

PCR NA DETECÇÃO DE GENE *FEL A* DE *ESCHERICHIA COLI* EM FRANGOS DE CORTE CONDENADOS POR AEROSSACULITE PELA INSPEÇÃO SANITÁRIA FEDERAL

L.S. Machado, E.R. Nascimento, V.L.A. Pereira, D.O. Almeida, D.L.C. Abreu, R. Gouvêa

Universidade Federal Fluminense, Faculdade de Veterinária, Departamento de Saúde Coletiva Veterinária e Saúde Pública, Rua Dr. Vital Brazil Filho, 64, CEP 24230-340, Niterói, RJ, Brasil. E-mail: leandromachadovet@yahoo.com.br

RESUMO

A colibacilose é considerada uma das principais doenças da indústria avícola moderna, devido aos grandes prejuízos econômicos causados. A *Escherichia coli* contribui não só para a doença em si, levando à perda de peso das aves, bem como para o aumento da taxa de condenação de carcaças durante o abate e processamento. A detecção de fatores de virulência de cepas de *E. coli* do patotipo APEC colabora para a caracterização de sua patogenicidade e as técnicas de PCR têm sido muito úteis na pesquisa de genes que os codificam. Este estudo objetivou diagnosticar *E. coli* pela detecção do gene *Fel A* por PCR e relacionar a positividade para este agente com o baixo peso em frangos de corte provenientes de lotes condenados por aerossaculite. Foram estudados 40 lotes de frangos de corte abatidos em um matadouro avícola sob Inspeção Sanitária Federal, localizado no Estado do Rio Grande do Sul. Foram colhidos aleatoriamente 3 frangos e obtidos “pools” de três traqueias em cada um deles para PCR. O DNA foi extraído pelo método de fenol-clorofórmio e amplificado com pares de “primers” específicos para o gene *Fel A* de *E. coli*. Dos 40 lotes analisados pela PCR, 35% (14/40) foram positivos para o gene *Fel A*. A PCR foi eficaz para a detecção do gene *Fel A* em lotes de frangos de corte e houve relação entre a presença do gene *Fel A*, a queda de peso e aumento na taxa de aerossaculite.

PALAVRAS-CHAVE: Aves, colibacilose, fatores de virulência, fímbria F11, doença crônica respiratória.

ABSTRACT

PCR FOR THE DETECTION OF THE GENE *FEL A* OF *ESCHERICHIA COLI* IN BROILER CONDEMNED FOR AIRSACCULITIS BY THE BRAZILIAN FEDERAL SANITARY INSPECTION. Colibacillosis is considered one of the major diseases of the modern poultry industry, due to the significant losses it causes. *Escherichia coli* contributes not only to the disease itself, by causing weight loss of the birds, but also to the increase in carcasses condemnation during slaughter and processing. Detection of virulence factors in *E. coli* strains of the APEC pathotype contributes to the characterization and pathogenicity of this agent. PCR techniques have been very helpful in the search for genes that encode those virulence factors. This study aimed to detect the gene *Fel A* of *E. coli* by PCR and relate its positivity to low weight in broiler flocks with airsacculitis as diagnosed by the health inspection service. The study involved 40 flocks of broilers slaughtered in a single poultry slaughterhouse, under Federal Sanitary Inspection, located in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. Three broilers were randomly selected to obtain one “pool” of three tracheas for each PCR. DNA was extracted using phenol-chloroform and amplified using a pair of primers specific to gene *Fel A* of *E. coli*. Of the 40 flocks analyzed by PCR, 35% (14/40) were positive for the gene *Fel A*. PCR was an effective technique for the detection of gene *Fel A* in broiler flocks. There was a relationship between the presence of the gene *Fel A*, weight loss, and increase of the airsacculitis rate.

KEY WORDS: Avian, colibacillosis, virulence factors, fimbriae F11, chronic respiratory disease.

INTRODUÇÃO

A *Escherichia coli* é um componente normal da microbiota do trato intestinal dos animais e do homem, existindo de forma comensal ou patogênica. A adaptação ao hospedeiro e a patogenicidade de

alguns patótipos de *E. coli* é atribuída à aquisição horizontal de genes de virulência específicos por cepas não patogênicas (Dozois *et al.*, 2003).

A *E. coli* patogênica para aves (*Avian Pathogenic E. coli* - APEC) é responsável pela colibacilose e pertence ao grupo das *E. coli* patogênicas extrain-

testinais, estando associada a quadros de: colisepticemia, peritonite, pneumonia, pleuropneumonia, aerossaculite, pericardite, celulite, coligranuloma, DCR complicada, onfalite, salpingite, síndrome da cabeça inchada, panoftalmia, osteomielite, ooforite e sinovite (FERREIRA; KNOBL, 2009). Nas aves, a colibacilose inicia-se no epitélio traqueal, em contraste com a maioria das doenças causadas pela *E. coli* em humanos e outros mamíferos, afetados inicialmente no epitélio intestinal e urinário (VIDOTTO *et al.*, 1997) e é responsável por condenações parciais ou totais das carcaças devido a vários processos inflamatórios, entre eles a aerossaculite (BRASIL, 1998).

Além do aumento das condenações, aves com aerossaculite podem apresentar-se com menor peso em relação a aves sem aerossaculite. A desuniformidade dos lotes na linha de abate aumenta o risco de condenação de cortes e carcaças durante a evisceração e, conseqüentemente, o risco de contaminação das carcaças com patógenos do trato intestinal torna-se maior (RUSSEL, 2003).

As cepas de APEC possuem fatores de virulência específicos e são capazes de causar a colibacilose aviária (CARDOSO *et al.*, 2002; DELICATO *et al.*, 2003). Destacam-se como fatores essenciais para a patogenicidade das estirpes de *E. coli* a ação das adesinas, a produção de metabólitos bacterianos, fatores de resistência sérica, a ação de hemolisinas e aerobactina e a produção de citotoxinas (BRITO *et al.*, 2003). Segundo GIBBS *et al.* (2003) e ROCHA *et al.* (2008), a patogenicidade das estirpes está relacionada com o impacto cumulativo de vários fatores de virulência. SKYBERG *et al.* (2003), em um estudo complementar sobre a letalidade embrionária de cepas de *E. coli*, demonstraram que apenas as cepas que apresentaram mais de dois fatores de virulência causavam a mortalidade em um número maior de embriões, mesmo que isolados de aves saudáveis.

Um dos genes de virulência de maior relevância da *E. coli* desempenha o papel de adesão representados pelas fímbrias, responsáveis pela aderência da bactéria à mucosa em diferentes estágios da doença (KUHNERT *et al.*, 2000). Segundo GYIMAH; PANIGRAHY (1988) e EISENSTEIN (1987), os fatores de aderência permitem a interação entre as bactérias e as células do hospedeiro. Sua especificidade para receptores das células do hospedeiro capacita as bactérias à superação dos mecanismos fisiológicos de defesa, permitindo a colonização e multiplicação com ou sem invasão sistêmica subsequente. Os genes de adesão comumente identificados em estirpes de *E. coli* isoladas de aves são a fímbria P (*pap C*) e fímbria F11 (*Fel A*) (LA RAGIONE; WOODWARD, 2002; ROCHA *et al.*, 2008). POURBAKHSI *et al.* (1997) destacaram que a fímbria P pode estar envolvida na colonização de órgãos, com subsequente septicemia, entretanto, de acordo com DOZOIS *et al.* (1995), as traqueias de

aves não apresentam receptores para a fímbria P. Em outro estudo do mesmo autor, 12 em 13 cepas de *E. coli* aviárias isoladas de aves com colisepticemia exibiram a sequência gênica relacionada com gene *Fel A* codificada na fímbria F11 (DOZOIS *et al.*, 1996).

Este estudo objetivou detectar o gene *Fel A* pela PCR e relacionar a positividade para este gene com o baixo peso em frangos de corte provenientes de lotes com condenação por aerossaculite na Inspeção Sanitária Federal.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram colhidas aleatoriamente, na área de evisceração, fragmentos de traqueias de 3 aves de cada um dos 40 lotes com diagnóstico de aerossaculite. Os lotes variaram de 5.728 a 14.535 correspondendo a um total de 429.886 de frangos de corte do mesmo estabelecimento e abatidos num matadouro avícola sob Inspeção Sanitária Federal localizada no Estado do Rio Grande do Sul. O peso médio dos lotes de frangos e o percentual de condenação por aerossaculite foram obtidos junto à Inspeção Sanitária.

Os "pools" de traqueias de cada lote foram acondicionados em placas de Petri esterilizadas. As traqueias foram abertas com uma tesoura de ponta reta e em seguida seu conteúdo foi colhido com o auxílio de um suabe. Depois foi feita a escarificação usando-se lâminas de bisturi. Os "pools" de suabe e de escarificado foram acondicionados separadamente em tubos de rosca contendo 2,0 mL de "Phosphated Buffered Saline" (PBS) pH 7,4. De cada tubo foi retirado uma alíquota de 1,0 mL e colocado em tubo graduado de 1,5 mL para extração do DNA.

O método de extração por fenol/clorofórmio, adaptado de SAMBROOK; RUSSELL (2001a), foi realizado diretamente dos "pools" das amostras, sem a realização de pré-enriquecimento. Foi utilizado o par de "primers" específico para o gene *Fel A* de *E. coli* que produzem "amplicons" de 270 pares de base (pb), conforme ROCHA *et al.* (2008). Como controle positivo utilizou-se amostra de *E. coli* fornecida pelo Dr Sílvio Luís da Silveira Rocha, do Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. A reação de PCR foi realizada nas seguintes condições: 12,75 µL de água ultrapura (Milli-Q), 2,5 µL de Tampão PCR 10X, 1,25 µL de MgCl₂ (25 mM), 1,25 µL de dNTP mix (0,25 mM de cada), 1 µL (100 pmol) de cada "primer", 0,25 µL (2,5 U/mL) de Taq Polimerase e 5 µL do DNA extraído, obtendo-se um volume final de 100 µL.

Após a reação de amplificação, homogeneizaram-se 10 µL de cada amostra com 2 µL de tampão de arrasto, aplicou-se em gel de agarose a 1,5%, sub-

merso em Tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) 0,5X e por fim submeteu-se à eletroforese em condições baseadas em SAMBROOK; RUSSELL (2001b). Após a corrida eletroforética, corou-se o gel em brometo de etídio e procedeu-se à visualização dos “amplicons” sob luz ultravioleta em transiluminador.

Para verificar se a presença de aerossaculite e o baixo peso dos lotes de frango ao abate eram preditivos para o gene *Fel A* pela PCR foram feitas Análises de Regressão Logística Simples. Para a relação de aerossaculite com o baixo peso dos lotes foi feita Regressão Linear Simples. A relação entre baixo peso dos lotes e a presença do gene *Fel A* também foi analisada pelo teste t-Student. A influência do tipo de processamento do espécime clínico (suabe, escarificado ou suabe + escarificado) sobre o resultado da PCR foi analisada pelo teste de Qui-quadrado (THRUSFIELD, 2003).

RESULTADOS

Em todos os lotes estudados observou-se uma taxa de condenação por aerossaculite, variando de 0, 0176 a 0, 9435%. Houve diferença significativa entre os lotes positivos e negativos para o gene *Fel A* pela análise de t-Student em relação ao baixo peso dos lotes de frangos ($p < 0,05$) (Tabela 1).

Dos 40 lotes de frangos de corte analisados pela PCR, 35% (14/40) foram positivos para o gene *Fel A*, pelo aparecimento de “amplicons” de 270 pares de base (pb) (Figs. 1 e 2).

Pela análise do teste de Qui-Quadrado, comparando-se a detecção do gene *Fel A* em material colhido por suabe e escarificado de traqueia, obteve-se um $p > 0,05$, não havendo, portanto, diferença significativa entre os resultados para suabe, escarificado e suabe + escarificado (Tabela 2).

Tabela 1 - Variação da frequência de condenações por aerossaculite (%) e do peso médio (kg) dos lotes dos frangos de corte positivos ou negativos na PCR para o gene *Fel A* de *Escherichia coli* abatidos sob Inspeção Sanitária Federal.

Valores descritivos	Variação da frequência de condenações por aerossaculite (%)		Peso médio dos lotes dos frangos de corte (kg)*	
	Positivo (%)	Negativo (%)	Positivo	Negativo
Mínimo	0,0176	0,0418	2,60	2,58
Máximo	0,2796	0,9435	2,96	3,26
Média	0,1486	0,4927	2,82**	2,94***

*Teste t-Student ($p > 0,05$).

**desvio padrão 0,0171.

*** desvio padrão 0,1729.

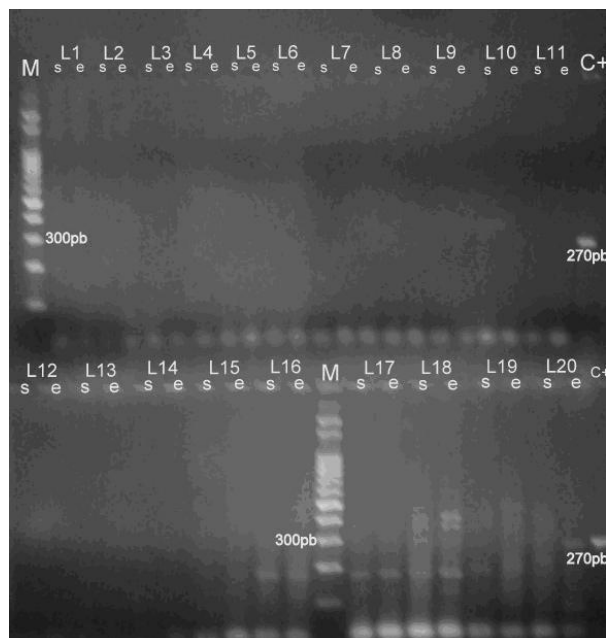


Fig. 1 - Gel de agarose com o lote L20 positivo e lotes L1, L2, L3, L4, L5, L6, L7, L8, L9, L10, L11, L12, L13, L14, L15, L16, L17, L18, L19 negativos na PCR para o gene *fel A*. M - Marcador de DNA de 100pb, L - lote; e - escarificado; s - suabe; C+ - controle positivo.

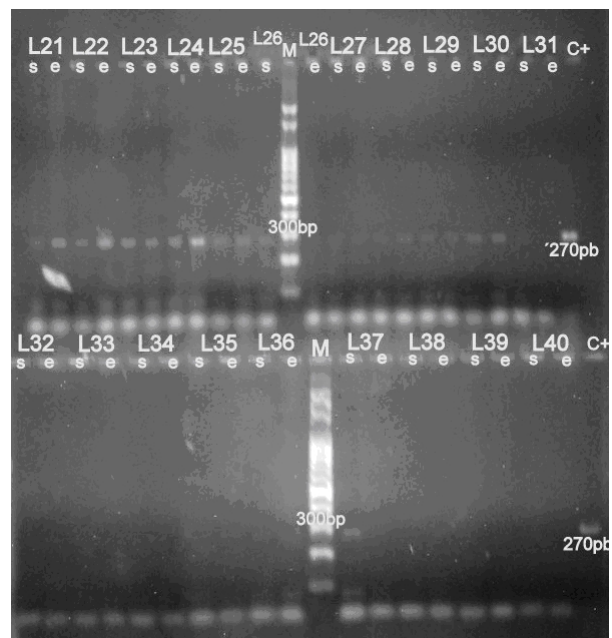


Fig. 2 - Gel de agarose com os lotes L21, L22, L23, L24, L25, L26, L27, L28, L29, L30, L31, L36, L37 positivos e L32, L33, L34, L35, L38, L39, L40 negativos na PCR para o gene *fel A*. M Marcador de DNA de 100pb, L - lote; e - escarificado; s - suabe; C+ - controle positivo.

Da relação entre positividade na PCR para o gene *Fel A* de *E. coli* com aerossaculite obteve-se pela Regressão Logística Simples a equação $\text{Logit } P_i = -0,1 - (2,458 \times \text{aerossaculite})$ com *odds ratio* não significativo ($p > 0,05$), significando que a ausência do gene *Fel A* está relacionada com a queda na taxa de aerossaculite. Porém, pelo teste t-Student, a relação de aerossaculite com baixo peso dos frangos foi significativa ($p < 0,05$) (Tabela 1). Por outro lado, a presença do gene *Fel A* esteve relacionada com a queda de peso dos frangos, obtendo-se a equação $\text{Logit } P_i = 17,5747 - (6,34 \times \text{peso})$ com *odds ratio* igual a 0,0018, mas significativo ($p < 0,05$). Pela Regressão Linear Simples a equação $Y = 1,3571 - 0,3899 X$ evidenciou que aerossaculite está relacionada com a queda de peso ($p < 0,05$) e, pelo coeficiente de determinação (R^2) da equação, pode-se concluir que 9% dos problemas de peso são justificados pela presença dessa lesão.

Comparando-se a detecção do gene *Fel A* de *E. coli* em relação ao processamento por suabe ou escarificação da traqueia, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) pelo teste de Qui-quadrado (Tabela 2).

Tabela 2 - Positivos e negativos para o gene *Fel A* de *E. coli* por suabe, escarificado e ambos métodos como técnicas de processamento.

Técnicas de processamento	PCR gene <i>Fel A</i> de <i>E. coli</i>		
	Positivo	Negativo	Total
Suabe	13	27	40
Escarificado	11	29	40
Suabe + escarificado	10	30	40

Qui-quadrado, intervalo de confiança (IC) = 95%, ($p > 0,05$).

DISCUSSÃO

A detecção do gene *Fel A* de *E. coli*, nas amostras provenientes de traqueia de frangos de corte no presente estudo, justifica-se, pois ele é um gene de adesão que permite a interação deste agente de forma específica às células do epitélio traqueal (DOZOIS *et al.*, 1995; DOZOIS *et al.*, 1996). Em estudo feito por ROCHA *et al.* (2008), aves com sintomatologia respiratória e lesões compatíveis com colibacilose apresentaram um maior percentual do gene de adesão *Fel A* (24/61) em relação ao gene *Pap C* (15/61), este último envolvido na colonização de órgãos sistêmicos (POURBAKHSI *et al.*, 1997). A ausência do gene *Fel A* de *E. coli* esteve associada ao decréscimo de aerossaculite, porém, com probabilidade pequena e não significativa, o que pode ser explicado pela falta de ação concomitante dos outros fatores de virulência de *E. coli*, de vez que a ação da referida bactéria depende do impacto cumulativo de vários fatores de virulência (GIBBS *et al.*, 2003; ROCHA *et al.*, 2008; SKYBERG *et al.*, 2003).

A presença de aerossaculite, *per si*, é fato que merece ser considerado de grande importância, pois, além das perdas determinadas pela condenação de carcaças, em concordância com os resultados deste estudo, pode comprometer a saúde das aves e do consumidor de produtos avícolas (BRASIL, 1998). Além do aumento das condenações, aves com aerossaculite podem apresentar-se com menor peso em relação a aves sem aerossaculite conforme obtido neste estudo. A desuniformidade na linha de abate aumenta o risco de condenação das carcaças devido à contaminação por patógenos do trato intestinal (RUSSEL, 2003).

Como não houve significância da influência do tipo de processamento de espécime clínico para o diagnóstico de gene *Fel A* de *E. coli* por PCR, pode-se optar pelo método mais simples, ou seja, a utilização de suabe.

CONCLUSÃO

A detecção do gene *Fel A* de *E. coli* em amostras de traqueia de frangos teve relação com o aumento da taxa de condenação por aerossaculite e com o baixo peso dos lotes de frangos ao abate. Houve relação do aumento da taxa de aerossaculite com o baixo peso. A PCR foi capaz de detectar o gene *Fel A* de *E. coli* em lotes de frangos de corte, não sendo o resultado influenciado pelo processamento por suabe, escarificado ou ambos.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação de Higiene Veterinária e Produtos de Origem Animal da Universidade Federal Fluminense. Aos colegas do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Pública, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, pela valiosa ajuda deste trabalho. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

REFERÊNCIAS

- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº210, de 10 de nov. de 1998. Regulamento Técnico da Inspeção Tecnológica e Higienico-sanitária de carne de aves do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Diário Oficial República Federativa do Brasil, Brasília/DF, 11 de novembro. 1998. Seção 1.
- BRITO, B.G.; TAGLIARI, K.C.; BERBEL, M.M.; FREIRE, R.L. Produção de enterotoxina termoestável, hemolisi-

- nas, colicinas e fatores de colonização em amostras de *Escherichia coli* isoladas de leitões com diarreia no sudoeste do Paraná. *Scientia Agrária*, v.4, n.1, p.15-20, 2003.
- CARDOSO, A.L.S.P.; TESSARI, E.N.C.; CASTRO, A.G.M.; PULICI, S.C.P.; ZANATTA, G.F.. Prevalência de resistência em amostras de *Escherichia coli* de origem aviária. In: CONFERÊNCIA APINCO 2002 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2002, Campinas, SP. *Resumos*. Campinas: FACTA, 2002. p.129.
- DELICATO, E.R.; BRITO, B.G.; GAZIRI, L.C.J.; VIDOTTO, M.C. Virulence associated genes in *Escherichia coli* isolates from poultry with colibacillosis. *Veterinary Microbiology*, v.94, p.97-103, 2003.
- DOZOIS, C.M., POURBAKHS, S.A.; FAIRBROTHER, J.M. Expression of P and type 1 (F1) fimbriae in pathogenic *Escherichia coli* from poultry. *Veterinary Microbiology*, v.145, p.297-309, 1995.
- DOZOIS, C.M.; HAREL, J.; FAIRBROTHER, J.M. P-fimbriae-producing septicaemic *Escherichia coli* from poultry possess febrile gene clusters whereas pap hybridizing P-fimbriae negative strains have partial or divergent P fimbrial gene clusters. *Microbiology*, v.142, p.2759-2766, 1996.
- DOZOIS, C.M.; DAIGLE, F.; CURTISS III, R. Identification of pathogen-specific and conserved genes expressed in vivo by an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.100, n.1, p.247-252, 2003.
- EISENSTEIN, B.I. Fimbriae. In: NEIDHARDT, F.C. (Ed.). *Escherichia coli and Salmonella Typhimurium: cellular and molecular biology*. Washington: American Society for Microbiology, 1987. v.1, p.84-90.
- FERREIRA, A.J.P.; KNOBL, T. Colibacilose. In: BERCHIERI JUNIOR, A.; SILVA, E.N.; DI FÁBIO, J.; SESTI, L.; ZUANAZE, M.A.F. (Ed.). *Doenças das aves*. 2.ed. Campinas. Fundação APINCO de Ciência e tecnologia Avícolas, 2009. cap. 4.2, p.457-471.
- GIBBS, P.S.; MAURER, J.J.; NOLAN, L.K.; WOOLEY, E. Prediction of chicken embryo lethality with the avian *Escherichia coli* traits complement resistance, colicin V production, and presence of increased serum survival gene cluster (*iss*). *Avian Diseases*, v.47, n.2, p.370-379, 2003.
- GYIMAH, J.E.; PANIGRAHY, B. Adhesin-receptor Interactions Mediating the Attachment of Pathogenic *Escherichia coli* to Chicken Tracheal Epithelium. *Avian Diseases*, v.32, n.1, p.74-78, 1988.
- KUHNERT, P.; BOERLIN, P.; FREY, J. Target genes for virulence assessment of *Escherichia coli* isolates from water, food and the environment. *FEMS Microbiology Reviews*, v.24, n.1, p.107-117, 2000.
- LA RAGIONE, R.M.; WOODWARD, M.J. Virulence factors of *Escherichia coli* serotypes associated with avian colisepticaemia. *Research in Veterinary Science*, v.73, n.1, p.27-35, 2002.
- POURBAKHS, S.A.; DHO-MOULIN, M.; BREE, A.; DESAUTELS, C.; MARTINEAU-DOIZE, B.; FAIRBROTHER, J.M. Localization of the in vivo expression of P and F1 fimbriae in chickens experimentally inoculated with pathogenic *E. coli*. *Microbial Pathogenesis*, v.22, p.331-341, 1997.
- ROCHA, A.C.G.P.; ROCHA, S.L.S.; LIMA-ROSA, C.A.V.; SOUZA, G.F.; MORAES, H.L.S.; SALLE, F.O.; MORAES, L.B.; SALLE, C.T.P. Genes associated with pathogenicity of avian *Escherichia coli* (APEC) isolated from respiratory cases of poultry. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.28, n.3, p.183-186, 2008.
- RUSSEL, S.M. The effect of airsacculitis on bird weights, uniformity, fecal contamination, processing errors, and populations of *Campylobacter* spp. and *Escherichia coli*. *Poultry Science*, v.82, n.8, p.1326-1331, 2003.
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. In: _____. Preparation and analysis of eukaryotic genomic DNA. 3.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001a. v.1, Cap.6, p. 6.4-6.11.
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. In: _____. Gel electrophoresis of DNA and Pulsed-fields Agarose Gel Electrophoresis. 3.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001b. v.1, Cap.5, p. 5.1-5.17.
- SKYBERG, J.A.; HORNE, S.M.; GIDDINGS, C.W.; WOOLEY, R.E.; GIBBS, P.S.; NOLAN, L. Characterizing avian *Escherichia coli* isolates with multiplex polymerase chain reaction. *Avian Diseases*, v.47, n.4, p.1441-1447, 2003.
- THRUSFIELD, M. *Epidemiologia veterinária*. 2.ed. São Paulo: Roca, 2003. 556p.
- VIDOTTO, M.C.; NAVARRO, H.R.; GAZIRI, L.C.J. Adherence pili of pathogenic strains of avian *Escherichia coli*. *Veterinary Microbiology*, v.59, n.1, p.79-87, 1997.

Recebido em 12/12/11

Aceito em 16/4/13