CAPÍTULO II	26
1. INTRODUÇÃO	28
2. MATERIAL MÉTODOS	30
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4. CONCLUSÃO	42
REFERÊNCIAS	43
CAPÍTULO III	46
1. INTRODUÇÃO	48
2. MATERIAL E MÉTODOS	49
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
4. CONCLUSÃO	60
REFERÊNCIAS	61
CONSIDERAÇÕES FINAIS.	64

CAPÍTULO I
Revisão Bibliográfica

1. INTRODUÇÃO

Segundo a União Brasileira de Avicultura (UBABEF, 2013) a produção de carne de frango chegou a 12,691 milhões. O Brasil manteve a posição de maior exportador mundial e de terceiro maior produtor de carne de frango, atrás dos Estados Unidos e da China. Do volume total de frangos produzido pelo país 67,7% foi destinado ao consumo interno e 32,3% para exportações.

No primeiro trimestre de 2013 foram abatidas 1,380 bilhão de cabeças de frangos. Este número significa queda de 1,9% em relação ao trimestre do ano anterior e um aumento de 2,1% quando comparado com o mesmo período do ano de 2013 (IBGE, 2013).

De acordo com Belluco et al. (2016) o processo de abate é constituído de um sistema com diversas operações de importância crítica para a qualidade do produto final.

No Brasil, a portaria de nº 210 de 26/11 de 1998 preconiza todas as medidas que devem ser adotadas durante o abate de aves. No qual animais acometidos por processos inflamatórios desencadeados por microrganismos deverão ser condenados (BRASIL, 1998).

A qualidade da carcaça está diretamente relacionada com a ausência ou presença de microrganismos que são responsáveis por condenação parcial ou total das mesmas (MENDES et al., 2011).

Dessa forma, a identificação bacteriana é imprescindível para tomada de medidas de erradicação de contaminação de carcaças. Neste cenário, destaca-se a presença da *Escherichia coli* (*E. coli*), responsável por grande parte das perdas de qualidade da carne de frango (ROCHA & QUIROGA, 1996).

Os sorogrupos de *E. coli* diferenciam-se uma das outras pelo fato de expressarem genes que codificam fatores de virulência diferentes, que são os responsáveis pela colonização das mesmas, bem como alterar fisiologicamente a homeostase do hospedeiro (VIEIRA, 2009).

Esta espécie de bactéria é a que possui maior importância na avicultura industrial devido às inúmeras complicações clínicas tais como, enterite, artrite, onfalite, coligranuloma, salpingite, septicemia, aerossaculite entre outras que afetam diretamente o retorno econômico deste tipo de produção (GUASTALLI, 2009).

Bactérias são comumente classificadas de acordo com características morfológicas, propriedades de coloração e provas bioquímicas. Porém, nos últimos

anos a classificação através de genes vem crescendo cada vez mais (PHILIPS & BLASER, 2015). Além de serem decisivos na complementariedade de testes sorológicos, microbiológicos e hematológicos (FERNANDES & ZHANG, 2014).

Diante do exposto e devido à inexistência de trabalhos que têm como alvo a detecção de DEIC's (categoria diarreinogênica) como responsáveis por infecções fora do TGI (trato gastrointestinal) em aves, o objetivo deste trabalho foi a identificação dos fatores de virulência de *E. coli* isoladas de carcaças e vísceras de aves abatidas sob SIF (serviço de inspeção federal) através da caracterização molecular das mesmas, visto que essa bactéria tem sido responsabilizada pela redução na produção devido à condenação de carcaça e mortes dentro das granjas, dados como estes serão de suma importância para o monitoramento epidemiológico de microrganismos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *ESCHERICHIA COLI*

O gênero *Escherichia* é composto de várias espécies, porém, somente a *E. coli* é um patógeno de suma importância para os animais. Ela é a principal espécie de bactéria Gram-negativa que compõe a flora normal do trato gastrointestinal, porém, há variedades patogênicas que uma vez transmitidas a um determinado hospedeiro pode desencadear inúmeras enfermidades. Os principais produtos por elas excretados causadores de alterações são: enterotoxinas, a toxina shiga, e expressão de genes específicos (HIRSH & ZEE, 2009).

Uma vez que o convívio com animais que são portadores deste agente pode ser também uma possível fonte de contaminação para outros animais e até mesmo outras espécies, a *E. coli* deve ser considerada um agente que compromete a produção animal gerando embargos econômicos oriundos da condenação de carcaças, assim como perdas de exportações (SYDOW et al., 2006).

Existe uma correlação de grupos patogênicos presente nos animais de produção, que também são sorotipos encontrados em humanos infectados. A proximidade do Brasil com países onde a presença destes microrganismos é endêmico facilita também a disseminação dos mesmos, quando há, por exemplo, transporte de animais de um país para o outro. (BERTÃO & SARIDAKIS, 2007).

A principal via de contaminação por *E. coli* é alimentar, sendo, portanto, necessário uma maior atenção na segurança dos alimentos. Melhorias dos métodos de processamento, maior cautela por parte de todos os envolvidos na cadeia de produção, são ferramentas sugeridas com a finalidade de reduzir a contaminação por patógenos e conseqüentemente a ocorrência de doenças transmitidas pelos mesmos. Porém, a vertente de cautela com animais de produção que padece com as conseqüências de contaminação recebe uma atenção reduzida nesse aspecto de relação microrganismo x hospedeiro. Práticas incorretas no manejo dos animais de produção facilitam o surgimento e disseminação de microrganismos patogênicos (AMSON et al., 2006).

Em um estudo com vísceras de frango provenientes de abatedouros localizados no Recôncavo baiano, foram observadas que em 62 amostras de fígado de aves, as enfermidades comumente associadas a *E. coli* são: septicemia (36%), síndrome ascítica (26%), colibacilose (19%), caquexia (13%) e aerossaculite (6%).

Ocasionalmente dessa forma redução na produção de carne e ovos nesta espécie (SILVA et al., 2011).

Silva et al. (2012) em sua pesquisa realizada em um abatedouro no Recôncavo baiano correlacionaram fígados de aves com a presença de *E. coli*, puderam observar um elevado índice de contaminação por esta bactéria, devido as alterações macroscópicas de aspecto degenerativo e repugnante daquele órgão. Concluíram que estes animais antes de terem se tornados potenciais fontes de contaminação tiveram sua homeostasia alterada diminuindo seu desempenho produtivo

As *E. coli* possuem mecanismos de virulências específicos para patótipo que pertencem as DEIC's (categoria diarreinogênica) (Quadro 1), e devido este motivo foram divididas em categorias. Dessa forma, cada categoria apresenta um mecanismo de patogenicidade diferente, de acordo com o gene de virulência associado, entre as mais frequentes estão: enteropatogênicas (EPEC), enterotoxigênicas (ETEC), enteroinvasivas (EIEC) e enterohemorrágicas (EHEC) (GUASTALLI, 2009).

Categoria diarreinogênica	Genes associados aos fatores de virulência
EHEC	<i>Stx1, stx2 e eae</i>
EPEC (típica)	<i>Eae e bfpA</i>
EPEC (atípica)	<i>Eae ou bfpA</i>
ETEC	<i>Elt e est</i>
EIEC	<i>lpah</i>

Quadro 1. Genes característicos de virulência de *E. coli* diarreinogênicas utilizados em diagnóstico laboratorial (CAMPOS et al., 2004) adaptado.

2.1.1 *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC)

E. coli enteropatogênica (EPEC) é considerada uma das principais causas de diarreias prolongadas em todo o mundo (HU et al., 2015). Sendo destaque como patógeno intestinal que causa uma diarreia aguda e persistente em animais e seres humanos (KLETA, 2014). Este sorogrupo tem como principal diferença as lesões desencadeadas no hospedeiro através de aderência (COURA et al., 2014).

As lesões são do tipo A/E “*attachment and effacing*” (íntima adesão da bactéria à célula do hospedeiro). E os genes responsáveis por isto encontra-se em uma ilha de patogenicidade denominada de LEE “*locus for enterocyte effacement*”

(locus de apagamento de enterócito) que é acompanhada de um sistema de secreção tipo III necessária para efetivação dessa lesão (GOUFFAUX, 2012).

Os genes intimina *eae* (intimina) e *bfpA* (*bundle-forming pilus*) estão relacionados com a categoria de EPEC, que são subdividas em típicas e atípicas (ARANDA et al., 2004).

A EPEC típica (tEPEC) difere da EPEC atípica (aEPEC) em vários aspectos, inclusive nos reservatórios. A típica está relacionada comumente com diarreia em humanos e em países em desenvolvimento, enquanto a atípica está relacionada com diarreia em animais, ocorrendo em países industrializados. Outra diferença marcante são os fatores de virulência, onde a típica apresenta um grupo mais homogêneo, codificada pela região LEE e o gene *bfpA* localizado no plasmídio EAF que é responsável pela aderência. Para a categoria atípica, frequentemente não há presença de *bfpA* e *eae* simultaneamente. Embora esses dois grupos sejam distintos, ambos dividem a mesma ilha de patogenicidade LEE (TRABULSI et al., 2002).

A semelhança entre esses dois grupos consiste no tipo de lesão que é provocada pelo gene *eae* (*attaching and effacing*). Caso a cepa apresente esse gene acrescida de toxina Shiga a mesma é considerada como EHEC (AFSET et al., 2004).

2.1.2 *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC)

A *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) é responsável por causar uma diarreia sanguinolenta e colites hemorrágicas nos hospedeiros (FERENS et al., 2011).

A forma de transmissão ocorre via fecal-oral, podendo se propagar entre os animais por contato direto, assim como através de bebedouros, alimentos compartilhados em cochos, por exemplo, e pastagens contaminadas. As aves silvestres e moscas são os principais disseminadores, porém as demais espécies podem também ser fonte de disseminação da mesma (MITTELSTAEDT & CARVALHO, 2006).

Dutta et al. (2011) analisando achados de EHEC em 150 aves, puderam constatar que 49 foram afetadas e 19 morreram em um intervalo de uma semana apenas, com taxa de mortalidade total de 12,67% e 38,78% de letalidade. Os autores afirmam ainda que, dentre os principais sintomas destaca-se a anorexia,

perdas de penas, aglomeração de animais e diarreia aquosa com desidratação grave. A presença de toxina shiga através de diagnóstico molecular foi decisiva para a confirmação da presença de tal cepa.

A categoria responsável pela produção da toxina Shiga (*stx1* e *stx2*) ou anteriormente chamada de verotoxina, é conhecida como produtora de toxina Shiga (STEC) ou por *E. coli* enterohemorrágica. Essa toxina é responsável por desencadear diarreia, colite hemorrágica e síndrome urêmica nos hospedeiros, que podem gerar consequências graves e até mesmo o óbito (PIGATTO et al., 2009).

A produção de toxinas *stx1* e *stx2* são consideradas como os fatores de virulência de maior importância (TAHAMTAN et al., 2010). Todavia, há relatos de achados de toxinas Shiga dos tipos: *stx1c*, *stx1d*, *stx2c*, *stx2d*, *stx2e* e *stx2f*. Porém, para o sorogrupo dominante O157 e relacionado com o maior número de surtos desencadeados por essa categoria, as toxinas mais comumente liberadas são; *stx1*, *stx2* e em alguns casos raros a *stx2c* (KAWANO et al., 2012).

O mecanismo pelo qual esta toxina atua no organismo é através da inativação da síntese proteica ao remover a adenina de um sítio específico do RNA mensageiro (rRNA), e quando em casos críticos a mesma atinge a corrente sanguínea há o aparecimento da síndrome hemolítica-urêmica, ligando-se a receptores no epitélio dos rins e vasos sanguíneos. Uma vez inativada a síntese proteica ocorre a morte das células afetadas (BROOKS et al., 2005).

2.1.3 *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC)

E. coli enterotoxigênica é conhecida por causar diarreias em animais de produção. Em suínos, por exemplo, possuem fatores de virulência conhecidos como: enterotoxinas (termolábeis /LT e termoestáveis/ST), que são responsáveis pela sintomatologia (QUINN et al., 2002).

Ahmadi et al. (2009) constataram a presença de ETEC através da detecção da toxina LT nas fezes de aves, sugerindo ainda que essa cepa pode estar comumente presente nas fezes de vários animais.

As enterotoxinas são responsáveis pela aderência da bactéria na mucosa intestinal que desencadeia toda a sintomatologia da diarreia no hospedeiro. Estão divididas em: Ltl e LtII, Sta, e Stb. Esse fator de virulência é comum para *E. coli* enterotoxigênica (COSTA et al., 2006).

Ugrinovich et al. (2002) citam que a enterotoxina LtIII está intimamente associada ao consumo de produtos de origem animal contaminados e diarreia em humanos, sendo os animais considerados apenas reservatórios.

O mecanismo pelo qual as LTS desencadeiam os sintomas nos hospedeiros é devido à ligação que ocorre na borda em escova das células epiteliais no intestino delgado. Como resultado, há uma hipersecreção intensa e prolongada de água e cloretos, que inibe a reabsorção de sódio, provocando dessa forma os sintomas de diarreia, tais sintomas podem permanecer por dias (MURRAY et al., 2015)

Quanto à enterotoxina termoestável, o mecanismo da mesma consiste em estimular a secreção de líquidos através das células epiteliais. É importante salientar que muitas cepas que produzem St também produzem Lt, o que resulta em casos mais graves da doença (BROOKS et al., 2005).

2.1.4 *Escherichia coli* enteroinvasora (EIEC)

Escherichia coli enteroinvasora (EIEC) representa uma categoria de *E. coli* diarreinogênica com semelhanças bioquímicas e patogênicas com *Shigella spp.*. Ambas possuem a capacidade de invadir o tecido do cólon do hospedeiro causando lesões que desencadeiam os sintomas de diarreia nos mesmos através da presença de genes em um grande plasmídeo de invasão. A contaminação por EIEC está relacionada diretamente com o consumo de alimentos contaminados (ACCOGLI et al., 2013).

A EIEC age de forma intracelular no hospedeiro, esse tipo de invasão permite que a mesma replique-se dentro das células epiteliais, assim como em macrófagos também, sendo esta uma de suas principais particularidades. (KAPER et al., 2004)

Em aves, a semelhança da EIEC com a *Shigella spp.* pode ser a principal causa da não confirmação efetiva da presença da mesma (XIA et al., 2009). Podendo desta forma gerar falsos negativos, o que requer um diagnóstico laboratorial de maior sensibilidade, tal como o diagnóstico molecular (BINET et al., 2014).

Quanto aos fatores de virulência a EIEC também apresenta mecanismos semelhantes à bactéria *Shigella spp.* Ambas desencadeiam em seus hospedeiros uma desenteria bacilar através de uma invasão e multiplicação no interior das células epiteliais do cólon (BANDO et al., 2010).

O mesmo autor afirma ainda que a patogenicidade da EIEC parece ser resultado da secreção de plasmídeo do tipo III, responsável por liberar proteínas

(ipaA, IpaB, IpaC, e IpgD), que são os fatores de virulência que desencadeiam o processo de invasão celular do hospedeiro.

Estes desempenham a função enteroinvasiva às células epiteliais do cólon, sendo este considerado o plasmídeo de invasão para EIEC (GIBOTTI et al., 2004).

O gene *ipah* em EIEC embora seja capaz de causar lesões, possui a ressalva de permanecer em local restrito onde a lesão foi estabelecida, ou seja, não possui capacidade de se estender a lesão em locais fora do tecido alvo, além de não agravar a infecção. Dessa forma a expressão de fatores de virulência na EIEC é considerada relativamente baixa, quando comparada com as demais e com a *Shigella spp.* que apresenta fatores de virulência semelhantes (MORENO et al., 2009).

REFERÊNCIAS

ACCOGLI, M. et al. IncI1 plasmids associated with the spread of CMY-2, CTX-M-1 and SHV-12 in *Escherichia coli* of animal and human origin. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 19, n. 5, p. E238-E240, 2013.

AFSET, J.E.; BEVANGER, L.; ROMUNDSTAD, P. et al. Association of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) with prolonged diarrhea. **Journal of Medical Microbiology**, v.53, p.1137–1144, 2004.

AHAMADI, M. et al. Detection of LT and ST genes in the *Escherichia coli* isolated from the dogs, sheep and poultry. **Comparative Clinical Pathology**, v. 18, n. 4, p 407-412, 2009.

AMSON, G.V.; HARACEMIV, S.M.C.; MASSON, M.L. Levantamento de dados epidemiológicos relativos à ocorrências/ surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTAs) no Estado do Paraná- Brasil, no período de 1978 a 2000. **Ciência Agrotécnica.**, v. 30, n. 6, p. 1139-1145, 2006 .

ARANDA,K.R.S.; FAGUNDES, U.N.; SCALETSKY,I.C.A. Evaluation of Multiplex PCRs for Diagnosis of Infection with Diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* spp. **Journal of Clinical Microbiology**. V. 42, N. 12, p. 5849–5853, 2004.

BANDO, S.Y.; et al. Expression of bacterial virulence factors and cytokines during in vitro macrophage infection by enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella flexneri*: a comparative study. **Memorando Instituto Oswaldo Cruz**. v. 105, n.6, p.786-791, 2010.

BELLUCO, S. et al. *Escherichia coli* and Enterobacteriaceae counts on poultry carcasses along the slaughterline: A systematic review and meta-analysis. **Food Control**, v. 60, p. 269–280, 2016.

BERTÃO, A.M.S.; SARIDAKIS, H.O. *Escherichia coli* produtora de toxina shiga (STEC): principais fatores de virulência e dados epidemiológicos. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**. v. 28, n. 2, p. 81-92, 2007.

BINET,R. et al. Rapid detection of *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli* in produce enrichments by a conventional multiplex PCR assay. **Elsevier**. v. 40 , p. 48–54, 2014.

BRASIL. Portaria nº 210, de 10 de novembro de 1998. Regulamento técnico da Inspeção Tecnológica e Higiênico-Sanitária de Carne de Aves. In:BRASIL: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Diário Oficial da União**. Brasília, p. 17-22, de 05 de março de 1999, Seção I.

BROOKS, G F. et al. **Microbiologia Médica de Jawetz, Melnick e Adelberg**. McGraw Hill Brasil, 2005, p.222.

CAMPOS, L. C.; FRANZOLIN, M. R.; TRABULSI, L. R. Diarrheagenic *Escherichia coli* categories among the traditional enteropathogenic *E. coli* O serogroups: a review. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 6, p. 545-552, 2004.

COSTA, M. M.; et al. Caracterização epidemiológica, molecular e perfil de resistência aos antimicrobianos de *Escherichia coli* isoladas de criatórios suínos do sul do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.26, p. 1: 5- , 2006.

COURA, F. M.; LAGE, A. P.; HEINEMANN, M. B. Patotipos de *Escherichia coli* causadores de diarreia em bezerros: Uma atualização. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 9, p. 811–818, 2014.

DUTTA, T.K. et al. Detection & characterization of Shiga toxin producing *Escherichia coli* (STEC) & enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) in poultry birds with diarrhoea. **Indian Journal Medical Research**. v.133, n.5, p. 541–545, 2011.

FERENS, W. A.; HOVDE, C. J. *Escherichia coli* O157:H7: Animal Reservoir and Sources of Human Infection. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 8, n. 4, p. 465–487, 2011.

FERNANDES, H.; ZHANG, P. Overview of molecular diagnostics in clinical pathology. **Elsevier**. p,. 3287-3303, 2014.

GIBOTTI, A.; et al. Molecular characterization of enteroinvasive *Escherichia coli ipa* genes byPCR- RFLP analysis. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.35, p.74-80, 2004.

GOUFFAUX, F. et al. “Effacement (LEE) of”. **Mechanisms in the Pathogenesis of Enteric Diseases**, n.2, v.473, p.129 ,2012.

GUASTALLI, E.A.L. **Estudo dos fatores de virulência, sorogrupos, patogenicidade e susceptibilidade antimicrobiana das cepas de *escherichia coli* isoladas de pintainhas de reposição de postura**. Dissertação (mestrado), Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”- faculdade de ciências agrárias e veterinárias, 84p, 2009.

HIRSH, D.C.; ZEE, Y.C. **Microbiologia Veterinária**. 1.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan,. 464p., 2009.

HU, J.; TORRES, A.G.. Enteropathogenic *Escherichia coli*: foe or innocent bystander. **Clinical Microbiology and Infection**,v.21, n.8, p.729-734, 2015.

IBGE:Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção da pecuária nacional**. v.2013. Disponível em: <www.ibge.gov.br> Acesso em 20 abril.2014.

KAPER ,J.B.; NATARO, J.P.; MOBLEY,H.L. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**. v. 2,p.123-40, 2004.

KAWANO, K.; et al. Relationship between stx Genotype and Stx2 Expression Level in Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O157 Strains. **Journal of Infectious Disease**. v. 65, p.322-325, 2012.

KLETA, S. et al. Role of F1C Fimbriae, Flagella, and secreted bacterial components in the inhibitory effect of probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 on atypical enteropathogenic *E. coli* infection. **Infection and Immunity**, v. 82, n. 5, p. 1801–1812, 2014.

MENDES, R. **Caracterização fenotípica e genotípica de *Escherichia coli* proveniente de lesões de celulite de frangos de corte**. Dissertação (mestrado) universidade federal do recôncavo da bahia centro de ciências agrárias ambientais e biológicas, 2011.

MITTELSTAEDT, S.; CARVALHO, V.M.. *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) O157:H7- revisão. **Revista Instituto Ciência e Saúde**. v..24, n.3, p.175-82, 2006.

MORENO, A.C.R.; FERREIRA, L.G.; MARTINEZ, M.B. Enteroinvasive *Escherichia coli* vs. *Shigella flexneri*: how different patterns of gene expression. **Affect Virulence. Microbiology Letters**. v.301, p.156–163, 2009.

MURRAY, P.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiología Médica**. Elsevier Brasil, 2015.

PHILIPS, J.A.; BLASER, M.J. Introduction to bacteria and bacterial diseases. **Principles and Practice of Infectious Diseases**, v.2, p. 2234-2236, 2015.

PIGATTO, C.P.; et al. Viabilidade de *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC) não O157 em queijo tipo minas frescal. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 2, p. 663-668, 2009.

QUINN P.J.; MARKEY B.K.; CARTER, M.E. **Veterinary Microbiology and Microbial Disease**. Blackwell Science, London, p. 268, 2002.

ROCHA, O.; QUIROGA, C. Aves. **Libro Rojo de Vertebrados de Bolivia, CDC-Bolivia**, p. 95-164, 1996.

SILVA, et al. Caracterização genotípica dos isolados de *Escherichia coli* provenientes de frangos de corte. **Arquivo Brasileiro de Medicina. Veterinária e Zootecnia**. v.63, n.2, p.333-339, 2011

SILVA, I.M.M.; et al. Presença de *Escherichia coli* em fígados de frangos provenientes de matadouros avícolas. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**. v.13, n.3, p.694-700, 2012.

SYDOW, V.A.C.M.D.G.; et al. Ocorrência de fatores de virulência em estirpes de *Escherichia coli* isoladas de fezes de cães errantes. **Arquivo Instituto Biológico**. v.73, n.4, p.401-407, 2006.

TAHAMTAN, Y.; HAYATI, M.; NAMAVARI, M.M. Prevalence and distribution of the *stx1*, *stx2* genes in Shiga toxin producing *E. coli* (STEC) isolates from cat. IRAN. **Journal of Microbiology**. v.2 ,n.1, p. 8-13, 2010.

TRABULSI, L.R.; KELLER, R.G. TAT Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **Emerging Infectious Diseases**. v.8, p.508-513,2002.

UGRINOVICH, L. A. et al. Identification of the genes that encode for the It-ii thermolabile enterotoxin among strains of *Escherichia coli* isolated from calves with diarrhea in the region of Jaboticabal, sp, Brazil. **Ciência Rural**, v. 32, n. 2, p. 289-291, 2002.

UNIÃO BRASILEIRA DOS AVICULTORES – UBABEF. **Relatório Anual 2013**. Disponível em: <http://www.ubabef.com.br/>. Acesso em: 20 abril de 2014.

VIEIRA, Mônica Aparecida Midolli. Ilhas de patogenicidade. **O Mundo da Saúde**, São Paulo: v.33,n.4, p.406-414,2009.

XIA, Yang et al. Study on chicken *Shigella boydii* by random amplified polymorphic DNA. **Journal of Northwest A & F University-Natural Science Edition**, v. 37, n. 10, p. 12-18, 2009.

CAPÍTULO II

Fatores de virulência de *Escherichia coli* isoladas de lesões de aves abatidas sob inspeção federal no Estado do Tocantins.

Fatores de virulência de *Escherichia coli* isoladas de lesões de aves abatidas sob inspeção federal no Estado do Tocantins

Escherichia coli virulence factors isolated from poultry injuries slaughtered under federal inspection in the State of Tocantins

Resumo: Os prejuízos causados por *Escherichia coli* patogênicas na produção de aves é a justificativa de pesquisas realizadas constantemente em função da produção em larga escala, do tipo de criação e do manejo de frangos de corte. Lesões ocasionadas por microrganismos vêm se tornando cada vez mais frequentes e são consideradas como uma das maiores causas de condenações totais e parciais de carcaça em frangos de corte. O objetivo deste trabalho foi identificar genes de virulência através da técnica de PCR de 117 cepas de *Escherichia coli* isoladas de vísceras e sistema respiratório superior de aves abatidas sob inspeção no Estado do Tocantins. Na análise dos genes de virulência, o gene *est* foi o mais frequente nas amostras 10% (12/117), seguido de *elt* 9% (11/117), *bfpA* 9% (11/117), *stx1* 4% (5/117) e *eae* 3% (3/117). Quando subdividido por amostras clínicas 16% (19/117) foram positivos de isolados do sistema respiratório superior, 12% (14/117) de coração e 8% (9/117) do fígado. Em relação às unidades federativas de origem das aves, Goiás foi o Estado que obteve maior número de positivos 20% (24/117), seguido de Distrito Federal 9% (11/117), Tocantins 4% (5/117) e São Paulo 1% (2/117). Os resultados encontrados reforçam a necessidade de constantes pesquisas na produção avícola uma vez que esta bactéria representa importante papel na cadeia epidemiológica.

Palavras-chave: Colibacilose. Diagnóstico. Estirpes.

Abstract: The damage caused by pathogenic *Escherichia coli* in poultry production is the justification for continuing research made on the basis of large-scale production, the type of farming and broiler chickens handling. Injuries caused by microorganisms are becoming more frequent and are considered a major cause of total or partial condemnation of poultry carcasses. The aim of this study was to identify virulence genes by PCR of 117 strains of *Escherichia coli* isolated from viscera and upper respiratory system of birds slaughtered under inspection in the State of Tocantins. In the analysis of virulence genes, *est* gene was the most common samples in 10% (12/117), followed by *elt* 9% (11/117) *bfpA* 9% (11/117) 4% *stx1* (5/117) and *eae* 3% (3/117). When subdivided in clinical samples, 16% (19/117) isolates were positive from the upper respiratory system, 12% (14/117) of the heart and 8% (9/117) of the liver. Regarding the federal units of origin of poultry, the State of Goiás obtained the highest number of positive 20% (24/117), followed by Federal District 9% (11/117), Tocantins 4% (5/117) and São Paulo 1% (2/117). The results reinforce the need for ongoing research in poultry production because this bacteria represent important role in the epidemiological chain.

Keywords: Colibacillosis. Diagnostic. strains.

1. INTRODUÇÃO

Há relatos de que a *Escherichia coli* (*E. coli*) tenha sido descrita pela primeira vez no ano de 1885 na Alemanha por um médico pediatra chamada Theodor Escherich. Posteriormente no ano de 1893, as espécies de *E. coli* foram diferenciadas em patogênicas e não patogênicas. Atualmente, essa divisão é realizada por meio da virulência capaz de desencadear distintas patologias em espécies animais e em humanos (MAINIL, 2013).

O gênero *E. coli* é componente natural da flora intestinal de mamíferos, porém a existência de cepas patogênicas podem desencadear sintomas diarreinogênicos, assim como doenças extra intestinais. As cepas patogênicas são responsáveis por altos índices de mortalidade e morbidade em humanos e animais (CROXEN et al., 2013).

Em aves, a infecção por *E. coli* pode ocorrer em distintas fases da criação das mesmas desencadeando problemas respiratórios graves (DINEV, 2014). A colibacilose é uma das principais causas de perdas econômicas na produção avícola (MACHADO et al., 2013).

No Brasil, aves acometidas de lesões desencadeadas por microrganismos patogênicos devem ser condenadas, tanto vísceras como carcaças em sua totalidade ou parcialmente (BRASIL, 1998).

A portaria de nº 210 do BRASIL (1998) considera que lesões que envolvem pericardite, perihepatite e aerossaculite são lesões normalmente ocasionadas por *E. coli*. Estas lesões são classificadas como a tríade de condenação de carcaças por colibacilose (FERREIRA & KNOBL, 2000).

A capacidade de um microrganismo desencadear uma doença é definida como patogenicidade, a qual se dá através da expressão de fatores de virulência por meio de genes específicos para cada mecanismo utilizado para colonizar e desencadear eventos que afetam a homeostasia do hospedeiro (VIEIRA, 2009).

O diagnóstico de microrganismos em alimentos através da técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) tem sido um método amplamente utilizado por ser uma prova irrevogável padrão ouro. Desta forma, tem se tornado uma ferramenta de auxílio na rápida detecção de patógenos que afetam à segurança alimentar do consumidor final do produto (CANDRIAN, 1995).

O presente trabalho teve como objetivo identificar genes de virulência em cepas de *E. coli* isoladas de aves abatidas sob inspeção federal no estado do

Tocantins. Uma vez que há poucos relatos de DEIC'S relacionadas com lesões extra intestinais em aves, pois a infecção desta categoria é comum em mamíferos, e o potencial patogênico tem afetado diretamente a produção avícola em função da produção em larga escala, do tipo de criação e do manejo de frangos de corte.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram avaliadas 117 estirpes de *Escherichia coli* (50 isoladas de sistema respiratório superior, 36 de coração e 31 de fígado) pertencentes à coleção bacteriológica do Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Escola de Medicina veterinária e Zootecnia da Universidade Federal do Tocantins. Estas bactérias foram isoladas de aves provenientes dos estados de Goiás, Tocantins, São Paulo e Distrito Federal, condenadas pelo serviço de inspeção federal do Estado do Tocantins por apresentarem lesões sugestivas de colibacilose, aerossaculite, pericardite e perihepatite entre agosto de 2010 e junho de 2012.

Cada amostra de *E. coli* foi individualmente repicada, com o auxílio de uma alça de platina em Ágar MacConkey, e incubadas a 37° C por um período de 24 horas.

Após crescimento em ágar MacConkey, cada amostra foi repicada em tubo de ensaio contendo ágar TSA (Himedia®), e incubada a 37° C por 24 h (COSTA et al., 2010).

Para a extração do DNA foi utilizado o protocolo de termo extração proposto por Costa et al. (2010). Onde o crescimento bacteriano obtido do ágar TSA foi transferido com auxílio de *swabs* para microtubos com 400 µL de água destilada ultrapura e submetidas a 100 °C por 10 min em banho seco, com choque térmico seguido de descongelamento, e centrifugadas a 12.000 G por 10 minutos.

Para a PCR foram utilizados dois multiplex preparados em 25 µL do *mix* para amplificação do DNA, conforme Costa, 2010: 5X solução tampão (Buffer IVB PHneutria®); dNTPs (10 mM); *primer* F (20 pMol/µL); *primer* R (20 pMol/µL), os oligonucleotídeos utilizados estão descritos no quadro 1; *Taq* polimerase DNA (1 UNID); DNA teste (50 nM a 200 nM).

Como controles positivos foram utilizadas as amostras de referência *Escherichia coli* H104 O7, *Escherichia coli* 2348/69, *Escherichia coli* CDC EDL 933, O157:H7, *Escherichia coli* EDL 1284. Controles negativos incluíram adição de água estéril ultrapura ao mix da reação.

Fatores de virulência (genes)	Multiplex	Iniciador	Sequência (5' – 3')	Produto (pb)/T° de anelamento	Referência
Toxina termoestável (<i>est</i>)	Multiplex 2	ST-1 /ST-2	CTGTATTGTCTTTTTACCT	182/56 °C	Tornieporth (1995)
			GCACCCGGTACAAGCAGGAT		
Toxina temolábil (<i>elt</i>)	Multiplex 1	LT-1/LT-2	GCGACAAATTATACCGTGCT	707/50 °C	Tornieporth (1995)
			CCGAATTCTGTTATATATGT		
Fímbria BFP (<i>bfpA</i>)	Multiplex 1	EP-1/EP-2	CAATGGTGCTTGCGCTTGCT	329/ 50 °C	Donnenberg (1992)
			GCCGCTTTATCCAACCTGGT		
Intimina (<i>eae</i>)	Multiplex 1	EAE-1/EAE-2	AAACAGGTGAAACTGTTGCC	454/ 50 °C	Yu (1992)
			CTCTGCAGATTAACCTCTGC		
Antígeno de invasão (<i>ipaH</i>)	Multiplex 2	EI-1/EI-2	GCTGGAAAACTCAGTGCCT	424/ 56 °C	Venkatesan (1989)
			CCAGTCCGTAAATTCATTCT		
Toxina Shiga1 (<i>stx1</i>)	Multiplex 2	STX-1A/STX-1B	CAACACTGGATGATCTCAG	349/ 56 °C	Pal (1999)
			CCCCCTCAACTGCTAATA		
Toxina Shiga2 (<i>stx2</i>)	Multiplex 2	STX-2A/STX-2B	ATCAGTCGTCACACTGCTGGT	110/ 56 °C	Pal (1999)
			CTGCTGTCACAGTGACAAA		

Quadro 1. Oligonucleotídeos utilizados neste trabalho e o tamanho dos amplicons.

No multiplex 1 foram utilizados os iniciadores para genes *bfpA*, *eae* e *elt*. As amostras foram levadas ao termociclador, programado com uma sequência de 35 ciclos na seguinte sequência de temperaturas e tempos: 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos e 50°C de anelamento por 60 segundos. Após o último ciclo a reação foi finalizada com um período extra de extensão de 5 minutos a 72°C, permanecendo estocada a 4°C no final da reação.

Para o multiplex 2, foram utilizados os genes *est*, *stx1*, *sxt2* e *ipah* em 35 ciclos na seguinte sequência de temperaturas e tempos: 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos e 56°C de anelamento por 60 segundos. Após o último ciclo a reação foi finalizada com um período extra de extensão de 5 minutos a 72°C, permanecendo estocada a 4°C no final da reação.

Os produtos de DNA amplificados foram submetidos à eletroforese horizontal, em gel de agarose 1,5%, contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídeo, em tampão de corrida TBE (40mM Tris-acetato, 2mM EDTA pH 8,0). Um volume de 10 µL de cada amplicon, acrescido de 2 µL de tampão de amostra (glicerol 40%, azul de bromofenol 0,02%) aplicado no gel.

A corrida eletroforética foi realizada a 110V por 50 minutos e, para a determinação do tamanho dos produtos amplificados, foi utilizado um marcador de

peso molecular de 100 pares de base. Os produtos da PCR foram visualizados em transluminador de luz ultravioleta e foto documentado.

Para avaliação dos resultados de identificação dos agentes envolvidos e a associação entre eles foram utilizados os teste de frequência absoluta e relativa (SAMPAIO, 2002).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 117 amostras analisadas 36% (42/117) foram positivas para pelo menos um dos fatores de virulência.

Ao verificar os fatores de virulência isolados em relação ao tipo de amostra clínica observou-se que 16% (19/117) de pelo menos um fator de virulência pesquisado foi isolado do sistema respiratório superior, 12% (14/117) de coração e 8% (9/117) do fígado (Tabela 1).

Dados que corroboram com a literatura uma vez que o principal agente relacionado com estas lesões extra intestinais mencionadas é a *E. coli* patogênica (ITO et al., 2007) cuja lesão característica de colibacilose apresenta-se na forma de tríade perihepatite, pericardite e aerossaculite (MACARI, 2002).

O mecanismo pelo qual conduz a entrada desta bactéria na circulação sanguínea ainda não está totalmente elucidado, a explicação mais aceita é que através do pulmão e dos inúmeros capilares sanguíneos a mesma consegue invadir a corrente sanguínea e conseqüentemente colonizar órgãos como fígado e coração desencadeando lesões nos mesmos (CHOUIKHA et al., 2008). O que justifica um maior número de presença de *E. coli* no sistema respiratório superior encontrado neste trabalho, já que esta é considerada a primeira via de disseminação interna após a infecção por esta bactéria.

Tabela 1. Percentual de presença de genes de virulência de *E. coli* presentes em vísceras e sistema respiratório superior de aves abatidas sob inspeção no Estado do Tocantins entre agosto de 2010 a junho de 2012.

Genes	Coração		Fígado		SRS*	
	POS ¹ (%) ²	NEG ¹ (%) ²	POS ¹ (%) ²	NEG ¹ (%) ²	POS ¹ (%) ²	NEG ¹ (%) ²
EST	3 (2%)	12 (14%)	3 (2%)	10 (8%)	6 (5%)	14 (11%)
ELT	4 (3%)	16 (13%)	2 (1%)	15 (12%)	5 (4%)	18 (15%)
BFPA	3 (2%)	18 (15%)	2 (1%)	11 (9%)	6 (5%)	18 (15%)
STX1	1 (0.8%)	26 (22%)	2 (1%)	23 (19%)	2 (1%)	25 (21%)
EAE	3 (2%)	22 (18%)		23 (19%)		46 (39%)
Total³	14 (12%)	94	9 (8%)	82	19 (16%)	121

*SRS = Sistema Respiratório superior; 1= Número de cepas positivas e negativas provenientes de vísceras; 2= Porcentagem calculada em relação às frequências totais analisadas; 3= Porcentagem calculada em relação ao total de cepas analisadas.

Quando observados os genes de virulência isoladamente, observou-se que o gene *est* (Anexo 3) obteve a maior taxa de positivos com 10% (12/117), subdivididos

em 5% (6/117) para sistema respiratório superior, seguido por 2% (3/117) para coração e 2% (3/117) para o fígado (Tabela 1).

O gene *elt* (Anexo 1) obteve a segunda maior taxa de positivos com 9% (11/117) subdivididos em 4% (5/117) do sistema respiratório superior, 3% (4/117) no coração e 1% (2/117) do fígado (Tabela 1).

Em aves, a infecção pela categoria ETEC (*elt/est*) é considerada secundária quando comparada a outros agentes e a sua manifestação é extra intestinal (MACARI, 2002) o que justifica a presença de lesões no coração fígado e sistema respiratório superior encontrado neste trabalho. As taxas destes genes encontradas neste trabalho podem ser justificadas pela alta associação de infecção desta categoria em aves (CLARK et al., 1998).

O manejo das aves e as condições ambientais as quais as mesmas são expostas são fatores decisivos para disseminação deste patógeno e desencadeamento da doença nas aves em suas distintas fases de criação (MACARI, 2002).

O gene *bfpa* (Anexo 1) obteve a terceira maior taxa de positivos 9% (11/117) das quais, 5% (6/117) foram do sistema respiratório superior, seguido por coração com 2% (3/117) e fígado 1% (2/117) (Tabela 1).

Resultados semelhantes foram obtidos na Tailândia, em que EPEC (*bfpa/eae*) positivas foram identificadas em maior número para o gene *bfpa* do que *eae*, foram identificados em carne de aves (PANNUCH et al., 2014).

O gene *stx1* (Anexo 2) obteve a quarta maior taxa de positivos 4% (5/117), sendo 1% (2/117) oriunda do fígado, 1% (2/117) do sistema respiratório superior e 0.8% (1/117) para coração (Tabela 1).

Não é comum isolar EHEC (*stx1/stx2*) em aves. Sendo um raro estudo feito para detecção deste sorotipo foi feito por Costa (2010) que ao analisar 138 coxas de frango no município de São Paulo não detectou a presença da mesma.

O gene *eae* (Anexo 1) obteve a quinta maior taxa de positivos 2% (3/117), sendo todas provenientes do coração 2% (3/117) (Tabela 1).

Podemos também observar que mais de um gene foi encontrado simultaneamente em relação às amostras clínicas (Tabela 2). Entre eles os mais frequentes entre os estudados foram o gene *est* com o gene *elt* em 11% (13/117) das amostras, o que caracteriza uma *E. coli*. enterotoxigênica (ETEC), com maior

número no coração 5% (6/117), seguido do fígado com 3% (4/117) e sistema respiratório superior 2% (3/117) (Tabela 2).

Tabela 2. Distribuição dos genes de virulência de *E. coli* e associações em fígado, coração e sistema respiratório superior de aves condenadas sob Inspeção Sanitária no Estado do Tocantins entre agosto de 2010 a junho de 2012.

Gene	Amostra clínica			Total
	Coração	Fígado	SRS	
	POS	POS	POS	
<i>Est</i>	3	2	7	12
<i>est+eae</i>	1	0	1	2
<i>est+bfpa</i>	5	7	1	13
<i>elt+est</i>	6	4	3	13
<i>est+eae+bfpa</i>	1	0	1	2
<i>est+bfpa+elt</i>	0	2	0	2
Total est	16	15	13	44
<i>Elt</i>	4	2	5	11
<i>elt+eae</i>	1	1	0	2
<i>elt+bfpa</i>	0	2	0	2
<i>elt+bfpa+est</i>	0	2	0	2
<i>elt+est</i>	6	4	3	13
<i>Elt</i>	4	2	5	11
Total elt	15	13	13	41
<i>Bfpa</i>	3	2	6	11
<i>bfpa+eae</i>	1	1	1	3
<i>bfpa+elt</i>	0	2	0	2
<i>bfpa+elt+est</i>	0	2	0	2
<i>bfpa+eae+est</i>	1	0	1	2
<i>bfpa+est</i>	5	7	1	13
Total bfpa	10	14	9	33
<i>stx1</i>	1	2	2	5
Total stx1	1	2	2	5
<i>Eae</i>	3	0	0	3
<i>eae +bfpa</i>	1	1	1	3
<i>eae+ bfpa+est</i>	1	0	1	2
<i>eae +elt</i>	1	1	0	2
<i>eae +est</i>	1	0	1	2
Total eae	7	2	3	12

O gene *est* (ETEC) apareceu associado ao gene *bfpa* (EPEC) em 11% (13/117) das amostras, sendo 6% (7/117) no fígado, seguidos pelo coração com 4% (5/117) e sistema respiratório superior 0.8% (1/117) (Tabela 2).

Em algumas amostras foram observadas presença de 2% (3/117) de EPEC típica, com presença simultaneamente dos genes *bfpa* e *eae*, sendo 0.8% (1/117) do coração, 0.8% (1/117) no fígado e 0.8% (1/117) no sistema respiratório superior (Tabela 2).

O gene *eae* (EPEC) surgiu associado com o gene *elt* (ETEC) em 1% (2/117) das amostras, sendo destas uma pertencente ao coração 0.8% (1/117) e outra do fígado 0.8% (1/117). E com o gene *est*, o mesmo esteve associado em 1% (2/117), uma no coração 0.8% (1/117) e outra do sistema respiratório superior 0.8% (1/117) (Tabela 2).

Segundo Pourbakhsh et al. (1997) a expressão de fímbrias parece estar relacionada com estágios avançados de lesões em vísceras. O que justifica um maior número de positivos para o gene *bfpa* quando comparado com o gene *eae*.

A maioria destas fímbrias é composta de uma única subunidade de proteína, mas algumas fímbrias podem conter outros polipeptídeos. Essa diversidade faz com que as mesmas reconheçam e ligue-se a glicolípideos relativamente simples ou glicoproteínas presentes na superfície da célula epitelial do hospedeiro ou em determinados tipos de eritrócitos. Sendo este um ponto crucial para a colonização de *E. coli* com a célula do hospedeiro (GRAAF & MOOI, 1987).

Rothbaumet et al. (1983) constataram que as lesões encontradas em decorrência da presença de cepas de EPEC se deve a danos intracelulares devido a dilatação do retículo endoplasmático rugoso, alterações nas mitocôndrias e alterações citoplasmáticas, assim como separações nas junções intracelulares dos tecidos, sendo estas alterações mais severas nos tecidos específicos do intestino.

O gene *stx1* não esteve associado a nenhum outro gene, e foi detectado em 4% (5/117) das amostras, sendo destas 0.8% (1/117) no coração, 1% (2/117) no fígado e 1% (2/117) no sistema respiratório superior (Tabela 2).

O fato da ocorrência de associação entre os genes de virulência encontrados neste trabalho pode ser justificado pela recombinação e aquisição de fatores de virulência horizontalmente entre as bactérias, desta forma existe uma necessidade de mais estudos no que se diz respeito a mecanismos genéticos da patogenicidade de *E. coli* uma vez que a mesma tem demonstrado alto potencial para recombinações (BANDO, et al., 2010).

Contudo, a relevância dos achados neste trabalho coloca em questão se as *E. coli* DEIC's amplamente associadas a lesões e sintomatologia no TGI são capazes de alterar tecidos de diferentes órgãos em aves.

Outra observação realizada foi a distribuição dos achados em relação às unidades federativas (Tabela 3 e 4).

Em análise para cada unidade federativa, observou-se um maior número de positivos no Estado de Goiás com 20% (24/117), seguido por Distrito Federal 9% (11/117), Tocantins com 4% (5/117) e São Paulo com 1% (2/117) (Tabela 3).

Quando analisado o gene *est*, Distrito Federal foi a unidade federativa com maior taxa de positivos 5% (6/117), seguido por Goiás com 2% (3/117), Tocantins com 2% (3/117) e nenhuma amostra para São Paulo (Tabela 3).

Para o gene *elt*, Goiás foi o Estado que obteve maior taxa de positivos com 7% (8/117), seguido por Distrito Federal com 1% (2/117), São Paulo com 0.8% (1/117) e nenhuma amostra positiva oriunda do Tocantins (Tabela 3).

Ao observar o gene *bfpa*, Goiás foi o Estado com maior taxa de positivos 6% (7/117), seguido por Distrito Federal com 1% (2/117), São Paulo com 0.8% (1/117) e Tocantins com 0.8% (1/117) (Tabela 3).

Para o gene *stx1*, quando analisado Goiás foi o Estado com maior número de positivos 2% (3/117), Distrito Federal com 0.8% (1/117), Tocantins com 0.8% (1/117) de positivos e nenhuma amostra de São Paulo (Tabela 3).

Já o gene *eae* Goiás obteve a totalidade das amostras positivas 2% (3/117) (Tabela 3).

Tabela 3. Distribuição de presença de genes de virulência de *E. coli* presentes em vísceras e sistema respiratório superior de aves com lesões abatidas sob inspeção no Estado do Tocantins entre agosto de 2010 a junho de 2012 e seus respectivos Estados de origem.

Genes	DF		GO		SP		TO	
	POS	NEG	POS	NEG	POS	NEG	POS	NEG
EST	6 (5%)	11 (9%)	3 (2%)	49 (41%)		4 (3%)	3 (2%)	10 (8%)
ELT	2 (1%)	18 (15%)	8 (7%)	45 (38%)	1 (0.8%)	5 (4%)		2 (1%)
BFPA	2 (1%)	17 (14%)	7 (6%)	49 (41%)	1 (0.8%)	6 (5%)	1 (0.8%)	13 (11%)
STX1	1 (0.8%)	22 (18%)	3 (2%)	60 (51%)		10 (8%)	1 (0.8%)	20 (17%)
EAE		21 (17%)	3 (2%)	56 (47%)		9 (7%)		21 (17%)
Total³	11 (9%)	89	24 (20%)	259	2 (1%)	34	5 (4%)	66

*SRS = Sistema Respiratório superior; 1= Número de cepas positivas e negativas provenientes de vísceras; 2= Porcentagem calculada em relação às frequências totais analisadas; 3= Porcentagem calculada em relação ao total de cepas analisadas.

A *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) é uma das principais causas de diarreia em animais monogástricos. A presença de fímbrias é decisiva para a liberação das enterotoxinas termo-estáveis (*est*) e termolábeis (*elt*) (MELKEBEEK et al., 2013).

O mecanismo pelo qual estas enterotoxinas conseguem quebrar a homeostasia do hospedeiro parece estar relacionado com a indução da fagocitose celular com aparente alteração citoplasmática (TANG et al., 2014). Justificando desta forma a presença desta espécie de bactéria em tecidos lesionados haja vista sua capacidade fagocítica.

Esta categoria tem sido amplamente associada com casos de colibacilose em animais de produção, isto como resultado de adesão que é responsável por alterações morfológicas nas células (NAGY & FEKETE, 2005). O que justifica a associação desta categoria com aves condenadas por colibacilose neste trabalho.

A *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) possui mecanismos de citotoxicidade através da liberação de enterotoxinas *stx1* e *stx2* que por meio do recepto Gb3 da célula do hospedeiro inibem a síntese proteica através da enzima *N-glycosidase*. (GRANUM & BRYNESTAD, 1999).

Uma das principais formas de prevenção desta categoria consiste em um manejo sanitário eficiente cujas práticas sejam efetivas no quesito higiênico do local de criação dos animais, tais como, uso constante de análise da água fornecida aos animais e utilizada nos processos de limpeza dos galpões, sanitização freqüente, observação de taxa de lotação, manejo adequado de dejetos (INSTITUTE FOR INTERNATIONAL COOPERATION IN ANIMAL BIOLOGICS, 2010). Sugerindo desta forma que falhas no manejo higiênico-sanitário estejam atreladas aos resultados obtidos neste trabalho para esta categoria.

O baixo índice de positivos para o gene *eae* encontrado neste trabalho corroboram com os achados por Krause et al. (2005), os autores obtiveram uma taxa de apenas 2.3% de positivos para o gene o mesmo gene em 607 aves.

O gene *eae* é responsável por lesões peculiares que culminam na destruição dos enterócitos, rearranjo do citoesqueleto celular e consequente perda das microvilosidades do intestino delgado do hospedeiro, a esta lesão dá se o nome de “*attaching and effacing*” (A/E) (WALES et al., 2005).

A capacidade desta cepa de desencadear a lesão A/E é codificada pelo gene cromossomal *eae* oriundo de uma ilha de patogenicidade denominada Locus enterocyte effacement (LEE) que possui um peso molecular de 35 Kda (MC DANIEL et al., 1995). O baixo índice encontrado neste trabalho pode ser oriundo de algum tipo de falha de mecanismo desta ilha de patogenicidade uma vez que esse gene responsável pela ligação íntima no enterócito foi encontrado em tecidos com histologia distinta em comparação ao intestino delgado.

Esta ilha de patogenicidade é capaz de produzir o sistema de secreção do tipo III. Um exemplo das proteínas oriundas deste mecanismo é a Tir que é secretada pelo gene *tir* cuja função é de inserção na membrana do enterócito para se tornar um receptor para a intimina codificada pelo gene *eae* (KENNY et al., 1997).

Outro mecanismo dependente de enterócitos consiste na necessidade de migração de proteínas da porção basolateral dos mesmos para a superfície apical que também funcionam como receptores da intimina (MUZA-MOONS et al., 2003). O que coloca em questão se em tecidos como coração, fígado e sistema respiratório superior de aves há a produção desta intimina codificada pelo gene *eae* que

depende da fisiologia celular do enterócito para induzir a produção da mesma neste tipo celular.

Mc Daniel et al. (1995) constataram que o locus *eaeA* está presente normalmente em cepas de *E. coli* virulenta presente em EPEC's contendo várias regiões implicadas na formação de lesão A/E que codificam todos os determinantes conhecidos de uma característica essencial para patogênese desta categoria. Porém mutações neste locus elimina a transdução de sinal associada e conseqüentemente a formação deste tipo de lesão dependente do gene *eae*. Uma possível mutação poderia justificar o baixo índice de positivos para este gene, tendo em vista a habilidade constante de mutações nesta categoria de bactérias.

Foi possível identificar que mais de um gene foi encontrado simultaneamente em relação à unidade federativa (Tabela 4), foi observada a presença de 11% (13/117) amostras com os genes *elt/est* (ETEC) simultaneamente, com maior número 5% (6/117) para Goiás, seguido por São Paulo com 3% (4/117), Distrito Federal com 1% (2/117) e Tocantins com 0.8% (1/117) (Tabela 4).

Houve associação do gene *est* com o gene *bfpa* em 11% (13/117) das amostras, sendo 5% (6/117) no Tocantins, 2% (3/117) no Distrito Federal, 1% (2/117) em Goiás e 1% (2/117) em São Paulo (Tabela 4).

O *elt* esteve associado com o gene *bfpa* em uma amostra proveniente de Goiás 1% (2/117) (Tabela 4).

Das amostras de EPEC típica (*bfpa* + *eae*) 2% (3/117), 1% (2/117) ao Goiás e 0.8% (1/117) pertencia ao Distrito federal (Tabela 4).

O gene *eae* (EPEC) esteve associado com o gene *elt* (ETEC) em 1% (2/117) amostras todas oriundas do Estado de Goiás. Com o gene *est* o mesmo esteve associado em duas amostras das quais 1% (2/117) foram oriundas do Goiás (Tabela 4).

O gene *stx1* não esteve associado a nenhum outro gene, apareceu isolado em 4% (5/117) das amostras (Tabela 4).

Tabela 4. Distribuição de genes de virulência de *E. coli* e associações de acordo com as unidades federativas de origem de aves condenadas abatidas sob Inspeção Sanitária no Estado do Tocantins entre agosto de 2010 a junho de 2012.

Gene	Unidade Federativa				Total
	DF POS	GO POS	SP POS	TO POS	
<i>Est</i>	6	3	0	3	12
<i>est+eae</i>	0	2	0	0	2
<i>est+bfpa</i>	3	2	2	6	13
<i>est+eae+bfpa</i>	0	1	0	0	1
<i>est+eae+elt</i>	0	0	0	0	0
<i>est+bfpa+elt</i>	1	1	0	0	2
<i>est+elt</i>	2	6	4	1	13
<i>est+stx1</i>	0	0	0	0	0
Total est	12	15	6	10	43
<i>Bfpa</i>	2	7	1	1	11
<i>bfpa+eae</i>	1	2	0	0	3
<i>bfpa+elt</i>	0	2	0	0	2
<i>bfpa+elt+est</i>	1	1	0	0	2
<i>bfpa+eae+est</i>	1	1	0	0	2
<i>bfpa+est</i>	3	2	2	6	13
<i>bfpa+stx1</i>	0	0	0	0	0
Total bfpa	8	15	3	7	33
<i>Elt</i>	2	8	1	0	11
<i>elt+eae</i>	1	1	0	0	2
<i>elt+bfpa</i>	0	2	0	0	2
<i>elt+bfpa+est</i>	1	1	0	0	2
<i>elt+eae+est</i>	0	0	0	0	0
<i>elt+est</i>	2	6	4	1	13
Total elt	6	18	5	1	30
<i>stx1</i>	1	3	0	1	5
Total stx1	1	3	0	1	5
<i>Eae</i>	0	3	0	0	3
<i>eae +bfpa</i>	1	2	0	0	3
<i>eae+ bfpa+est</i>	0	1	0	0	1
<i>eae+elt+est</i>	0	0	0	0	0
<i>eae +elt</i>	0	2	0	0	2
<i>eae +est</i>	0	2	0	0	2
Total eae	1	10	0	0	11

4. CONCLUSÃO

As amostras de *E. coli* isoladas de aves com colibacilose apresentaram perfil de virulência características de patógenos comumente associados a DEIC's. Os resultados obtidos servem como alerta para o potencial destas categorias de desencadearem não somente transtornos no TGI, mas também a colibacilose e desta forma ocasionar prejuízos devido ao volume de carcaças condenadas e os embargos econômicos consequentes.

É necessário ter um maior conhecimento sobre a ocorrência deste microrganismo na linha de processamento de carne de aves, assim como mais estudos a respeito da capacidade de mutação desta bactéria por meio dos mecanismos genéticos que a mesma detém.

REFERÊNCIAS

- BANDO, S. Y. et al. Expression of bacterial virulence factors and cytokines during in vitro macrophage infection by enteroinvasive *Escherichia coli* and *shigella flexneri*: A comparative study. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 6, p. 786–791, 2010.
- BRASIL. Portaria nº 210, de 10 de novembro de 1998. **Regulamento técnico da Inspeção Tecnológica e Higiênico-Sanitária de Carne de Aves**. In: **BRASIL: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Diário Oficial da União. Brasília, p. 17-22, de 05 de março de 1999, Seção I.
- CANDRIAN, U. Polymerase chain reaction in food microbiology. **Journal of Microbiological Methods**, v. 23, p.89-103, 1995.
- CHOUIKHA, I.; BREE, A.; MOULIN-SCHOULEUR, M.; GILOT, P.; GERMON, PIERRE .Differential expression of iutA and ibeA in the early stages of infection by extra-intestinal pathogenic *E. coli*. **Microbes and Infection**. v. 10, p. 432-438, 2008.
- CLARK, M.A.; HIRST, B.H.; JEPSON, M.A. M-cell surface beta1 integrin expression and invasin-mediated targeting of *Yersinia pseudotuberculosis* to mouse Peyer's patch M cells. **Infection and Immunology** , v. 66, P.1237-1243, 1998.
- COSTA, A.R.F. et al. Desenvolvimento de PCR multiplex para detecção e diferenciação de categorias de *Escherichia coli* diarreiogênicas. **Revista Pan-Amazônica de Saude**, v. 1, n.2, p.77-84, 2010.
- COSTA, C.A.R. **Avaliação da exposição do consumidor à *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.*, *Campylobacter spp.*, e *Escherichia coli* produtora de toxina shiga em produtos cárneos refrigerados comercializados no município de São Paulo**. (Tese- doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, SP, 112p., 2010.
- CROXEN, M.A. et al. Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v.26, n.4, p. 824-890, 2013.
- DINEV, I. **Bacterial diseases, *Escherichia coli* infections, 2014**. Disponível em : <http://www.thepoultrysite.com> . Acesso em: 15 de dezembro de 2015.
- DONNENBERG, M. S. et al. A plasmid-encoded type IV fimbrial gene of enteropathogenic *Escherichia coli* associated with localized adherence. **Molecular Microbiology**, v. 6, n. 22, p. 3427-3437, 1992.
- FERREIRA, A.J.P.; KNOBL, T. Colibacilose. In: BERCHIERI Jr., A.; MACARI, M.: **Doenças das Aves**. Campinas: FACTA. 2 ed., 2000.
- GRAAF, F.K.; MOOI, F.R. The fimbrial adhesines of *Escherichia coli* .**Advances in Microbial Physiology**, v. 28, p. 65-143, 1987.

- GRANUM, P. E.; BRYNESTAD, S. Bacterial toxins as food poisons. **The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins**, v. 2, p. 669-681, 1999.
- INSTITUTE FOR INTERNATIONAL COOPERATION IN ANIMAL BIOLOGICS. *E. Coli* enterohemorrágica : *Escherichia coli* Productora de Verocitotoxina (ECVT), *Escherichia coli* Productora de Toxina Shiga (STEC), *Escherichia coli* O157:H7. **Iowa State University College of Veterinary Medicine, 2010.**
- ITO, N.M.K. et al. **Diagnóstico diferencial das enfermidades bacterianas, fúngicas e parasitárias que acometem os frangos de corte.** Cascavel, PR. Coluna do saber, 160p., 2007.
- KENNY, B. et al. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. **Cell** , v.91, p.511-520, 1997.
- KRAUSE, G.; ZIMMERMANN, S.; BEUTIN, L. Investigation of domestic animals and pets as a reservoir for intimin- (eae) gene positive *Escherichia coli* types. **Veterinary Microbiology**, v. 106, n. 1-2, p. 87–95, 2005.
- MACARI, M. et al. **Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte.** 2ed. FUNEP\UNESP: Jaboticabal, 375p, 2002.
- MACHADO, L. S. et al. Pcr na detecção de gene *fel a* de *Escherichia coli* em frangos de corte condenados por aerossaculite pela inspeção sanitária federal. **Arquivo Instituto Biológico, São Paulo**, v. 80, n. 2, p. 145-149, 2013.
- MAINIL, J. *Escherichia coli* virulence factors. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 152, n. 1-2, p. 2–12, 2013.
- MC DANIEL, TK. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. **Proceedings of the National. Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, p. 1664-1668, 1995.
- MELKEBBEK, V.; GODDEERIS, B.M.; COX, E. ETEC vaccination in pigs. **Veterinary Immunology and Immunopathology** , V.152, P. 37– 42, 2013.
- MUZA-MOONS, M.M.; KOUTSOURIS, A.; HECHT, G. Disruption of cell polarity by enteropathogenic *Escherichia coli* enables basolateral membrane proteins to migrate apically and to potentiate physiological consequences. **Infection and Immunology.** , v. 71, p. 7069-7078, 2003.
- NAGY, B.; FEKETE, P.Z. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in veterinary medicine. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 295, p.443–454, 2005.
- PAL, A. et al. Shiga-toxin producing *Escherichia coli* from healthy cattle in a semi-urban community in Calcutta, India. **Indian Journal of Medical Research**, v. 110, p. 83, 1999.
- PANNUCH, M. et al. Quantification of enteropathogenic *Escherichia coli* from retail meats. **International Food Research Journal**, v. 21, n. 2, p. 547-551, 2014.

POURBAKHS, S. A. et al. Localization of the *in vivo* expression of P and F1 fimbriae in chickens experimentally inoculated with pathogenic *Escherichia coli*. **Microbiology Pathogenesis**, v. 22, p. 331-341, 1997.

ROTHBAUMET, Robert J. et al. An ultrastructural study of enteropathogenic *Escherichia coli* infection in human infants. **Ultrastructural Pathology**, v. 4, n. 4, p. 291-304, 1983.

SAMPAIO, I. B. M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootécnica, 2002. 265 p.

TANG, Y. et al. Enterotoxigenic *Escherichia coli* infection induces intestinal epithelial cell autophagy. **Veterinary Microbiology**, v.171, p.160–164, 2014.

TORNIEPORTH, N. G. et al. Differentiation of pathogenic *Escherichia coli* strains in Brazilian children by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 5, p. 1371-1374, 1995.

VENKATESAN, MALABI M.; BUYSSE, JERRY M.; KOPECKO, DENNIS J. Use of *Shigella flexneri* ipaC and ipaH gene sequences for the general identification of *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 27, n. 12, p. 2687-2691, 1989.

VIEIRA, M. Ilhas de patogenicidade. **O Mundo da Saúde**, v. 33, n. 4, p. 406–414, 2009.

WALES, A. D.; WOODWARD, M. J.; PEARSON, G. R. Attaching-effacing bacteria in animals. **Journal of Comparative Pathology**, v. 132, n. 1, p. 1–26, 2005.

YU, J.; KAPER, JAMES B. Cloning and characterization of the eae gene of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7. **Molecular Microbiology**, v. 6, n. 3, p. 411-417, 1992.

CAPÍTULO III

Fatores de virulência de *Escherichia coli* isoladas de aves liberadas para consumo sob SIF do Tocantins.

Fatores de virulência de *Escherichia coli* isoladas de aves liberadas para consumo sob SIF do Tocantins.

Virulence factors of *Escherichia coli* isolated from poultry released for consumption in the Tocantins SIF.

Resumo: Doenças causadas por *Escherichia coli* geram importantes perdas econômicas na produção avícola industrial. No Tocantins há poucos estudos que visam a detecção de genes de virulência deste patógeno. O objetivo do presente estudo foi realizar a detecção de genes de virulência de estipes de *Escherichia coli* em aves destinadas ao consumo através da técnica de PCR em 67 cepas isoladas de vísceras e do sistema respiratório superior de aves abatidas sob inspeção do Estado do Tocantins. Na análise dos genes de virulência, o gene *elt* foi o que esteve em maior presença nas amostras 16% (11/67) seguido de *bfpA* 10% (7/67), *stx1* 9% (6/67), *est* 7% (5/67) e *eae* 4% (3/67). Dos quais 18% (12/67) foram detectados em *E. coli* isolados do sistema respiratório superior, 16% (11/67) isolados de coração e 13% (9/67) de fígado. Em relação as unidades federativas de origem das aves, Goiás foi o Estado que obteve maior número de positivos 27% (18/67), seguido de São Paulo 10% (7/67), Tocantins 9% (6/67) e Distrito Federal 1% (1/67). O desenvolvimento de diagnóstico que correlacionem o agente infeccioso na ausência de lesões macroscópicas é fundamental para que os patógenos sejam corretamente analisados para tomadas de decisões.

Palavras-chave: Caracterização. Diagnóstico. PCR.

Abstract: Diseases caused by *Escherichia coli* generate serious economic losses in industrial poultry production. There are few studies regarding the virulence genes detection of this pathogen in Tocantins. The aim of study was to perform virulence genes detection of *Escherichia coli* strains in poultry for consumption through the PCR technique in 67 strains isolated from viscera and upper respiratory system of birds slaughtered under Tocantins state inspection. In the analysis of virulence genes, gene *elt* represented greater presence in the samples 16% (11/67) followed by *bfpA* 10% (7/67), *stx1* 9% (6/67), *est* 7 % (5/67) and *eae* 4% (3/67). From these samples 18% (12/67) were detected of air bags, 16% (11/67) heart isolates and 13% (9/67) of liver. In regarding federal units of bird origins, the State of Goiás obtained the greater number of positives 27% (18/67), followed by São Paulo 10% (7/67), Tocantins 9% (6/67) and Federal district 1% (1/67). Diagnostic development that correlate the infectious agent in the absence of macroscopic lesions is fundamental to properly analyze of pathogens and consequent taken decisions.

Keywords: Characterization. Diagnosis. PCR.

1. INTRODUÇÃO

As bactérias patogênicas se diferenciam uma das outras pelo fato de expressarem genes que codificam fatores de virulência diferentes, estes fatores de virulência são os responsáveis pela colonização das mesmas, assim como alterar fisiologicamente a homeostase do hospedeiro. Para *Escherichia coli* (*E. coli*), destacam-se: adesinas (possibilita a aderência no tecido do hospedeiro), enterotoxinas, genes *eae* e *bfpA*, *ipah*, toxina shiga (VIEIRA, 2009).

Apesar da existência de cepas não patogênicas em aves, uma grande parte das mesmas é capaz de desencadear sérios danos e conseqüentemente prejuízos no setor avícola. Os genes relacionados a patogenicidade destas cepas encontra-se nos plasmídios ou no cromossomo da célula bacteriana (BARROS, et. al. 2012).

Estudos têm sido desenvolvidos no intuito de compreender os mecanismos utilizados pela *E. coli*, sendo um deles os fatores de virulência da mesma. Tornando-se desse modo necessário para que haja medidas que minimize o impacto econômico que esta bactéria desencadeia (NAKAZATO et al., 2009).

Estes conhecimentos fazem-se necessários para que sejam detectadas as possíveis fontes de contaminação uma vez que animais infectados disseminam patógenos a seus subprodutos (VICENTE et al. 2008).

A presença de *E. coli* em vísceras sem lesão, liberadas para consumo colocam em questão os critérios de condenação adotados nas indústrias avícolas, assim como a necessidade de maior aperfeiçoamento das técnicas de detecção rotineiramente utilizadas (SILVA, et al. 2012).

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi a detecção de genes de virulência em *E. coli* isoladas em vísceras de aves abatidas e liberadas para consumo através da caracterização molecular das mesmas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram avaliadas 67 estirpes de *Escherichia coli* (25 isoladas do sistema respiratório superior, 23 de coração e 19 de fígado) pertencentes à coleção bacteriológica do Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Escola de Medicina veterinária e Zootecnia da Universidade federal do Tocantins. Estas bactérias foram isoladas de aves provenientes dos estados de Goiás, Tocantins, São Paulo e Distrito Federal (SIF-TO), liberadas para consumo pelo serviço de inspeção federal do Estado do Tocantins por não apresentarem lesões sugestivas de colibacilose, aerossaculite, pericardite e perihepatite entre agosto de 2010 e junho de 2012.

Cada amostra de *E. coli* foi individualmente repicada, como auxílio de uma alça de platina em Ágar MacConkey, e incubadas a 37 °C por um período de 24 horas.

Após crescimento em ágar MacConkey, cada amostra foi repicada em tubo de ensaio contendo ágar TSA (Himedia®), e incubada a 37 °C por 24 h (COSTA et al., 2010).

Para a extração do DNA foi utilizado o protocolo de termo extração proposto por Costa et al. (2010). Onde o crescimento bacteriano obtido do ágar TSA foi transferido com auxílio de *swabs* para microtubos com 400 µL de água destilada ultra pura e submetidas a 100 °C por 10 min em banho seco, com choque térmico seguido de descongelamento e centrifugadas a 12.000 G por 10 minutos.

Para a PCR foram utilizados dois multiplex preparados em 25 µL do *mix* para amplificação do DNA, conforme Costa, 2010: 5X solução tampão (Buffer IVB PHneutria®) ; dNTPs (10 mM); *primer* F (20 pMol/µL) ; *primer* R (20 pMol/µL), os oligonucleotídeos utilizados estão descritos no quadro 1; *Taq* polimerase DNA (1 UNID); DNA teste (50 nM a 200 nM).

Foram utilizadas as seguintes cepas de referência como controles positivos: *Escherichia coli* H104:O7, *Escherichia coli* 2348/69, *Escherichia coli* CDC EDL 933, O157:H7, *Escherichia coli* EDL 1284. Para os controles negativos fez apenas a adição de água estéril ultrapura ao mix da reação.

Fatores de virulência (genes)	Multiplex	Iniciador	Sequência (5' – 3')	Produto (pb)/T° de anelamento	Referência
Toxina termoestável I (est)	Multiplex 2	ST-1 /ST-2	CTGTATTGTCTTTTTCACCT	182/56 °C	Tornieporth (1995)
			GCACCCGGTACAAGCAGGAT		
Toxina termolábil (elt)	Multiplex 1	LT-1/LT-2	GCGACAAATTATACCGTGCT	707/50 °C	Tornieporth (1995)
			CCGAATTCTGTTATATATGT		
Fímbria BFP (bfpA)	Multiplex 1	EP-1/EP-2	CAATGGTGCTTGCGCTTGCT	329/ 50 °C	Donnenberg (1992)
			GCCGCTTTATCCAACCTGGT		
Intimina (eae)	Multiplex 1	EAE-1/EAE-2	AAACAGGTGAAACTGTTGCC	454/ 50 °C	Yu (1992)
			CTCTGCAGATTAACCTCTGC		
Antígeno de invasão (ipaH)	Multiplex 2	EI-1/EI-2	GCTGGAAAACTCAGTGCCT	424/ 56 °C	Venkatesan (1989)
			CCAGTCCGTAAATTCATTCT		
Toxina Shiga1 (stx1)	Multiplex 2	STX-1A/STX-1B	CAACACTGGATGATCTCAG	349/ 56 °C	Pal (1999)
			CCCCCTCAACTGCTAATA		
Toxina Shiga2 (stx2)	Multiplex 2	STX-2A/STX-2B	ATCAGTCGTCACTCACTGGT	110/ 56 °C	Pal (1999)
			CTGCTGTACAGTGACAAA		

Quadro 1. Oligonucleotídeos utilizados neste trabalho e o tamanho dos amplicons

No multiplex 1 foram utilizados os iniciadores para genes *bfpA*, *eae* e *elt*. As amostras foram levadas ao termociclador, programado com uma sequência de 35 ciclos na seguinte sequência de temperaturas e tempos: 94 °C por 30 segundos, 55 °C por 30 segundos e 50 °C de anelamento por 60 segundos. Após o último ciclo a reação foi finalizada com um período extra de extensão de 5 minutos a 72 °C, permanecendo estocada a 4 °C no final da reação.

Para o multiplex 2, foram utilizados os genes *est*, *stx1*, *sxt2* e *ipah* em 35 ciclos na seguinte sequência de temperaturas e tempos: 94 °C por 30 segundos, 55 °C por 30 segundos 56 °C de anelamento por 60 segundos. Após o último ciclo a reação foi finalizada com um período extra de extensão de 5 minutos a 72 °C, permanecendo estocada a 4 °C no final da reação.

Os produtos de DNA amplificados foram submetidos à eletroforese horizontal, em gel de agarose 1,5%, contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídeo, em tampão de corrida TBE (40mM Tris-acetato, 2mM EDTA pH 8,0). Um volume de 10 µL de cada amplicon, acrescido de 2 µL de tampão de amostra (glicerol 40%, azul de bromofenol 0,02%) aplicado no gel.

A corrida eletroforética foi realizada a 110V por 50 minutos e, para a determinação do tamanho dos produtos amplificados, foi utilizado um marcador de peso molecular de 100 pares de base. Os produtos da PCR foram visualizados em transluminador de luz ultravioleta e foto documentado.

Para avaliação dos resultados de identificação dos agentes envolvidos e a associação entre eles foram utilizados os testes de frequência absoluta e relativa (SAMPAIO, 2002).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 67 amostras analisadas 48% (32/67) foram positivas para pelo menos um dos fatores de virulência.

Ao verificar os fatores de virulência isolados em relação ao tipo de amostra clínica observou-se que: 18% (12/67) de pelo menos um fator de virulência pesquisado foi isolado do sistema respiratório superior, 16% (11/67) foi isolado do coração e 13% (9/67) do fígado (Tabela 1).

Os resultados obtidos para fígado neste trabalho corroboram com Silva et al. (2011), onde ao avaliarem a presença de *E. coli* patogênica em vísceras de aves oriundas de abatedouro no Recôncavo baiano, obtiveram um número de 60% (18/30) positivos para vísceras inalteradas macroscopicamente, provavelmente devido a circulação porta-hepático que recebe sangue diretamente das microvilosidades intestinais. .

Os mesmos autores afirmam ainda que apesar da alta taxa de confirmação de *E. coli* a confirmação genotípica da presença de gene de virulência foi o fator determinante no resultado.

A ausência de alterações macroscópicas nestas vísceras pode ser justificada pela presença de atividades bactericidas presente em vísceras de frangos, devido a existência de proteínas específicas (peptídeos de baixo peso molecular <30Kda) em seus tecidos capaz de reduzir a carga microbiana principalmente contra o gênero *E. coli* (SUNDARAMOORPHY & SARAVANAN, 2010).

Tabela 1. Percentual de presença de genes de virulência de *E. coli* presentes em vísceras e sistema respiratório superior de aves sem lesões abatidas liberadas para consumo sob Inspeção no Estado do Tocantins entre agosto de 2010 a junho de 2012.

Genes	Coração		Fígado		SRS*	
	POS ¹ (%) ²	NEG ¹ (%) ²	POS ¹ (%) ²	NEG ¹ (%) ²	POS ¹ (%) ²	NEG ¹ (%) ²
ELT	4 (6%)	11 (16%)	2 (3%)	10 (15%)	5 (7%)	9 (13%)
BFPA	2 (3%)	19 (28%)	3 (4%)	10 (15%)	2 (3%)	16 (24%)
STX1		20 (29%)	2 (3%)	13 (19%)	4 (6%)	16 (24%)
EST	3 (4%)	8 (11%)	2 (3%)	5 (7%)		12 (18%)
EAE	2 (3%)	17(25%)		13 (19%)	1 (1%)	19 (28%)
Total³	11 (16%)	75	9 (13%)	51	12 (18%)	72

*SRS = Sistema Respiratório superior; 1= Número de cepas positivas e negativas provenientes de vísceras; 2= Porcentagem calculada em relação às frequências totais analisadas; 3= Porcentagem calculada em relação ao total de cepas analisadas.

Quando observados os genes de virulência isoladamente, observou-se que o gene *elt* (Anexo 1) obteve a maior taxa de positivos com 16% (11/67), subdivididos em 7% (5/67) para sistema respiratório superior, seguido por 6% (4/67) para coração e 3% (2/67) para fígado (Tabela 1).

O gene *bfpa* (Anexo 1) obteve a segunda maior taxa de positivos com 10% (7/67) subdivididos em 4% (3/67) do fígado, 3% (2/67) provenientes do coração e 3% (2/67) do sistema respiratório superior (Tabela 1).

O gene *stx1* (Anexo 2) obteve a terceira maior taxa de positivos com 9% (6/67), sendo 6% (4/67) oriundas do sistema respiratório superior, 3% (2/67) do fígado e nenhuma amostra positiva oriunda do coração (Tabela 1).

O gene *est* (Anexo 3) obteve a quarta maior taxa de positivos com 7% (5/67), das quais 4% (3/67) foram provenientes do coração, 3% (2/67) do fígado e nenhuma amostra positiva no sistema respiratório superior (Tabela 1).

O gene *eae* (Anexo 1) obteve a quinta maior taxa de positivos 4% (3/67), das quais 3% (2/67) foram provenientes do coração, 1% (1/67) do sistema respiratório superior e nenhuma amostra positiva oriunda do fígado (Tabela 1).

O resultado obtido para o gene *eae* esta de comum acordo com o encontrado por Bagheriet al. (2014), estes autores ao analisarem 102 vísceras de aves e constataram a presença do gene *eae* em apenas sete amostras. Embora o número seja relativamente baixo, os autores afirmam que aves pode ser um potencial reservatório da categoria EPEC a qual o gene *eae* faz parte.

Silva et al. (2012) sugere que a condenação baseada na presença de lesões visuais nem sempre são eficazes devido a constatação da presença de *E. coli* em vísceras de frangos sem lesões macroscópicas.

Uma possível fonte de contaminação de carcaças de frangos durante abate pode ser oriunda da água utilizada para lavagem das mesmas (RISSATO et al., 2012). Pode-se sugerir que os resultados obtidos foram provenientes de contaminação durante as distintas fases do abate.

Podemos também observar que mais de um gene foi encontrado simultaneamente em relação à amostra clínica (Tabela 2), foi observada uma maior associação do gene *elt* com o gene *est* simultaneamente em 22% (15/67) das amostras, caracterizando desta forma a presença de *E. coli* enterotoxigênica (ETEC)

,com maior número no sistema respiratório superior 9% (6/67), seguido do fígado 6% (4/67) e coração 7% (5/67) (Tabela 2).

Tabela 2. Distribuição de genes de virulência de *E. coli* e associações em fígado, coração e sistema respiratório superior de aves liberadas para consumo sob Inspeção Sanitária no Estado do Tocantins entre agosto de 2010 a junho de 2012.

Gene	Amostra clínica			Total
	Coração POS	Fígado POS	SRS POS	
<i>Elt</i>	4	2	5	11
<i>elt+eae</i>	0	0	0	0
<i>elt+bfpa</i>	0	0	0	0
<i>elt+bfpa+est</i>	1	0	0	1
<i>elt+eae+est</i>	1	0	0	1
<i>elt+est</i>	5	4	6	15
<i>elt+stx1</i>	0	0	0	0
Total <i>elt</i>	11	6	11	28
<i>Bfpa</i>	2	3	2	7
<i>bfpa+eae</i>	0	0	0	0
<i>bfpa+elt</i>	0	0	0	0
<i>bfpa+elt+est</i>	1	0	0	1
<i>bfpa+eae+est</i>	0	0	0	0
<i>bfpa+est</i>	4	2	2	8
<i>bfpa+stx1</i>	0	0	0	0
Total <i>bfpa</i>	7	5	4	16
<i>stx1</i>	0	2	4	6
Total <i>stx1</i>	0	2	4	6
<i>Est</i>	3	2	0	5
<i>est+eae</i>	0	2	0	2
<i>est+bfpa</i>	4	2	2	8
<i>est+eae+bfpa</i>	0	0	0	0
<i>est+eae+elt</i>	1	0	0	1
<i>est+bfpa+elt</i>	1	0	0	1
<i>est+elt</i>	5	4	6	15
<i>est+stx1</i>	0	0	0	0
Total <i>est</i>	14	10	8	32
<i>Eae</i>	2	0	1	3
<i>eae +bfpa</i>	0	0	0	0
<i>eae+ bfpa+est</i>	0	0	0	0
<i>eae+elt+est</i>	1	0	0	1
<i>eae +elt</i>	0	0	0	0
<i>eae +est</i>	0	2	0	2
Total <i>eae</i>	3	2	1	6

Houve associação do gene *bfpa* (EPEC) com o gene *est* (ETEC) 12% (8/67), sendo 6% (4/67) no coração, seguidos pelo fígado com 3% (2/67) e sistema respiratório superior com 3% (2/67) (Tabela 2).

O gene *stx1*(EHEC) não esteve associado à nenhum outro gene e apareceu em 9% (6/67) das amostras (Tabela 2)

O gene *eae* (EPEC) esteve associado com o gene *est* (ETEC) em 3% (2/67) das amostras, ambas de fígado. O *eae* com o *elt* não esteve associado (Tabela 2). Não foi observada também a presença de EPEC típica, com presença simultaneamente dos genes *bfpa* e *eae*.

Outra observação realizada foi a distribuição dos achados em relação às unidades federativas (Tabela 3 e 4).

Em análise para cada unidade federativa, observou-se um maior número de positivos no Estado de Goiás com 27% (18/67), seguido por São Paulo com 10% (7/67), Tocantins com 9% (6/67) e Distrito Federal com 1% (1/67) (Tabela 3).

Tabela 3. Percentual de presença de genes de virulência de *E. coli* presentes em vísceras e sistema respiratório superior de aves sem lesões abatidas sob inspeção no Estado do Tocantins entre agosto de 2010 a junho de 2012 e seus respectivos Estados de origem.

Genes	DF		GO		SP		TO	
	POS	NEG	POS	NEG	POS	NEG	POS	NEG
ELT		3(4%)	7 (10%)	26(38%)	2 (3%)	7(10%)	2 (3%)	5(7%)
BFPA		3(4%)	4 (6%)	33(49%)	2 (3%)	6(9%)	1 (1%)	6(9%)
EST		1(1%)	1 (1%)	26(39%)	2 (3%)	6(9%)	2 (3%)	4(6%)
STX1	1 (1%)	3(4%)	4(6%)	40(60%)		12(17%)	1 (1%)	6(9%)
EAE		4(6%)	2 (3%)	40(60%)	1 (1%)	11(16%)		6(9%)
Total³	1 (1%)	14	18 (27%)	165	7(10%)	42	6 (9%)	27

*SRS = Sistema Respiratório superior; 1= Número de cepas positivas e negativas provenientes de vísceras; 2= Porcentagem calculada em relação às frequências totais analisadas; 3= Porcentagem calculada em relação ao total de cepas analisadas.

Quando analisado o gene *elt*, Goiás foi a unidade federativa com maior taxa de positivos 10% (7/67), seguido por São Paulo 3% (2/67), Tocantins 3% (2/67) e nenhuma amostra positiva oriunda de Distrito Federal (Tabela 3).

As ETEC's produtoras de enterotoxinas não possuem capacidade de invadir o tecido do hospedeiro originariamente, porém sua enterotoxina é absorvida pelas células epiteliais. A Lt estimula a Adenilciclase, resultando na conversão do ATP em AMP-C. O último induz a excreção de Cl^- e inibe a absorção de Na^+ causando grandes perdas de fluidos (MOREIRA, 2007). O que justifica o alto índice de genes produtores de enterotoxinas encontrados neste trabalho uma vez que as mesmas possuem alta afinidade com tecidos epitelial.

Ao observar o gene *bfpA* Goiás foi o Estado com maior taxa de positivos 6% (4/67), seguido por São Paulo 3% (2/67), Tocantins com 1% (1/67) e nenhuma amostra positiva oriunda do Distrito Federal (Tabela 3).

A ocorrência de contaminação por *E. coli* da categoria EPEC tem sido relatada no processo de evisceração, principalmente relacionada com a ruptura do intestino que é considerado um ponto crítico de controle no abate de aves e também pode ser atribuída a contaminação cruzada durante a manipulação dentro das indústrias de abate (ALONSO et al., 2012).

Já para aves sem lesão os resultados obtidos para o gene *stx1* quando analisados os Estados de origem, Goiás foi o Estado que obteve maior número de positivos com 6% (4/67) amostras, seguido por Distrito Federal e Tocantins, ambos com 1% (1/67) de positivos. Não foi encontrada nenhuma amostra positiva oriunda de São Paulo para este gene (Tabela 3).

Embora Chomarin et al. (2005) tenham isolado o sorogrupo O157 em subprodutos de aves não detectaram a presença de *stx1* e *stx2*. E embora seja raro encontrar este sorotipo em aves, o fato de ter tido a presença da mesma neste trabalho pode ser justificada pela possibilidade de contaminação cruzada com outros animais ou subprodutos (CHINEN et al., 2009).

Esta toxina não tem efeito na secreção de aniões, atua diminuindo a absorção basal ativa de NaCl , que por sua vez sugere que a indução de acúmulo de fluido seja devido à morte seletiva das células absorptivas das vilosidades, diminuindo a absorção favorecendo assim, a secreção de líquidos (VETTORATO, 2008).

De acordo com Donnenberg e Whittan (2001) os receptores para este gene são encontrados em células específicas presentes no intestino dos hospedeiros,

sendo encontrado em tecidos endoteliais em casos de alta taxa de infecção pela mesma. O que justifica o baixo número deste gene neste trabalho uma vez que os tecidos em questão possuem histologia diferente do intestino.

Ao observar o gene *est*, São Paulo foi o Estado com maior taxa de positivos com 3% (2/67), seguido por Tocantins com 3% (2/67), Goiás com 1% (1/67) e nenhuma amostra positiva oriunda de Distrito Federal (Tabela 3).

Ao avaliarem 152 isolados de *E. coli* intestinais e extra intestinais em suínos, Girardini et al. (2012) constataram que 19% (29/152) amostras apresentaram enterotoxinas características de ETEC. O que corrobora com os resultados para esta categoria encontradas neste trabalho.

Os resultados obtidos também corroboram com Ahmadiet al. (2009), que de 75 amostras analisadas os mesmos encontraram uma taxa de 36% de positivos para o gene *elt* e nenhuma amostra positiva para o gene *est*.

Para o gene *eae*, Goiás foi o Estado com maior número de positivos 3% (2/67), seguido por São Paulo com 1% (1/67) e nenhuma amostra positiva oriunda de Distrito Federal e Tocantins (Tabela 3).

O mecanismo central da infecção causada por EPEC é a formação de lesões intestinais denominadas *Attaching and effacing* (A/E), causadas pela habilidade da bactéria aderir intimamente os enterócitos, destruir as microvilosidades e induzir alterações no citoesqueleto incluindo o acúmulo de actina polimerizada e a formação de estruturas em pedestal nos locais onde a bactéria adere (FIALHO, 2008). O que justifica o baixo índice encontrado, uma vez que a afinidade pela intimina é específica para enterócitos e os tecidos analisados possuem estruturas celulares distintas.

Foi possível identificar que mais de um gene foi encontrado simultaneamente em relação a unidade federativa (Tabela 4), foi observada a presença de 22% (15/67) amostras com os genes *elt/est* (ETEC) simultaneamente, com maior número 15% (10/67) para Goiás, seguido por São Paulo com 4% (3/67), Distrito Federal com 3% (2/67) e nenhuma associação no Tocantins (Tabela 4).

Houve associação do gene *bfpa* (EPEC) com o gene *est* (ETEC) em Goiás com 9% (6/67), seguido por Distrito Federal e São Paulo ambos com taxa de 1% (1/67), e nenhum *bfpa* associado com *est* no Tocantins (Tabela 4).

O gene *eae* (EPEC) esteve associado com o gene *est* (ETEC) em 3% (2/67) em Goiás. O mesmo apareceu associado juntamente com os genes *elt* e *est* em 1% (1/67) em Goiás (Tabela 4).

O gene *stx1* não esteve associado a nenhum outro gene, apareceu isolado em 9% (6/67) das amostras. (Tabela 4).

Tabela 4. Distribuição de genes de virulência de *E. coli* e associações de acordo com as Unidades Federativas de origem de aves liberadas para consumo sob Inspeção Sanitária no Estado do Tocantins entre agosto de 2010 a junho de 2012.

Gene	Unidade Federativa				Total
	DF POS	GO POS	SP POS	TO POS	
<i>Elt</i>	0	7	2	2	11
<i>elt+eae</i>	0	0	0	0	0
<i>elt+bfpa</i>	0	0	0	0	0
<i>elt+bfpa+est</i>	0	1	0	0	1
<i>elt+eae+est</i>	0	1	0	0	1
<i>elt+est</i>	2	10	3	0	15
<i>elt+stx1</i>	0	0	0	0	0
Total <i>elt</i>	2	19	5	2	28
<i>Bfpa</i>	0	4	2	1	7
<i>bfpa+eae</i>	0	0	0	0	0
<i>bfpa+elt</i>	0	0	0	0	0
<i>bfpa+elt+est</i>	0	1	0	0	1
<i>bfpa+eae+est</i>	0	0	0	0	0
<i>bfpa+est</i>	1	6	1	0	8
<i>bfpa+stx1</i>	0	0	0	0	0
Total <i>bfpa</i>	1	11	3	1	16
<i>stx1</i>	1	4	0	1	6
Total <i>stx1</i>	1	4	0	1	6
<i>Est</i>	1	0	2	2	5
<i>est+eae</i>	0	2	0	0	2
<i>est+bfpa</i>	1	6	1	0	8
<i>est+eae+bfpa</i>	0	0	0	0	0
<i>est+eae+elt</i>	0	1	0	0	1
<i>est+bfpa+elt</i>	0	0	0	0	0
<i>est+elt</i>	2	10	3	0	15
<i>est+stx1</i>	0	0	0	0	0
Total <i>est</i>	4	19	6	2	31
<i>Eae</i>	0	2	1	0	3
<i>eae +bfpa</i>	0	0	0	0	0
<i>eae+ bfpa+est</i>	0	0	0	0	0
<i>eae+elt+est</i>	0	1	0	0	1
<i>eae +elt</i>	0	0	0	0	0
<i>eae +est</i>	0	2	0	0	2
Total <i>eae</i>	0	5	1	0	6

4. CONCLUSÃO

As lesões em aves podem ser visualizadas macroscopicamente no abate, permitindo o julgamento e destino das carcaças com base na legislação brasileira. No entanto, os resultados obtidos sugerem que a visualização não é um critério com exatidão para o processo de julgamento e destino correto das carcaças. A detecção de *E. coli* patogênica em miúdos representa uma fonte importante de agente etiológico de doenças alimentares e riscos à saúde do consumidor final.

Portanto, a adoção de diagnósticos moleculares na indústria de abate como suporte para condenação de carcaças e rastreamento de possíveis fontes de disseminação de *E. coli* podem resultar em melhorias no abate e consequentemente proporcionar alimentos com maior segurança.

REFERÊNCIAS

- AHAMADIET, M. et al. Detection of LT and ST genes in the *Escherichia coli* isolated from the dogs, sheep and poultry. **Comparative Clinical Pathology**, v.18, p.407–412, 2009.
- ALONSO, M. Z. et al. Enteropathogenic (EPEC) and Shigatoxigenic *Escherichia coli* (STEC) in broiler chickens and derived products at different retail stores. **Food Control**, v. 23, n. 2, p. 351–355, 2012.
- BARROS, M.R. et al. Resistência antimicrobiana e periplasmial de *Escherichia coli* isolada de frangos de corte e poedeiras comerciais no Estado de Pernambuco. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, n.32, v.5, p.405-41, 2012.
- BAGHERIET, M.; GHANBARPOUR, R.; ALIZADE, H. Shiga toxin and beta-lactamases genes in *Escherichia coli* phylotypes isolated from carcasses of broiler chickens slaughtered in Iran. **International Journal of Food Microbiology**, v.177, p.16–20, 2014.
- CHINEN, I. et al. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 in beef and chicken burgers, and chicken carcasses in Buenos Aires, Argentina. **International Journal of Food Microbiology**, v.132, p.167-171, 2009.
- CHOMARIN, C. et al. Characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from food in KhonKaen, Thailand. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v.36, p.931-939, 2005.
- COSTA, A.R.F. et al. Desenvolvimento de PCR multiplex para detecção e diferenciação de categorias de *Escherichia coli* diarreogênicas. **Revista Pan-Amazônica de Saude**, v. 1, n.2, p.77-84, 2010.
- DONNENBERG, M. S. et al. A plasmid-encoded type IV fimbrial gene of enteropathogenic *Escherichia coli* associated with localized adherence. **Molecular Microbiology**, v. 6, n. 22, p. 3427-3437, 1992.
- DONNENBERG, M. S. e WHITTAM, T. S. Pathogenesis and evolution of virulence in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Journal of Clinical Investigation**, v.107, n.5, p.539-548, 2001.
- FIALHO, O. B. **Identificação de estirpes de *Escherichia coli* diarreogênicas por pcr-multiplex**. Dissertação De Mestrado. Universidade Federal do Pará. p. 16-17, 2008.
- GIRARDINI, L.K. et al. Phylogenetic and pathotype analysis of *Escherichia coli* swine isolates from Southern Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.32,n.5, p.374-378, 2012.
- MOREIRA, H. de O. M. **Isolamento de *Escherichia Coli* ácido-resistentes em fezes de Bovinos Submetidos à Dieta de Volumoso e Concentrado**. Programa

de Pós Graduação em Nutrição Humana da Universidade de Brasília, Jul, 2007.[Orientador: Prof^aDr^a Simone Perecmanis., 60f, 2007.

NAKAZATO, G. et al. Virulence factors of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.29, n. 7, p. 479-486, 2009.

PAL, A. et al. Shiga-toxin producing *Escherichia coli* from healthy cattle in a semi-urban community in Calcutta, India. **Indian Journal of Medical Research**, v. 110, p. 83, 1999.

RISSATO, D.P. et al. Detecção de *Escherichia coli* em água de lavagem de carcaças de frango pelo método de reação em cadeia da polimerase (pcr). **SaBios: Revista Saúde e Biologia**, v.7, n.3, p.1-6, set.-dez., 2012.

SAMPAIO, I. B. M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootécnica, 2002. 265 p.

SILVA , I.M.M. et al. Caracterização genotípica dos isolados de *Escherichia coli* provenientes de frangos de corte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.63, n.2, p.333-339, 2011.

SILVA, I.M.M. et al. Presença de *Escherichia coli* em fígados de frangos provenientes de matadouros avícolas. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.13, n.3, p.694-700, 2012.

SUNDARAMOORTHY, M.; SARAVANAN, T.S. Antibacterial effects of goat and chickens hearts tissues against human pathogenic bacteria. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 48, n. 4, p. 407-414, 2010.

TORNIEPORTH, N. G. et al. Differentiation of pathogenic *Escherichia coli* strains in Brazilian children by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 5, p. 1371-1374, 1995.

VENKATESAN, MALABI M.; BUYSSE, JERRY M.; KOPECKO, DENNIS J. Use of Shigella flexneri ipaC and ipaH gene sequences for the general identification of Shigella spp. and enteroinvasive *Escherichia coli*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 27, n. 12, p. 2687-2691, 1989.

VETTORATO, P. M. **Estudo da Frequência e Caracterização Genotípica e Fenotípica de Amostra de *Escherichia Coli* Produtoras da Toxina Shiga (STEC) Isoladas de Ovinos no Estado de São Paulo**. Instituto de Ciências Biomédicas Da Universidade de São Paulo, 2008.

VICENTE, H.I.G. et al. Isolamento de cepas de *Escherichia coli* shigatoxigênicas sorogrupos o157 e o111 por separação imunomagnética após detecção por pcr (nota de pesquisa). **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 3, p. 753-758, jul./set. 2008.

VIEIRA, M. Ilhas de patogenicidade. **O Mundo da Saúde**, v. 33, n. 4, p. 406–414, 2009.

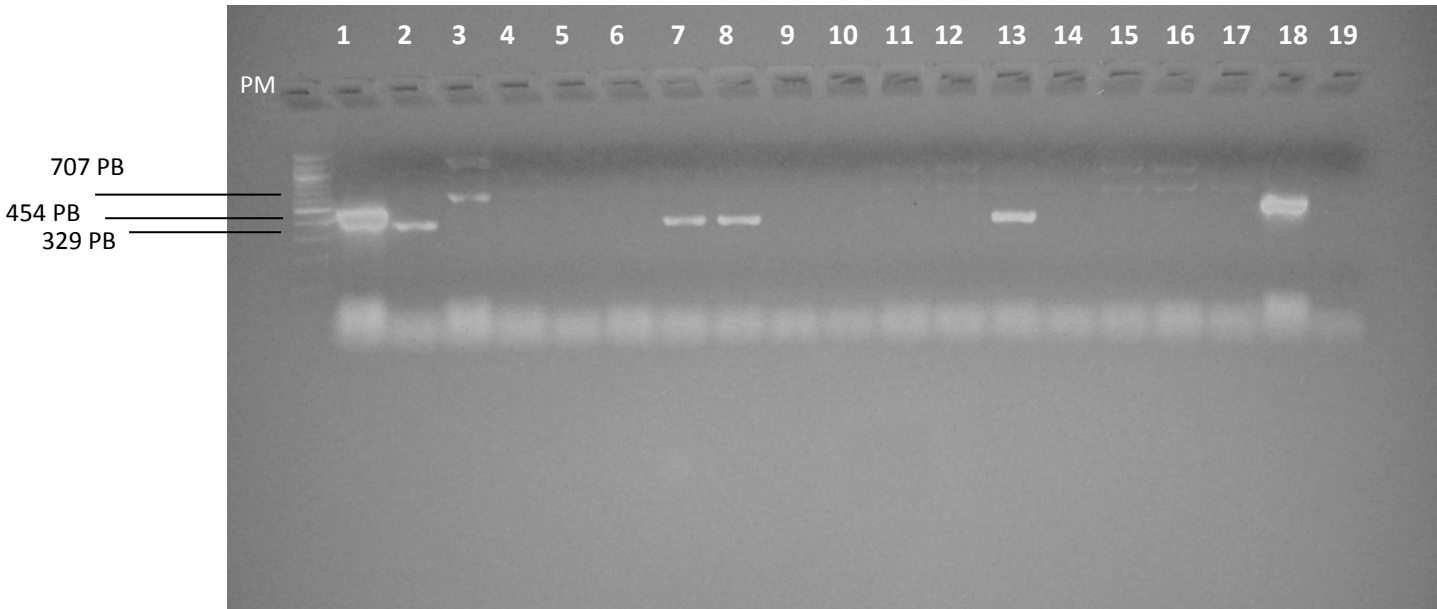
YU, J.; KAPER, JAMES B. Cloning and characterization of the eae gene of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7. **Molecular Microbiology**, v. 6, n. 3, p. 411-417, 1992.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com os resultados encontrados podemos verificar uma possível mudança de patotipos atuantes na colibacilose aviária, que sugere a necessidade de novos estudos com a detecção de diferentes genes de virulência de outros fatores de patogenicidade relacionados a outros patotipos não enterotoxigênicos envolvidos com a afecção. Assim, com um diagnóstico mais preciso será possível estabelecer novas metodologias profiláticas e terapêuticas diferenciadas na avicultura.

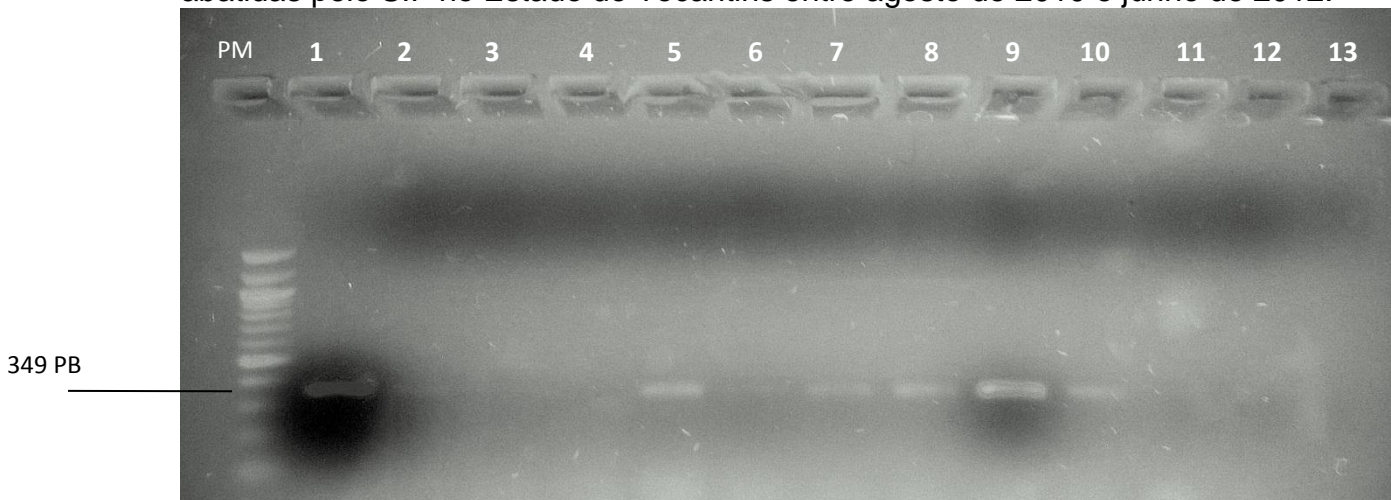
ANEXOS

Figura 1. Perfil eletroforético em gel de agarose 1,5% dos fragmentos amplificados em reações de PCR para detecção dos genes *bfpa*, *eae* e *elt* isolados de *E. coli* em aves abatidas pelo SIF no Estado do Tocantins entre agosto de 2010 e junho de 2012.



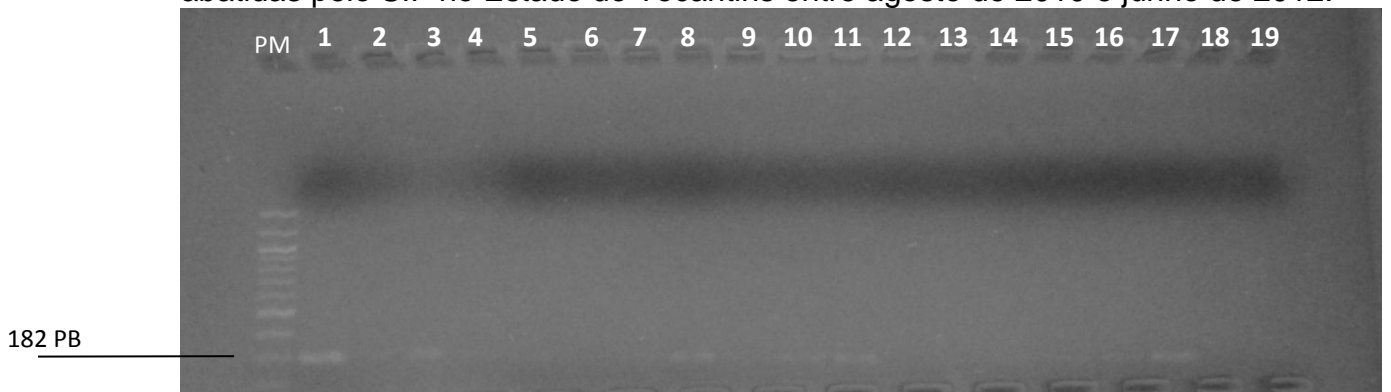
Gel corado com brometo de etídio e visualizado em transluminador com luz ultravioleta. Canaletas: PM- Padrão molecular 1 Kb DNA Ladder; Canaleta 1: controle positivo gene *eae* (EPEC 2348/69); Canaleta 2 : controle positivo para gene *bfpa* (EPEC 2348/69); Canaleta 3 controle positivo gene *elt* (ETEC H104 O7); Canaletas 4, 5 e 6 amostras de *E. coli* negativas; Canaletas 7 e 8: amostras positivas para o gene *bfpa*; Canaletas 9, 10,11,12 amostras negativas; Canaleta 13: amostra positiva para gene *bfpa*; Canaleta 14: amostra negativa; Canaletas 15 e 16: amostras positivas para gene *elt*; Canaleta 17: amostra negativa; Canaleta 18: amostra positiva para gene *eae*; Canaleta 19 controle negativo.

Figura 2. Perfil eletroforético em gel de agarose 1,5% dos fragmentos amplificados em reações de PCR para detecção do gene *stx1* isolados de *E. coli* em aves abatidas pelo SIF no Estado do Tocantins entre agosto de 2010 e junho de 2012.



Gel corado com brometo de etídio e visualizado em transluminador com luz ultravioleta. Canaletas: PM- Padrão molecular 1 Kb DNA Ladder; Canaleta 1: controle positivo gene *stx1* (EHEC EDL 933); Canaleta 2 : amostra de *E. coli* positiva; Canaletas 3 e 4 amostras de *E. coli* negativas; Canaletas 5,6,7,8,9 e 10: amostras de *E. coli* positivas; Canaletas 11 e 12 amostras negativas; Canaleta 13 controle negativo.

Figura 3. Perfil eletroforético em gel de agarose 1,5% dos fragmentos amplificados em reações de PCR para detecção do gene *stx1* isolados de *E. coli* em aves abatidas pelo SIF no Estado do Tocantins entre agosto de 2010 e junho de 2012.



Gel corado com brometo de etídio e visualizado em transluminador com luz ultravioleta. Canaletas: PM- Padrão molecular 1 Kb DNA Ladder; Canaleta 1: controle positivo gene *est* (EIEC EDL 1284); Canaleta 2 : amostra de *E. coli* negativa; Canaletas 3 e 4 amostras de *E. coli* positivas; Canaletas 5,6 e 7: amostras de *E. coli* negativas; Canaleta 8 amostra de *E. coli* positiva; Canaleta 9 amostra de *E. coli* negativa; Canaletas 10 e 11 amostras de *E. coli* positivas; Canaletas :12, 13,14,15 e 16 amostras de *E. coli* negativas; Canaleta 17 : amostra de *E. coli* positiva; Canaleta 18: amostra de *E. coli* negativa; Canaleta 19: controle negativo.