

**AVALIAÇÃO PRELIMINAR DA PCR EM  
TEMPO REAL NA DETECÇÃO DE FATORES  
DE VIRULÊNCIA DE *ESCHERICHIA COLI*  
PATOGÊNICA EM AVES**

Silvia de Carli<sup>1</sup>  
Fernanda Kieling Moreira Lehmann<sup>2</sup>  
Vagner Ricardo Lunge<sup>2,3</sup>  
Denis Willian da Silva<sup>4</sup>  
Vinicius Proença da Silveira<sup>5</sup>  
Fabiana de Oliveira Solla Sobral<sup>6</sup>  
Gabriela de Melo Predebon<sup>6</sup>  
Nilo Ikuta<sup>2,7</sup>

**RESUMO**

A caracterização de cepas patogênicas de *Escherichia coli* em aves pode ser realizada pela detecção de fatores de virulência (*iss*, *iutA*, *iroN*, *ompT* e *hlyF*) através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR). O objetivo do presente trabalho foi desenvolver uma metodologia mais prática e rápida para detecção dos mesmos fatores através da PCR em tempo real (qPCR). Foram analisados através da nova técnica 112 isolados de *E. coli* previamente caracterizados por PCR convencional. Até o momento, verificou-se 100% de concordância na análise de *iroN*, *ompT* e *hlyF*. Observou-se, porém, uma grande incidência de falsos resultados positivos na detecção de *iss* e *iutA*. O presente trabalho indica que a técnica de qPCR apresenta um grande potencial na caracterização de isolados de *E. coli*.

**Palavras-chave:** *Escherichia coli*, APEC, AFEC, PCR, fatores de virulência.

**ABSTRACT**

Pathogenic *Escherichia coli* characterization in poultry can be made by polymerase chain reaction (PCR). This technique detects virulence factors (*iss*, *iutA*, *iroN*, *ompT* and *hlyF*), and the aim of this study was to develop a technique to identify the same targets by real-time PCR (qPCR). After qPCR optimization, this technique was used to compared 112 *E. coli* isolates previously characterized by conventional PCR (gold standard). Until now, it was observed 100% of detection agreement for *iroN*, *ompT* and *hlyF* genes. In the other hand an high incidence of false positive

1 Acadêmico do curso de Medicina Veterinária/ULBRA – Bolsista PROBIC/FAPERGS

2 Laboratório de Diagnóstico Molecular/ULBRA

3 Professor do curso de Medicina Veterinária/ULBRA

4 Acadêmico do curso de Medicina Veterinária/ULBRA

5 Acadêmico do curso de Medicina Veterinária/ULBRA – Bolsista PIBIC/CNPq

6 Aluno de Pós-Graduação Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde /ULBRA

7 Professor – Orientador do curso de Medicina Veterinária/ULBRA

results were observed in *iutA* and *iss* detections. This work indicates that real-time PCR has great potential for *E. coli* pathogenicity characterization.

**Keywords:** *Escherichia coli*, APEC, AFEC, PCR, virulence factors.

## INTRODUÇÃO

A avicultura é uma atividade econômica internacionalizada, uniforme e sem fronteiras tecnológicas (VIEIRA; DIAS, 2005). Desde a década de 1970, o Brasil vem se destacando no mercado mundial, atingindo produtividade e qualidade comparáveis aos países desenvolvidos (TEIXEIRA, 2008). Neste sentido, a avicultura tem contribuído para o crescimento e modernização do agronegócio brasileiro, gerando divisas empregos e renda no campo (VIEIRA; DIAS, 2005).

No Brasil o setor se destaca no cenário mundial com altos níveis de produtividade e qualidade. Em 2012 a produção foi de aproximadamente 12,6 milhões de toneladas, sendo aproximadamente 30% voltadas para exportação (AVISITE, 2012). Em virtude do aumento de produção eleva-se proporcionalmente o risco da disseminação de doenças infecciosas, tornando necessária a adoção de práticas corretas de higiene e biossegurança em todas as etapas do processo produtivo (GONÇALVES, 2005; MACHADO, 2010). A regulamentação da produção de carnes, ovos e derivados avícolas busca atingir os índices de qualidade exigidos pelos mercados nacional e internacional (MACHADO, 2010), pois as doenças transmitidas por alimentos representam barreiras sanitárias ao comércio dos produtos avícolas (NETO; MIRANDA, 2009; GONÇALVES, 2005).

A colibacilose está normalmente relacionada com elevados índices de condenação de carcaças de aves nos abatedouros (JOHNSON et al., 2008). Os lotes acometidos apresentam desuniformidade e aumento da mortalidade (KEMMETT, 2013). Os pintos infectados que sobrevivem aos primeiros dias de vida podem ter o desenvolvimento comprometido, tornando-se portadores e veiculadores a outros lotes (GOMES, 2011). Clinicamente, esta doença pode se manifestar na forma de enterite, artrite, onfalite, coligranuloma, salpingite, septicemia, aerossaculite, doença respiratória crônica (DRC), celulite aviária, síndrome da cabeça inchada, peritonite, osteomielite e sinovite (ROCHA, 2008; KNÖBL et al., 2008; DZIVA; STEVENS, 2008).

Cepas patogênicas de *Escherichia coli* (*Avian Pathogenic E. coli* - APEC) são os agentes causais da colibacilose. No entanto, cepas não patogênicas (*Avian Fecal E. coli* - AFEC) podem ser encontradas na microflora normal do trato intestinal das aves e mamíferos e dificultam a caracterização do agente causal (ZANATTA et al., 2004). As cepas patogênicas diferem das comensais por apresentarem fatores de virulência (FVs) e proporcionarem infecções extraintestinais (KNÖBL et al., 2008). Alguns mecanismos de patogenicidade relacionados com os fatores de virulência, bem como seus respectivos genes, já são conhecidos e amplamente estudados. As adesinas são responsáveis pela manutenção do contato entre bactérias e hospedeiro, as toxinas protegem e auxiliam na penetração do patógeno, as protectinas e invasinas são responsáveis pela resistência ao sistema complemento e a aerobactina permite a sobrevivência e crescimento das bactérias em ambientes com falta de ferro. Alguns fatores de

virulência estão também envolvidos na sensibilidade a temperatura do gene da hemaglutinina (HA) (SAIF et al., 2008; NAKAZATO et al., 2009; JEONG et al., 2012)

Com a intenção de diferenciar APEC e AFEC, estudo prévio analisou isolados norte-americanos e possibilitou a identificação dos genes dos FVs mais frequentes em APEC. As amostras foram classificadas em sorotipos, capacidade de fermentação de lactose, reação hemolítica e determinação da presença dos genes dos fatores de virulência (genotipagem). A genotipagem foi realizada por ensaios de PCR e 38 FVs foram analisados. Os resultados demonstraram que nove FVs (*cvaC*, *iroN*, *iss*, *iutA*, *sitA*, *tsh*, *fyuA*, *irp2* e *ompT*) ocorrem em alta frequência em APEC e raramente em AFEC. Os isolados de APEC pesquisados compartilhavam o conjunto de genes de virulência, localizados em plasmídeos (como o pTJ100), indicando que estes podem ser úteis na definição de APEC (RODRIGUEZ-SIEK et al., 2005). Posteriormente o mesmo grupo analisou um painel mais completo de isolados (794 APEC e 200 AFEC) e demonstrou que a diferenciação de APEC e AFEC pode ser realizada com a análise de apenas cinco FVs (conjunto capaz de definir a presença dos plasmídeos de virulência). A análise do gene *hlyF* foi incorporado à análise juntamente com quatro genes, previamente selecionados no primeiro estudo (*iutA*, *iss*, *iroN* e *ompT*). Este painel tem sido utilizado na análise de rotina de isolados de *E. coli*, permitindo a determinação da origem dos surtos em animais, no planejamento de metas eficazes para o controle da colibacilose e no esclarecimento de potenciais funções de genes associados a APEC em doenças humanas (JOHNSON et al., 2008).

No Brasil, já são descritos alguns estudos de caracterização de fatores de virulência de *E. coli* e diferenciação de APEC e AFEC (IKUNO et al., 2006; NAKAZATO et al., 2009; BAPTISTA et al., 2010; MATURANA et al., 2011). No entanto, apenas trabalhos mais recentes demonstraram a elevada frequência dos cinco principais fatores de virulência (*iutA*, *iss*, *iroN*, *ompT* e *hlyF*) em APECs brasileiros, indicando que os isolados que circulam em nosso país são similares às cepas norte-americanas (KOBAYASHI et al., 2011, PREDEBON, 2012).

A PCR em tempo real tem sido amplamente utilizada no diagnóstico molecular de doenças infecciosas, pois permite a redução do tempo para obter os resultados quando comparado com a PCR convencional (MACKAY, 2004). Além disto, a técnica tem como vantagem ser menos laboriosa, mais precisa e com menos risco de contaminação, pois a detecção é visualizada diretamente no equipamento (HEID et al., 1996). Recentemente, esta técnica foi utilizada para analisar a expressão gênica de 9 fatores de virulência (*gapA*, *sitA*, *iutA*, *hlyF*, *etsC*, *iss*, *iroN*, *cvaC* e *tsh*), porém sem objetivo de classificação dos patótipos (SKYBERG et al., 2008). O presente trabalho teve como objetivo estabelecer e validar uma metodologia para diferenciação de APEC e AFEC por PCR em tempo real utilizando os cinco alvos previamente descritos (JOHNSON et al., 2008).

## METODOLOGIA

### Desenho de *primers* e sondas

As sondas e iniciadores utilizados no presente trabalho estão descritos na tabela 1. Os oligonucleotídeos para os ensaios de Taqman PCR foram desenhados no presente

estudo, utilizando o programa *Primer Express* (Applied Biosystems), para os cinco fatores de virulência (*iss*, *iutA*, *hlyF*, *ompT* e *iroN*). Além disto, os primers descritos por Johnson et al. (2008) para detecção por PCR convencional (teste de referência) também estão descritos na Tabela 1.

## Extração de DNA

A extração do DNA foi realizada utilizando o kit comercial NewGene (Simbios Biotecnologia, Cachoeirinha - Brasil), onde uma suspensão bacteriana de 100 µL foi adicionada em 400 µL de solução de lise (5 M tiocianato de guanidina, 0,1 M Tris-HCl [pH 6,4]) e incubadas a 60°C por 10 min. Após centrifugação (10.000 x g, 1 min), o sobrenadante foi transferido para um tubo contendo 20 µL de uma suspensão de sílica. Em seguida realizou-se agitação e centrifugação (10.000 x g, 1 min), e o “*pellet*” foi lavado duas vezes com 150 µL de solução de lavagem A (5 M tiocianato de guanidina, 0,1 M Tris-HCl [pH 6,4]), duas vezes com solução de lavagem B (etanol 80%) e uma vez com solução de lavagem C (etanol 100%). Após a secagem da sílica o DNA foi separado com 50 µL de solução de eluição (10 mM Tris-HCl [pH 8,0], 1 mM EDTA).

**Tabela 1.** Sequência dos *primers* dos dois métodos descritos (PCR convencional e PCR em tempo real) e sondas com seus respectivos fluoróforos desenhados para detecção de cinco FVs e o tamanho dos fragmentos amplificados para cada alvo.

	<b>Alvo</b>	<b>Sequência</b>	<b>Fragmento</b>
<b>PCR em tempo real</b>	<i>iss</i>	5' - TTTCTGCACCGCCACAAA - 3' 5' - CGGGAATTGGACAAGAGAAAAAC - 3' Sonda 5' VIC -TTTGGCTGCATCAAC- NFQ 3'	57 bp
	<i>iutA</i>	5' - CGGTGGCGTACGCTATCAGT - 3' 5' - GCGCGTAGCCGATGAAAT - 3' Sonda 5' FAM -CACTGAAAACAAGATTGAT- MGB 3'	59 bp
	<i>hlyF</i>	5' - GGTTGCCCGACCATCAATT - 3' 5' - ACTGGTTGAAGGTAAGCACCCCTAA - 3' Sonda 5' FAM -TTGTTGGCCACAGTCG- MGB 3'	61 bp
	<i>ompT</i>	5' - GGTTCCGGGATTGCTCGTAT - 3' 5' - GGTCGTGGAGGCAATATGGT - 3' Sonda 5' VIC -CAGCCAGTCCCTGTG- NFQ 3'	57 bp
	<i>iroN</i>	5' - CCGTTGGTGCAGAGTGGAA - 3' 5' - CAGGCTGGTAGAGGAAGGATCA - 3' Sonda 5' FAM -CGCGATAAGCTCG- MGB 3'	53 bp
	<b>PCR Convencional</b>	<i>iss</i>	5' - CAGCAACCCGAACCACTTGATG - 3' 5' - AGCATTGCCAGAGCGGCAGAA - 3'
<i>iutA</i>		5' - GGCTGGACATCATGGGAAC TGG - 3' 5' - CGTCGGGAACGGGTAGAAATCG - 3'	302 bp
<i>hlyF</i>		5' - GGCCACAGTCGTTTAGGGTGC TTACC - 3' 5' - GGCGGTTTAGGCATTCCGATACTCAG - 3'	450 bp
<i>ompT</i>		5' - TCATCCCAGGAAGCCTCCCTCACTACTAT - 3' 5' - TAGCGTTTCTGCTGACTGGCTTCTGATAC - 3'	496 bp
<i>iroN</i>		5' - AAGTCAAAGCAGGGTTGCCCG - 3' 5' - GATCGCCGACATTAAGACGCAG - 3'	553 bp

## Otimização das reações individuais e em duplicata dos fatores de virulência por PCR em tempo real

Inicialmente cinco APECs previamente testadas por PCR convencional, foram testadas individualmente para cada um dos cinco alvos *iss*, *iutA*, *hlyF*, *ompT* e *iroN*. Posteriormente, essas mesmas amostras foram testadas em forma de reações de duplex utilizando as combinações *iss/iutA* e *hlyF/ompT* e uma amplificação única do alvo *iroN*. As reações de TaqMan PCR foram realizadas no equipamento Step One Plus (Applied Biosystems) com as seguintes condições de amplificação: ciclo de desnaturação 3 minutos a 95°C, 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C. O produto da amplificação de cada alvo foi analisado diretamente no equipamento, a aquisição de dados ocorreu na etapa de anelamento de cada ciclo e o ciclo limiar (Ct) para cada amostra foi calculado pela determinação do momento em que a fluorescência excedeu o limite. Os ensaios de amplificação com PCR convencional foram realizados conforme previamente descrito (JOHNSON et al., 2008).

### Ensaio de casuística

Após a otimização das técnicas de amplificação por PCR em tempo real das cinco amostras de APEC para os cinco alvos, realizou-se a análise de 112 isolados de *E. coli* provenientes de propriedades avícolas de matrizes de frango, galinhas poedeiras e perus. As coletas das amostras foram realizadas no período de 2010 e 2011, onde todos os lotes apresentavam suspeita de colibacilose. Os DNAs extraídos destes isolados haviam sido previamente amplificados pela técnica de PCR convencional para os cinco alvos, sendo encontrados 63 APEC e 49 AFEC (PREDEBON, 2012). Os resultados obtidos foram utilizados para avaliação da concordância entre as técnicas.

## RESULTADOS

As sondas e iniciadores desenhados neste estudo foram testados com cinco amostras de APEC positivas para os cinco FVs. Foram testadas as reações individuais para os alvos *iss*, *iutA*, *hlyF*, *ompT* e *iroN*, e posteriormente em reação de multiplex (duplex) com as combinações *iss/iutA*, *hlyF/ompT* e uma amplificação única de *iroN*. Nesta etapa, os alvos do duplex *hlyF/ompT* e da reação única do gene *iroN*, foram eficientemente detectados. Por outro lado, o duplex *iss/iutA* apresentou amplificações em todos os pontos testados, incluindo os controles negativos, indicando que este conjunto não estava adequado para dar prosseguimento com as análises.

A análise comparativa entre a PCR convencional e PCR em tempo real esta apresentadas na tabela 2. O ensaio de comparação das técnicas demonstrou total coincidência dos resultados na detecção dos FVs *ompT*, *hlyF* e *iroN*.

Tabela 2. Tabela comparativa de resultados obtidos na PCR Convencional x qPCR (PCR Real Time).

		PCR Convencional								
		<i>ompT</i>			<i>hlyF</i>			<i>iroN</i>		
		(+)	(-)	total	(+)	(-)	total	(+)	(-)	total
PCR em Tempo Real	(+)	72	0	72	72	0	72	61	0	61
	(-)	0	40	40	0	40	40	0	51	51
	<b>total</b>	72	40	112	72	40	112	61	51	112
PCR em Tempo Real	<b>Sensibilidade</b>	100%			100%			100%		
	<b>Especificidade</b>	100%			100%			100%		
	<b>Concordância</b>	100%			100%			100%		

## DISCUSSÃO

Diversas bactérias como a *E. coli* podem portar um arsenal de fatores de virulência e causarem doenças como a colibacilose, afetando diretamente a economia do setor avícola (BARNES et al., 2008). Atualmente, o diagnóstico da doença no nosso país baseia-se na análise de sinais clínicos, com a confirmação laboratorial através do isolamento bacteriano, seguido de um antibiograma para tratamento das aves. O inconveniente deste procedimento é o alto índice de falsos positivos, decorrente das aves serem portadoras de *E. coli* comensais (AFECs).

Rodriguez-Siek et al. (2005) e Johnson et al. (2008) demonstraram que a melhor metodologia para a identificação de APECs e AFECs é baseada em ferramentas moleculares através da detecção de FVs comumente encontrados em plasmídeos (JOHNSON et al., 2008). Atualmente, já se sabe que AFECs podem ser transformadas em APECs, quando ocorre transferência horizontal destes plasmídeos (RASKO et al., 2008; EWERS et al., 2009). Fato demonstrado por Skyberg et al. (2006), através da transferência de dois plasmídeos de APEC (CoIV e R) para uma cepa AFEC por conjugação, no qual possibilitou a mesma habilidade de matar embriões de aves. A metodologia para a caracterização de APECs descrita por Rodriguez-Siek et al. (2005) selecionou nove FVs plasmidiais (*cvaC*, *iroN*, *iss*, *iutA*, *sitA*, *tsh*, *fyuA*, *irp2* e *ompT*). Estudo posterior do mesmo grupo (JOHNSON et al., 2008) selecionou cinco FVs como os melhores e suficientes para diferenciar APECs de AFECs (*iutA*, *iss*, *iroN*, *ompT* e *hlyF*). Quatro destes (*iutA*, *iss*, *iroN* e *ompT*) são os mesmos do estudo de Rodriguez-Siek et al. (2005), com o gene adicional *hlyF*. Estes fatores de virulência apareceram em maior frequência em APEC do que em AFEC, sendo assim são considerados de alta eficiência na diferenciação de cepas patogênicas.

A diferenciação precisa e eficiente entre cepas patogênicas e comensais no Brasil através da análise dos cinco alvos mostrou-se eficaz no presente estudo, confirmando os dados obtidos por Kobayashi et al. (2011) e Predebon (2012). Dos 112 isolados provenientes de lotes comerciais de com sinais clínicos compatíveis com colibacilose, 56% das amostras foram caracterizadas como APECs e 44% como AFECs. Este estudo evidencia que o tratamento com antibióticos baseados somente no isolamento de *E. coli* pode levar a uma terapêutica não adequada. Neste sentido, a diferenciação das bactérias

patogênicas, permitiria um melhor manejo dos lotes, redução de custos com tratamentos ineficazes e a diminuição de bactérias resistentes a antimicrobianos (CATANA et al., 2009; DHEILLY, 2011).

Além disto, o desenvolvimento da PCR em tempo real, demonstrou alta eficiência na detecção dos FVs *iroN*, *ompT* e *hlyF*, com 100% de concordância, sensibilidade e especificidade (tabela 2) quando comparado com a técnica padrão (PCR convencional). Isto indica um grande potencial da nova técnica, agregando vantagens na execução do procedimento, como maior rapidez, praticidade e menor subjetividade na análise dos resultados. Os ensaios de amplificação para os alvos *iutA* e *iss*, por sua vez, apresentaram resultados falsos positivos, não permitindo a conclusão deste estudo. A análise dos resultados, sempre evidenciou que este comportamento estava relacionado com o alvo *iss*. Para tentativa de solução, foram realizados vários experimentos utilizando temperaturas de anelamento mais elevadas (entre 60 - 70 °C), novos iniciadores *iss*, redução do MgCl<sub>2</sub> (1,5 - 0,8 mM), e infelizmente não foram obtidos melhores resultados. Assim, a partir do conhecimento de que a enzima Taq DNA polimerase é produzida a partir de células de *Escherichia coli*, e que o gene *iss* poderia ser encontrado em seu genoma, foram avaliadas três diferentes marcas comerciais da enzima, bem como alíquotas de lotes diferentes daquela que estava em uso. O delineamento experimental baseou-se na amplificação de controles negativos de amplificação (*sem amostra*), e os resultados foram esclarecedores. Verificou-se que apenas a enzima original e alíquotas de lotes diferentes do mesmo fabricante, apresentaram ampliações para este alvo. A partir destes achados, serão retomadas as análises dos 112 isolados com a amplificação dos alvos *iss/iutA* para conclusão do projeto.

## CONCLUSÕES

A qPCR é cada vez mais utilizada nas agroindústrias do país por ser mais rápida, menos subjetiva e com menor risco de contaminação. Este estudo indica que a técnica desenvolvida apresenta alta concordância, sensibilidade e especificidade para os alvos testados até o momento. E, desta forma, caso seja confirmado comportamento semelhante para o duplex *iss/iutA*, a técnica desenvolvida poderá contribuir para o diagnóstico mais eficiente desta importante patologia que acomete granjas em nosso país.

## REFERÊNCIAS

- AVISITE. Produção de carne de frango. Disponível em: <[www.avisite.com.br/economia/estatistica](http://www.avisite.com.br/economia/estatistica)>. Acesso em: 20 dez. 2012.
- BAPTISTA, A. A. S. et al. Cloning, expression and sequence diversity of *iss* gene from avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated in Brazil. Ciênc. Ag., v. 31, n. 3, p. 723-732, 2010.
- BARNES, H. J.; NOLAN, L. K.; VAILLANCOURT, J. F. Colibacillosis. In: SAIF, Y. M. et al. Diseases of poultry. 12th ed. [S.l.]: Blackwell Publishing, 2008. p. 691-732.

CATANA, N. et al. Resistotypes in the APEC strains. L. Sti Med Vet., v. XLII, n. 1, p. 203-206, 2009.

DHEILLY, A. et al. Clinical and microbial efficacy of antimicrobial treatments of experimental avian colibacillosis. Vet Microbiol., v. 149, n. 3-4, p. 422-429, 2011.

DZIVA, F.; STEVENS, M. P. Colibacillosis in poultry: unravelling the molecular basis of virulence of avian pathogenic *Escherichia coli* in their natural hosts. Avian Pathol., v. 37, n. 4, p. 355-366, 2008.

EWERS, C. et al. Intestine and environment of the chicken as reservoirs for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains with zoonotic potential. Appl Environ Microbiol., v. 75, n. 1, p.1 84-192, 2009.

GOMES, M. J. P. *Escherichia coli* spp. In: LABACVET 2007- II. Microbiologia Clínica. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/labacvet/pdf/ecoli.pdf>>. Acesso em: 17 jan. 011.

GONÇALVES, P. M. R. Escherichia coli com detecção do gene iss por PCR, micoplasmas e salmonelas na qualidade sanitária de frangos de corte ao abate. 2005. 84f. Tese (Doutorado em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal) - Universidade Federal Fluminense, 2005.

HEID, C. A. et al. Real time quantitative PCR. Genome Res., v. 6, p. 986-994, 1996.

IKUNO, A. A. ET al. Genes de virulência associados em *Escherichia coli* (APEC) isoladas de poedeiras comerciais, do meio ambiente e de água de dessedentação de granjas de postura de ovos. Biol., v. 68, p. 68-72, 2006.

JEONG, Y. W. et al. Pathotyping avian pathogenic *Escherichia coli* strains in Korea. J. Veterinary science., v. 13, n. 2, p. 145-152, 2012.

JOHNSON, T. J. et al. Identification of minimal predictors of avian pathogenic *Escherichia coli* virulence for use as a rapid diagnostic tool. J. Clin Microbiol., v. 46, n. 12, p. 3987-3996, 2008.

KEMMETT, K. et al. A Longitudinal Study Simultaneously Exploring the Carriage of APEC Virulence Associated Genes and the Molecular Epidemiology of Faecal and Systemic *E. coli* in Commercial Broiler Chickens. PlosOne, v. 8, n. 6, p. e67749, 2013.

KOBAYASHI, R. K. et al. EcoR phylogenetic analysis and virulence genotyping of avian pathogenic *Escherichia coli* strains and *Escherichia coli* isolates from commercial chicken carcasses in southern Brazil. Foodborne Pathog Dis., v. 8, n. 5, p. 631-634, 2011.

KNÖBL, T. et al. Caracterização molecular dos fatores de virulência de estirpes de *Escherichia coli* isoladas de papagaios com colibacilose aviária. Braz. J. Vet. Res., v. 45, n. 1, p. 54-60, 2008.

MACHADO, L. S. PCR na detecção de *Mycoplasma gallisepticum* e *Escherichia coli* patogênica em frangos de corte com aerossaculite pela Inspeção Sanitaria Federal. 2010. 63f. Dissertação (Mestrado em Higiene Veterinária e Processamento tecnológico de produtos de origem animal) - Universidade Federal Fluminense, 2010.

MACKAY, I. M. Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clin Microbiol Infect., v. 10, n. 3, p. 190-212, 2004.

MATURANA, V. G. et al. Subpathotypes of Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC) Exist as Defined by their Syndromes and Virulence Traits. Open Microbiol J., v. 5, n. 1, p. 55-64, 2011.

NAKAZATO, G. ET al. Virulence factors of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). Pesq Vet Bras., v. 29, n. 7, p. 479-486, 2009.

- NETO, A. A. A.; MIRANDA, C. C. M. Inspeção de aves. Monografia (Especialização em Higiene e Inspeção de Produtos de Origem Animal) - Universidade Castelo Branco, Goiânia, 2009.
- PREDEBON, M. G. Caracterização do perfil de fatores de virulência de *Escherichia coli* isoladas de aves. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular Aplicada a Saúde) - Universidade Luterana do Brasil, Canoas, 2012.
- RASKO, D. A. et al. The pangenome structure of *Escherichia coli*: comparative genomic analysis of *E. coli* commensal and pathogenic isolates. J Bacteriol., v. 190, n. 20, p. 6881-6893, 2008.
- ROCHA, S. L. S. Deteção de fatores de virulência de amostras de *E. coli* isoladas de granjas avícolas do RS através do PCR multiplex. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.
- RODRIGUEZ-SIEK, K. E. et al. Characterizing the APEC pathotype. Vet Res., v. 36, n. 2, p. 241-256, 2005.
- SAIF, Y. M. et al. Diseases of poultry. Board for the american., v. 12, p. 690-735, 2008.
- SKYBERG, J. A.; JOHNSON, T. J.; NOLAN, L. K. Mutational and transcriptional analyses of an avian pathogenic *Escherichia coli* ColV plasmid. BMC Microbiol., v. 8, p. 28, 2008.
- SKYBERG, J. A. et al. Acquisition of avian pathogenic *Escherichia coli* plasmids by a commensal *E. coli* isolate enhances its abilities to kill chicken embryos, grow in human urine, and colonize the murine kidney. InfectImm., v. 74, n. 11, p. 6287-6292, 2006.
- TEIXEIRA, V. Q. Anatomopatologia e bacteriologia da pododermatite em frangos de corte sob inspeção sanitária. 2008. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal Fluminense, 2008.
- VIEIRA, N. M.; DIAS, R. S. Uma abordagem sistêmica da avicultura de corte na economia brasileira. Departamento de Economia Rural (DER), 2005. Disponível em: <[www.sober.org.br/palestra/2/394.pdf](http://www.sober.org.br/palestra/2/394.pdf)>. Acesso em: 10 jan. 2011.
- ZANATTA, G. F. et al. Suscetibilidade de amostras de *Escherichia coli* de origem aviária a antimicrobianos. Arq. Inst. Biol., v. 71, n. 3, p. 283-286, 2004.