

## Caracterização molecular dos fatores de virulência de estirpes de *Escherichia coli* isoladas de papagaios com colibacilose aviária

Terezinha KNÖBL<sup>1</sup>  
 Sílvia Nery GODOY<sup>2</sup>  
 Eliana Reiko MATUSHIMA<sup>2</sup>  
 Marta Brito GUIMARÃES<sup>2</sup>  
 Antonio José Piantino  
 FERREIRA<sup>2</sup>

1 - Faculdade de Medicina Veterinária do Centro Universitário das Faculdades Metropolitanas Unidas, São Paulo - SP

2 - Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo - SP

### Correspondência para:

Terezinha Knöbl – Laboratório de Epidemiologia e Doenças Infecciosas – FMU. Avenida Santo Amaro 1239, Vila Nova Conceição, São Paulo, SP. Cep 04505-002. E-mail: tknobl@fmu.br

Recebido para publicação: 07/04/2007  
 Aprovado para publicação: 29/07/2008

### Resumo

Oito amostras de *Escherichia coli* isoladas de papagaios com colibacilose aviária foram sorogrupadas e investigadas para a presença dos fatores de virulência: pili associado a pielonefrite (*pap*), fimbria S (*sfa*), adesina afimbrial (*afa*), cápsula K1 (*neu*), curli (*crf*, *csgA*), hemaglutinina termo-sensível (*tsh*), enterotoxinas termo-lábil (LT) e termo-estável (STa e STb), Shiga-like toxinas (Stx1 e Stx2), Fator citotóxico necrotizante (*cnf1*), hemolisina (*hly*), aerobactina (*iuc*) e resistência sérica (*iss*). Os resultados mostraram que os isolados pertenciam a seis sorogrupos: O23; O54; O64; O76; O128 e O152. Os genes de virulência detectados foram: *crf*<sup>+</sup> em todos os isolados; *pap*<sup>+</sup>; *iss*<sup>+</sup> e *iuc*<sup>+</sup> em três isolados, *tsh*<sup>+</sup> em dois isolados. Todas as amostras foram negativas para os genes *neu*, *csgA*, *sfa*, *afa*, *hly*, *cnf* e para as toxinas LT, STa, STb, Stx1 e Stx2. Estes resultados sugerem que amostras de *E. coli* isoladas de papagaios apresentam alguns fatores de virulência das amostras do patotipo de *E. coli* patogênica para aves (APEC).

### Palavras chave:

Papagaios.  
*Escherichia coli*.  
 Fatores de virulência.  
 APEC.  
 Colibacilose.

### Introdução

As infecções bacterianas figuram entre as principais causas de enterite e septicemia em aves silvestres, com destaque para os membros da família *Enterobacteriaceae*.<sup>1</sup> Muitos autores consideram a presença de microrganismos Gram-negativos no trato digestório de psitacídeos como um fator indesejável, devido ao potencial de patogenicidade destas bactérias para as aves.<sup>1,2,3</sup> *Escherichia* é o gênero mais comumente encontrado da família das Enterobactérias e a espécie *Escherichia coli*, o agente mais frequentemente isolado em tecidos obtidos na necropsia de aves silvestres.<sup>4,5,6</sup>

A colonização intestinal das aves por amostras de *E. coli* patogênicas está intimamente associada a fatores de estresse, má nutrição ou problemas de manejo ambiental.<sup>7</sup> As manifestações clínicas da doença incluem sinais de intensa prostração,

enterite, hepatite, hepato e esplenomegalia, aerossaculite, poliserosite e comprometimento de diversos órgãos como rins, oviduto, pulmão, medula óssea e articulações.<sup>8</sup>

A severidade do quadro clínico depende do potencial de virulência do agente que é determinado pelo conjunto de genes localizado nas ilhas de patogenicidade.<sup>9,10</sup> Estudos envolvendo patotipos de *E. coli* patogênicos para galinhas (APEC) apontam os fenômenos de aderência bacteriana, crescimento em condições de restrição do íon ferro e a resistência sérica como principais responsáveis pela patogenia da doença.<sup>11</sup>

A aderência bacteriana na maioria das vezes é mediada por adesinas fimbriais manose-sensíveis (pili tipo I) e manose-resistentes (fimbrias P e S).<sup>12</sup> A capacidade de crescimento em meios com ferro indisponível resulta da produção de substâncias quelantes, denominadas sideróforos. Amostras de *E. coli* aviárias

usualmente seqüestram o ferro através da produção de aerobactina.<sup>13</sup>

A habilidade em resistir aos fatores séricos inibitórios permite que a bactéria escape da ação do sistema complemento e da fagocitose nos processos de infecção sistêmica. A resistência sérica das bactérias tem sido atribuída a diversas estruturas destas células incluindo o lipopolissacarídeo (LPS), a cápsula K1 e as proteínas de membrana externa (OMPs) que são codificadas pelos genes *traT* e *isz*.<sup>13,14</sup>

O objetivo deste trabalho foi caracterizar amostras de *E. coli* isoladas de papagaios com colibacilose, sob o ponto de vista molecular e de virulência.

## Material e Método

### Origem das amostras de *Escherichia coli*

Este estudo foi realizado a partir de amostras de *E. coli* isoladas de oito papagaios doentes, atendidos pelo Ambulatório de Aves do Hospital da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo. As aves envolvidas apresentavam manifestações clínicas compatíveis com o quadro de colibacilose aviária e evoluíram para o óbito.

Fragmentsos de fígado e coração foram colhidos com assepsia durante a necropsia, para realização da cultura. As amostras foram transportadas ao Laboratório de Ornitopatologia FMVZ-USP, sob refrigeração.

A cultura foi realizada após cultivo em caldo infusão de cérebro e coração (BHI) a 37°C por 18 horas e o plaqueamento em ágar sangue e ágar MacConkey, incubando-se a 37°C por 24 horas, em aerobiose.<sup>15</sup> Em todas as culturas realizadas, obteve-se apenas o crescimento de colônias fermentadoras de lactose, identificadas posteriormente pela série bioquímica (Enterokit –Probac®) como *Escherichia coli*. As amostras isoladas foram subcultivadas e estocadas a -20°C em meio BHI com 15% de glicerol.

Uma cepa de *E. coli* K12 foi utilizada como controle negativo. As cepas EC27 (sorogrupo O78) e EC20 (sorogrupo O6), pertencentes à coleção de culturas de *E. coli* do Laboratório de Ornitopatologia da USP, foram utilizadas como controles positivos.

### Determinação do sorogrupo

Os sorogrupos foram identificados de acordo com a metodologia descrita por Guinée et al.<sup>16</sup> utilizando os anticorpos que identificam o antígeno somático O (O1 a O185). Estes foram produzidos no Laboratório de Referência em *E. coli* (LREC) – na Universidade de Santiago de Compostela, Lugo, Espanha - <http://www.lugo.usc.es/ecoli>.

### Caracterização molecular pela Reação em cadeia pela polimerase - PCR

Diferentes pares de oligonucleotídeos foram utilizados para detectar a presença dos genes que codificam os seguintes fatores de virulência: pili associado à pielonefrite (*pap*), a-hemolisina (*hly*), aerobactina (*iuc*), fator citotóxico necrotizante 1 (*cnf1*), fimbria S (*sfa*), adesina afimbrial I (*afaI*), enterotoxinas termo lábil (LT) e termo estável (STa e STb), Shiga-like toxinas (Stx1 e Stx2), adesina regulada pela temperatura (*tsb*) e curli (*crl*, *csgA*). A tabela 1 ilustra a seqüência de bases dos *primers* e o tamanho dos fragmentos amplificados esperados.<sup>17,18,19,20,21,22,23,24,25</sup>

A extração de DNA foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Boom et al.<sup>26</sup>. A solução para amplificação foi composta por Tris-HCl (pH 8.3) 10 mM, KCl 50mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, gelatina 0,001% (água/vol), desoxinucleotídeos trifosfatos 200mM, pares de oligonucleotídeos e enzima Taq DNA polimerase 0,5 U, num volume final de 25 ml. Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% e corados com Brometo de Etídeo.<sup>27</sup>

**Tabela 1** - Seqüência de oligonucleotídeos, tamanho dos fragmentos, e referências utilizadas para a detecção dos fatores de virulência de *E. coli*. São Paulo, 2007

Fator de virulência (Gene)	Seqüência dos oligonucleotídeos (5'-3')	Fragmento amplificado (pb)	Referências
Adesina P ( <i>pap</i> )	GCAACAGCAACGCTG GTTGCATCAT AGAGAGAGCCACTCTTATACGGACA	336	Yamamoto et al. <sup>17</sup>
Adesina S ( <i>sfa</i> )	CTCCGGAGAACTGGGTGCATCTTAC CGGAGGAGTAATTACAAACCTGGCA	410	Yamamoto et al. <sup>17</sup>
Adesina afimbrial ( <i>afa</i> )	GCTGGGCAGCAAACCTGATAACCTC CATCAAGCTGTTTGTTCGTCGCCG	750	Yamamoto et al. <sup>17</sup>
Hemolisina ( <i>hly</i> )	AACAAGGATAAGCACTGTTCTGGCT ACCATATAAGCGGTCATTCCCGTCA	1177	Yamamoto et al. <sup>17</sup>
Aerobactina ( <i>iuc</i> )	TACCGGATTGCATATGCAGACCGT AATATCTTCCCTCCAGTCCGAGAAG	602	Yamamoto et al. <sup>17</sup>
Fator citotóxico necrotizante ( <i>cnf1</i> )	AAGATGGAGTTTCTATGCAGGAG CATTAGAGTCTGCCCTCATTATT	498	Yamamoto et al. <sup>17</sup>
Enterotoxina LT	GGGCACAGATTATACCGTGC CCGAATTCTGTTATATATGTC	696	Schultsz et al. <sup>18</sup>
Enterotoxina STa	TTAATAGCACCCGGTACAAGCAGG CTTGACTCTTCAAAAGAGAAAATTAC	147	Olsivk et al. <sup>19</sup>
Enterotoxina STb	ATCGCATTCTTCTTGCATC GGGCGCCAAAGCATGCTCC	172	Blanco et al. <sup>20</sup>
Toxina Stx1	GAAGAGTCCGTGGGATTACG AGCGATGCAGCTATTAATAA	130	Pollard et al. <sup>21</sup>
Toxina Stx2	CCGTCAGGACTGTCTGAAAC GAGTCTGACAGGCAACTGTC	726	Woodward et al. <sup>22</sup>
Curli ( <i>crl</i> )	TTTCGATTGCTGGCTGTATG CTTCAGATTACGCGTCGTC	250	Maurer et al. <sup>23</sup>
Curli ( <i>csgA</i> )	ACTCTGACTTGACTATTACC AGATGCAGTCTGGTCAAC	200	Maurer et al. <sup>23</sup>
Hemaglutinina termo-sensível ( <i>tsh</i> )	GGGAAATGACCTGAATGCTGG CCGCTCATCAGTCAGTACCAC	420	Maurer et al. <sup>23</sup>
Cápsula K1 ( <i>neu</i> )	TATAATTAGTAACCTGGGGC GGCGCTATTGAATAAGACTG	927	Tsukamoto et al. <sup>24</sup>
Resistência sérica ( <i>iss</i> )	GTGGCGAAAACCTAGTAAAAACAGC CGCCTCGGGGTGGATAA	760	Horne et al. <sup>25</sup>

## Resultados

Os resultados estão descritos na tabela 2. Foram identificados seis sorogrupos distintos: O23; O54; O64; O76; O128 e O152. Uma amostra não teve o sorogrupo identificado.

A presença do gene que codifica a fímbria P (*pap*) foi detectada em três das oito amostras estudadas. Todas as amostras

foram positivas para o gene *crl*, mas nenhuma amostra *crl*+ possui o gene responsável pela síntese da subunidade estrutural (*csgA*).

Duas amostras foram identificadas como positivas para as adesinas reguladas pela temperatura (*tsh*). Os genes responsáveis pela captura de ferro (*iuc*) e pela resistência sérica (*iss*) foram identificados em três amostras (3/8).

Nenhuma amostra foi positiva para

**Tabela 2** - Sorogrupos e resultados obtidos na PCR para os fatores de virulência de *E. coli* isoladas de papagaios com colibacilose. São Paulo, 2007

Isolado ( <i>E. coli</i> )	Material Clínico	sorogrupos	<i>crl</i>	<i>csgA</i>	<i>pap</i>	<i>iss</i>	<i>iuc</i>	<i>tsh</i>
PSC 1	Fígado	ONT	+	-	+	+	-	-
PSC 2	Fígado	O152	+	-	-	-	-	-
PSC 3	Coração	O64	+	-	+	+	-	-
PSC 4	Coração	O23	+	-	-	+	+	+
PSC 5	Fígado	O128	+	-	-	-	-	-
PSC 6	Fígado	O76	+	-	-	-	+	-
PSC 7	Fígado	O54	+	-	+	-	+	+
PSC 8	Coração	O152	+	-	-	-	-	-
TOTAL			8/8	0/8	3/8	3/8	3/8	2/8

*crl/csgA* = curli; *pap* = pili associado a pielonefrite; *iss* = resistência sérica; *iuc* = produção de aerobactina; *tsh* = hemaglutinina termo-sensível.

os genes que codificam toxinas, hemolisina, cápsula K1 e as adesinas S e afa.

Das oito amostras analisadas, quatro foram positivas para no máximo dois fatores de virulência pesquisados, enquanto outras quatro apresentaram-se positivas para três ou quatro dos seis fatores pesquisados.

## Discussão e Conclusões

Diversos ensaios fenotípicos e genotípicos têm sido descritos para diferenciar amostras de *E. coli* patogênicas e não patogênicas.<sup>2,14,28,29,30,31</sup> O uso de técnicas moleculares, particularmente da PCR, é o modo mais rápido e sensível para detectar fatores de virulência bacteriana. No entanto, a literatura sobre os fatores de virulência de amostras de *E. coli* isoladas de psitacídeos é escassa.<sup>8,11</sup>

Os dados deste estudo (Tabela 2) mostraram a presença do gene *pap* em três das oito amostras estudadas. Estes resultados são semelhantes aos descritos por Janben et al.<sup>32</sup> que identificaram 30% de amostras *pap*+ em isolados de *E. coli* aves comerciais. A fímbria P é uma adesina manose-resistente freqüentemente observada no patotipo UPEC presente em isolados de infecções do trato urinário (cistite e pielonefrite) em humanos. A expressão da fímbria P em *E. coli* de aves parece estar relacionada à

colonização de órgãos internos (fígado e coração) nos estágios mais avançados da colibacilose.<sup>33</sup>

Outro gene identificado neste trabalho foi o *tsh*. Este gene é responsável pela síntese de uma proteína de aderência termo-sensível e com capacidade hemaglutinante, que possui uma alta homologia com IgA proteases de *Neisseria gonorrhoeae* e *Haemophilus influenzae*. Esta adesina tem sido apontada como um importante marcador de virulência em APEC.<sup>31,34</sup> Neste trabalho o gene *tsh* foi identificado em um quarto das amostras estudadas.

Os genes *iuc* e *iss* foram detectados no mesmo número de amostras (3/8). Segundo Jaben et al.<sup>32</sup> e Ngeleka et al.<sup>35</sup> a virulência das amostras de *E. coli* em infecções extra-intestinais depende da combinação de fatores de virulência, com particular destaque para os genótipos *iuc*+ *tsh*+ e *iuc*+ *tsh*+, *pap*+, considerados altamente virulentos. Esta combinação de genes foi detectada em duas amostras deste estudo (PSC4 e PSC54), pertencentes aos sorogrupos O23 e O54, respectivamente.

Os sorogrupos identificados neste estudo diferem dos sorogrupos identificados com maior freqüência (O2 e O78) nos quadros de colibacilose aviária em criações de aves comerciais no Brasil descritos por Menão et al.<sup>36</sup>; e dos sorogrupos identificados

em isolados enteropatogênicos para psitacídeos por Scremmer et al.<sup>29</sup> (EPEC O110, O63, O131 e O153).

Estudos epidemiológicos sobre os sorogrupos envolvidos nos casos de colibacilose em aves silvestres, bem como um conhecimento mais profundo sobre os fatores de virulência de amostras de *E. coli* isoladas de psitacídeos com diarreia e septicemia serão de

grande auxílio para a conservação destas espécies, além de auxiliarem no diagnóstico de aves doentes, evitando a exposição humana a amostras patogênicas de UPEC e EPEC.

## Agradecimentos

À FAPESP (processo - 05/57500-9), pelo suporte financeiro.

## Molecular characterization of virulence factors in *Escherichia coli* strains isolated from parrots with colibacillosis

### Abstract

A total of eight *Escherichia coli* isolates from psittacine birds were serogrouping and investigated for the virulence factors: pili associated with pyelonephritis (*pap*), S fimbriae (*sfa*), afimbrial adhesin (*afa*), capsule K1 (*neu*), curli fibers (*crf*, *csgA*), temperature-sensitive hemagglutinin (*tsh*), heat labile (LT) and heat stable (STa and STb) enterotoxins, Shiga-like toxins (Stx1 and Stx2), Cytotoxic necrotizing factor (*cnf1*), haemolysin (*hly*), aerobactin production (*iuc*) and serum resistance (*iss*). The results showed that the isolates belonged to six serogroups: O23; O54; O64; O76; O128 and O152. The found virulence genes were: *crf*<sup>+</sup> in all isolates, *pap*<sup>+</sup>, *iuc*<sup>+</sup> and *iss*<sup>+</sup> in three isolates; *tsh*<sup>+</sup> in two isolates. All strains were negative for genes *neu*, *csgA*, *sfa*, *afa*, *hly*, *cnf* and LT, STa, STb, Stx1, Stx2 toxins. Our findings suggested that some *E. coli* isolated from psittacine birds present some virulence factors of avian pathogenic *E. coli* (APEC) pathotype.

### Key words:

Parrots.  
*Escherichia coli*.  
Virulence factors.  
APEC.  
Colibacillosis.

### Referências

1 HOFFER, H. L. Diseases of the gastrointestinal tract. In: ALTMAN, R. B.; CLUBB, S. L.; DORESTEIN, G. M.; QUSENBERY, K. (Ed.). **Avian medicine and surgery**. Philadelphia: Saunders Company, 1997. p. 419-453.

2 STYLES, D. K.; FLAMMER, K. Congo red binding of *Escherichia coli* isolated from the cloacae of psittacine birds. **Avian Diseases**, v. 35, p. 46-48, 1991.

3 WILLARD, J. G. Common digestive tract disorders. In: SYMPOSIUM ON AVIAN MEDICINE, 1995. **Proceedings...** 1995. p. 40-52.

4 DORRESTEIN, G. M.; BUITELAAR, M. N.; VAN DER HAGE, M. H.; ZWART, P. Evaluation of a bacteriological and mycological examination of psittacine birds. **Avian Diseases**, v. 29, n. 4, p. 951-962, 1985.

5 GERLACH, H. Bacteria. In: RITCHIE, B. W.; HARRISON, G. J.; HARRISON, L. B. **Avian medicine: principles and application**. Florida: Wingers, 1994. p. 949- 983.

6 GODOY, S. N. **Patologia comparada de psitacídeos**

**mantidos em cativeiro no Estado de São Paulo**. 2001. 214 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

7 MATTES, B. R.; CONSIGLIO, S. A. S.; ALMEIDA, B. Z.; GUIDO, M. C.; ORSI, R. B.; SILVA, R. M.; COSTA, A.; FERREIRA, A. J. P.; KNÖBL, T. Influência da biossegurança na colonização intestinal por *Escherichia coli* em psitacídeos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, n. 1, p. 13-16, 2005.

8 SAIDENBERG, A. B.; KNÖBL, T. Colibacilose em aves ornamentais e silvestres: revisão. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, v. 8, p. 16-28, 2005.

9 HACKER, J.; BLUM-OEHLER, G.; MÜHL DORFER, I.; TSCHÄPE, H. Pathogenicity island of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. **Molecular Microbiology**, v. 23, p. 1089-1097, 1997.

10 KARIYAWASAM, S.; JOHNSON, T. J.; DEBROY, C.; NOLAN, L. K. Occurrence of pathogenicity island IAPEC-01 genes among *Escherichia coli* implicated in avian colibacillosis. **Avian Diseases**, v. 50, p. 405-410, 2006.

11 DHO-MOULIN, M.; FAIRBROTHER, J. M. Avian

- pathogenic *Escherichia coli* (APEC). **Veterinary Research**, v. 30, p. 299-316, 1999.
- 12 KNÖBL, T.; ROCHA, L. T.; ORSI, R. B.; PAIXÃO, R.; MORENO, A. M.; FERREIRA, A. J. P. Investigação molecular dos fatores de virulência de *Escherichia coli* isoladas de fezes de psitacídeos mantidos em cativeiro. In: CONGRESSO DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA VETERINÁRIOS DE ANIMAIS SELVAGENS – ABRAVAS, 15., Águas de São Pedro. 2006, **Anais... Águas de São Pedro: Associação Brasileira dos Veterinários de Animais Selvagens**, 2006.
- 13 MONROY, M. A.; KNÖBL, T.; BOTTINO, J. A.; FERREIRA, C. S.; FERREIRA, A. J. Virulence characteristics of *Escherichia coli* isolates obtained from broilers breeders with salpingitis. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 28, n. 1, p. 1-15, 2005.
- 14 KNÖBL, T.; BACCARO, M. R.; MORENO, A. M.; VIEIRA, M. A.; FERREIRA, C. S.; FERREIRA, A. J. Virulence properties of *Escherichia coli* isolated from ostriches with respiratory disease. **Veterinary Microbiology**, v. 2283, n. 1, p. 71-80, 2001.
- 15 GROSS, W. B. Colibacillosis. In: HOFSTAD, M. S.; CALNEK, B. W.; HELMBOD, C. F.; REID, W. M.; YODER, H. W. **Disease of poultry**. 3. ed. Ames, Iowa State: University Press, 1991. p. 138-144.
- 16 GUINÉE, P. A.; JANSEN, W. H.; WADSTRÖM, T.; SELLWOOD, R. *Escherichia coli* associated with neonatal diarrhea in piglets and calves. **Current Topics in Veterinary Animal and Science**, v. 13, p. 126–162, 1981.
- 17 YAMAMOTO, S.; TERAJ, A.; YURI, K.; KURAZONO, H.; TAKEDA, Y.; YOSHIDA, O. Detection of urovirulence factors in *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 12, p. 85-90, 1995.
- 18 SCHULTSZ, C.; POOL, G. J.; VAN KETEL, R.; WEVEK, D.; SPEELMAN, P.; DANKERT, J. Detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* in stool samples by using nonradioactively labeled oligonucleotide DNA probes and PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, p. 2393-2397, 1994.
- 19 OLSIVIK, O.; STROCKBINE, N. A. In: PERSING, D. H.; SMITH, T. F.; TENOVER, F.C.; WHITE, T. J. **Diagnostic molecular microbiology: principles and applications**. Washington: American Society for Microbiology, 1993. p. 271-276.
- 20 BLANCO, M.; BLANCO, J. E.; GONZALEZ, E. A.; MORA, A.; JANSEN, W.; GOMES, T. A. T.; ZERBINI, F.; YANO, T.; PESTANA DE CASTRO, A. F.; BLANCO, G. Genes coding for enterotoxins and verotoxins in porcine *Escherichia coli* strains belonging to different O:K:H serotypes: relationship with toxic phenotypes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, p. 2958-2963, 1997.
- 21 POLLARD, D. R.; JOHNSON, W. M.; LIOR, H.; TYLER, S. D.; ROZES, K. R. Rapid and specific detection of verotoxin genes in *Escherichia coli* by the polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, p. 540-545, 1990.
- 22 WOODWARD, M. J.; CARROLL, P. J.; WRAY, C. Detection of entero and verocytotoxin genes in *Escherichia coli* from diarrhea disease in animals using polymerase chain reaction. **Veterinary Microbiology**, v. 31, p. 251-261, 1992.
- 23 MAURER, J. J.; BROWN, T. P.; STEFFENS, W. L.; THAYER, S. G. The occurrence of ambient temperature-regulated adhesins, curli, and the temperature-sensitive hemagglutinin Tsh among avian *Escherichia coli*. **Avian Diseases**, v. 42, p. 106-118, 1998.
- 24 TSUKAMOTO, T. PCR method for detection of K1 antigen and serotypes of *Escherichia coli* isolated from extraintestinal infection. **Kansenshogaku Zashi**, v. 71, n. 2, p. 125-129, 1997.
- 25 HORNE, S. M.; PFAFF-MCDONOUGH, S. J.; GIDDINGS, C. W.; NOLAN, L. K. Cloning and sequencing of the *iss* gene from a virulent avian *Escherichia coli*. **Avian Diseases**, v. 44, p. 179-184, 2000.
- 26 BOOM, R.; SOL, C. J. A.; SALIMANS, M. M. M.; JANSEN, C. L.; WERTHEIM-VAN DILLEN, P. M. E.; VAN DER NOORDAA, J. Rapid and Simple Method for purification of Nucleic Acids. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, p. 495-503, 1990.
- 27 MANIATIS, T.; FRITSCH, E. F.; SAMBROOK, J. **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor, 1982.
- 28 PAKPINYO, S.; LEY, D. H.; BARNES, J. P.; VAILLANCOURT, J. P.; GUY, J. S. Prevalence of enteropathogenic *Escherichia coli* in naturally occurring cases of poult enteritis-mortality syndrome. **Avian Diseases**, v. 46, p. 360-369, 2002.
- 29 SCHREMMER, C.; LOHR, J. E.; WASTLHUBER, U.; KÖSTERS, J.; RAVELSHOFER, K.; STEINRÜCK, H.; WIELER, L. H. Enteropathogenic *Escherichia coli* in psittaciformes. **Avian Pathology**, v. 28, p. 349-354, 1999.
- 30 WASTLHUBER, U.; SPLEISS, C.; LOHR, J. E. Verotoxin production and adhesion genes of *E. coli* isolates from commercial poultry and psittacines: detection by PCR. **Tierarztl Prax Ausg G Grosstiere Nutztiere**, v. 26, n. 1, p. 49-52, 1998.
- 31 STATHOPOULOS, C.; PROVENCE, D. L.; CURTISS, R. Characterization of the avian pathogenic *Escherichia coli* hemagglutinin Tsh, a member of the immunoglobulin A protease-type family of autotransporters. **Infection and Immunity**, v. 67, p. 772-781, 1999.
- 32 JANBEN, T.; SCHWARZ, C.; PREIKSCHAT, P.; VOSS, M.; PHILIPP, H. C.; WIELER, L. H. Virulence-associated genes in avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from internal organs of poultry having

died from colibacillosis. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 291, p. 371-378, 2001.

33 POURBAKHSI, S. A.; DHO-MOULIN, M.; BRÉE, A.; DESAUTELS, C.; DOIZE, B. M.; FAIRBROTHER, J. M. 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.

34 PROVENCE, D. L.; CURTISS, R. Role of *crl* in avian pathogenic *Escherichia coli*: a knockout mutation of *crl* does not affect hemagglutination activity, fibronectin binding, or curli production. **Infection and Immunity**, v. 60, p. 4460-4467, 1992.

35 NGELEKA, M.; BRERETON, L.; BROWN, G.; FAIRBROTHER, J. M. Pathotypes of avian *Escherichia coli* as related to *tsh*-, *pap*-, *pil*-, and *iuc*-DNA sequences, and antibiotic sensitivity of isolates from internal tissues and the cloacae of broilers. **Avian Diseases**, v. 46, p. 143-152, 2002.

36 MENÃO, M. C.; FERREIRA, C. S. A.; CASTRO, A. G. M.; KNÖBL, T.; FERREIRA, A. J. P. Sorogrupos de *Escherichia coli* isolados de frangos de corte com doença respiratória crônica. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 65, n. 4, p. 15-17, 2002.