



UNIVERSIDADE
ESTADUAL de LONDRINA

LUÍS EDUARDO DE SOUZA GAZAL

***ESCHERICHIA COLI* PATOGÊNICA EXTRAIESTINAL
(EXPEC) EM ADUBO ORGÂNICO DE ORIGEM AVIÁRIA**

Londrina
2015

LUÍS EDUARDO DE SOUZA GAZAL

***ESCHERICHIA COLI* PATOGÊNICA EXTRAINTESTINAL
(EXPEC) EM ADUBO ORGÂNICO DE ORIGEM AVIÁRIA**

Defesa da dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Gerson Nakazato

Londrina
2015

Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina.

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

G289e Gazal, Luís Eduardo de Souza.

Escherichia coli patogênica extraintestinal (ExPEC) em adubo orgânico de origem aviária / Luís Eduardo de Souza Gazal. – Londrina, 2015.
55 f. : il.

Orientador: Gerson Nakazato.

Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2015.

Inclui bibliografia.

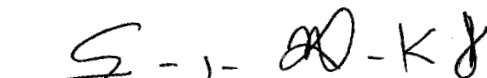
1. *Escherichia coli* – Teses. 2. Microorganismos patogênicos – Teses. 3. Virulência (Microbiologia) – Teses. 4. Adubos compostos – Teses. I. Nakazato, Gerson. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. III. Título.

LUÍS EDUARDO DE SOUZA GAZAL

**ESCHERICHIA COLI PATOGÊNICA EXTRAINTESTINAL (EXPEC) EM
ADUBO ORGÂNICO DE ORIGEM AVIÁRIA**

Defesa da dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

BANCA EXAMINADORA



Orientador: Prof. Dr. Gerson Nakazato
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof.^a Dr.^a. Jacinta Sanchez Pelayo
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Tomomasa Yano
Universidade Estadual de Campinas -
UNICAMP

Londrina, 13 de março de 2015.

“ Nós não somos o que gostaríamos de ser. Nós não somos o que ainda iremos ser. Mas, graças a Deus, não somos mais quem nós éramos”.

(Martin Luther King Jr.)

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, por toda força, superação e pelas pessoas que colocou em meu caminho, que me ajudaram partilhando experiências e conhecimentos, fundamentais para que este trabalho fosse realizado.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Gerson Nakazato, pela confiança depositada em mim, por sua paciência, por seus conhecimentos e conselhos transmitidos durante o mestrado. Agradeço por sua dedicação, pela amizade e pelo exemplo que é dentro e fora do laboratório, meu muito obrigado.

À Prof. Dr^a. Renata Kobayashi, também pela confiança, por toda atenção, dedicação e carinho que tem conosco dentro do laboratório, pelos conselhos e experiências transmitidos.

À Prof. Dr^a Jacinta Sanchez Pelayo, por ter participado em todas as bancas examinadoras, pelo apoio, pelas sugestões e críticas feitas no trabalho e pela amizade.

Ao Prof. Dr. Tomomasa Yano, por ter participado da banca examinadora da dissertação, pelas críticas e sugestões no trabalho.

Ao Prof. Dr. Luciano Panagio, por ter participado da banca de defesa do plano e por sua amizade.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, pelos conhecimentos transmitidos contribuindo para minha formação acadêmica.

Aos amigos de laboratório Juan Puño-Sarmiento e Leonardo Medeiros, por toda ajuda nos experimentos práticos, por toda amizade e companheirismo durante esse período.

A todos os amigos do NIP 3, que me receberam de braços abertos no laboratório, compartilharam experiências e conhecimento, e por todo carinho. Agradeço por todos os momentos que passamos no laboratório e por toda a amizade.

A todos do laboratório de virologia, por contribuírem para a realização de alguns experimentos.

Aos amigos do mestrado, por todo apoio e amizade, durante o trabalho e as disciplinas.

Aos amigos da Universidade Estadual do Norte do Paraná, por todo apoio e incentivo durante o trabalho e pela amizade.

Aos meus pais, irmãs e sobrinhas, que sempre me incentivaram, me deram forças e me apoiaram nesta jornada. Agradeço por toda a compreensão e carinho que tiveram comigo.

À minha namorada, Caroline, que esteve ao meu lado durante todo o mestrado, apoiando e incentivando com muito amor e carinho. Obrigado por toda ajuda e compreensão.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida, sem a qual não teria sido possível a minha dedicação total ao presente trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) , que possibilitou a execução deste trabalho.

Àqueles que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho.

GAZAL, Luís Eduardo de Souza. ***Escherichia coli* Patogênica Extraintestinal (ExPEC) em adubo orgânico de origem aviária**. 2015. 55f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

RESUMO

A cama de frango é um resíduo gerado na produção avícola e comumente utilizado na agricultura como adubo orgânico. Entretanto, a cama de frango deve passar por um processo de compostagem para eliminar possíveis microrganismos patogênicos, como *Escherichia coli*. Neste estudo, foi analisada a presença de fatores de virulência, ilhas de patogenicidade (PAI) e grupos filogenéticos em 64 isolados de *E. coli* de adubo orgânico de origem aviária, coletadas na região de Londrina. Os fatores de virulência foram determinados utilizando a técnica da Reação em Cadeia da Polimerase. Os isolados foram testados para a formação de biofilme, adesão em células HEp-2 e resistência aos antimicrobianos. Os genes *fimH* (89%) e *ecpA* (81.2%) foram os fatores de virulência mais encontrados entre os isolados. A pesquisa das PAIs entre os isolados, mostrou que a PAI IICFT073 (51.5%) foi a mais encontrada. A distribuição dos nossos isolados nos grupos filogenéticos descritos por Clermont, mostrou que, o grupo A (59.3%) e o grupo B1 (34.3%) foram os mais predominantes. Cinquenta e oito isolados apresentaram aderência em células HEp-2, sendo predominante o padrão de adesão agregativa. A maioria dos isolados (75%) não formaram biofilme. Entre os 64 isolados, 32 (50%) foram resistentes a pelo menos 1 antimicrobiano. Neste estudo mostramos que o adubo orgânico de origem aviária contém cepas de *E. coli* abrigando fatores de virulência e resistência aos antimicrobianos o que caracteriza um problema de segurança alimentar.

Palavras-chave: *Escherichia coli*. Adubo orgânico. Compostagem. Fatores de virulência.

GAZAL, Luís Eduardo de Souza. **Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) from avian organic fertilizer**. 2015. 55p. Dissertation (Microbiology Master) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

ABSTRACT

Poultry litter is a waste generated in poultry production and commonly used in agriculture as organic fertilizer. However, the poultry litter must go through a composting process to eliminate potential pathogens, such as *Escherichia coli*. In this study, was analyzed the presence of virulence factors, pathogenicity islands (PAI) and phylogenetic groups in 64 *E. coli* isolates from avian organic fertilizer, collected in Londrina region. The virulence factors were determined using the technique of Polymerase Chain Reaction. The isolates were tested for biofilm formation, adhesion to HEp-2 cells and antimicrobial resistance. In the study, *fimH* (89%) and *ecpA* (81.2%) genes were most frequent virulence factors among isolates. The research of PAIs among the isolates showed that PAI IICFT073 (51.5%) was the most found. The distribution of ours isolates in phylogenetic groups described by Clermont, showed that group A (59.3%) and group B1 (34.3%) were the most predominant. Sixty isolates presented adhesion to HEp-2 cells, and the predominant adherence pattern was the aggregative. The majority of isolates (75%) did not form biofilms. Among the 64 isolates, 32 (50%) were resistant to at least one antimicrobial. In our study, we show that the avian organic fertilizer contain *E. coli* strains harboring virulence factors and antimicrobial resistance, featuring a zoonotic potential risk.

Keywords: *Escherichia coli*. Organic fertilizer. Composting. Virulence factors.

SUMÁRIO

1.0	INTRODUÇÃO	9
2.0	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
2.1	Avicultura Brasileira	11
2.2	Cama de Frango	12
2.3	Adubo Orgânico de Origem Aviária	13
2.4	<i>Escherichia coli</i>	14
2.5	<i>E. coli</i> Patogênica Extraintestinal (ExPEC).....	15
2.6	Fatores de Virulência em ExPEC	17
2.6.1	<i>Adesinas</i>	18
2.6.2	<i>Sistemas de aquisição de ferro</i>	19
2.6.3	<i>Toxinas e Proteases</i>	20
2.6.4	<i>Resistência ao soro</i>	21
2.6.5	<i>Ilhas de Patogenicidade (PAI)</i>	22
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24
	ExPEC virulence factors in <i>Escherichia coli</i> isolates from avian organic fertilizer.....	33
	ANEXOS	52
3.0	CONCLUSÕES	55

1.0 INTRODUÇÃO

Uma das atividades mais importantes no setor do agronegócio no Brasil é a produção animal (REGITANO; LEAL, 2010). Atualmente, o Brasil é o terceiro maior produtor de carne de frango no mundo, atrás apenas da Estados Unidos e China (UBABEF, 2014). A evolução e a expansão avícola industrial, no início do século XXI, estão relacionadas principalmente com as demandas comerciais e produtivas, além das várias alterações no processo produtivo por conta dos avanços tecnológicos (BELUSSO; HESPANHOL, 2010).

A avicultura tornou-se importante para o país, pois fomenta a indústria de rações, produção de milho e soja, proporcionando à população, alimentos mais baratos e de qualidade, além de gerar mais empregos no campo e na indústria (GOMES; GOMES, 2008).

Entretanto, quanto maior a produção avícola, maior a produção de resíduos, entre eles a cama de frango. A cama de frango, é composta por restos de rações, penas, esterco aviário e pelo material que é utilizado sobre o piso do galpão (palha, maravalha ou cepilho de madeira) (HAHN, 2004).

A utilização da cama de frango na produção agrícola é uma forma sustentável de aproveitar este tipo de material (CORRÊA; MIELE, 2011). Mas para que a cama de frango seja utilizada como fertilizante, a mesma deve ser submetida a um processo de decomposição, que em determinadas condições, transforma a matéria orgânica em inorgânica, preservando a alta qualidade como adubo e reduzindo o número de microrganismos patogênicos, o que reflete em impactos positivos ao meio ambiente (HAHN, 2004).

Entre os microrganismos presentes no composto final da compostagem da cama de frango, destacamos a bactéria *Escherichia coli* (MILLER et al., 2013). Em humanos, algumas cepas de *E. coli* podem causar doenças gastrointestinais, enquanto outras, podem causar doenças em locais fora do intestino ou extraintestinais, como infecções urinárias ou sistêmicas (RUSSO; JOHNSON, 2000). *E. coli* também pode causar doenças extraintestinais em aves e são denominadas como "*E. coli* Patogênica para Aves" (APEC) (DHO-MOULIN; FAIRBROTHER, 1999).

Existe a hipótese que cepas de APEC também podem ter um papel na doença humana, devido à presença de semelhanças filogenéticas e compartilhamento de genes de virulência (BÉLANGER et al., 2011).

Dessa forma, o estudo teve como principal objetivo identificar e caracterizar amostras de *E. coli* Patogênica Extraintestinais (ExPEC) isoladas de adubo orgânico de origem aviária como possível fonte de infecção para humanos.

2.0 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Avicultura Brasileira

No final da década de 50, a avicultura brasileira era uma atividade de subsistência, sem recursos para o desenvolvimento ou bases empresariais, porém na década de 60 se iniciaram as importações de linhagens híbridas de frangos dos Estados Unidos, que eram mais resistentes e produtivas, e gradativamente os padrões de manejo foram se alterando (VIEIRA; DIAS, 2005). Logo mais tarde, com maiores investimentos, foi implantado o melhoramento genético das aves, vacinas contra as doenças foram desenvolvidas e inovações tecnológicas introduzidas (BELUSSO; HESPANHOL, 2010; TAVARES; RIBEIRO, 2007). Na década de 70, as indústrias avícolas se modernizaram, graças à política agrícola de crédito subsidiado e a instalação de frigoríficos, além das articulações entre grupos nacionais e empresas estrangeiras produtoras de linhagens (RIZZI, 1993).

O consumo médio *per capita*/ano de carne de frango no Brasil, em 2012, foi de 45 quilogramas por habitante/ano (UBABEF, 2014). Em 2011 o Brasil produziu 13,05 milhões de toneladas de carne de frango, conferindo ao país a terceira colocação no ranking mundial de produção avícola (UBABEF, 2013).

Dentre os setores agropecuários, a avicultura é o setor que mais investiu na intensificação de sua produção, com o intuito de encontrar resultados para os principais objetivos, como a produção em menor tempo e baixos custos (COSTA, 2002).

Segundo o relatório anual da UBABEF (2014), em 2013, o estado do Paraná representou 29,35% da produção de todo o país, conferindo o primeiro lugar na produção nacional. Dados do Sindicato das Indústrias de Produtos Avícolas do Estado do Paraná (SINDIAVIPAR) revelam que foram abatidos 1.250.123.609 frangos no estado, em 2014 (SINDIAVIPAR, 2014).

2.2 Cama de Frango

A indústria avícola brasileira cresce a cada ano, e a medida que a produção aumenta, consideráveis quantidades de resíduos são gerados, o que leva a necessidade de se pensar em estratégias de manejo e destino desses resíduos, possibilitando sua reutilização, além de diminuir possíveis impactos ao meio ambiente (VIEIRA, 2011).

Os resíduos gerados pela produção, como fezes e penas das aves, os restos de rações e o material absorvente usado sobre o piso do aviário, formam a "cama de frango" ou a "cama aviária", que pode ser reaproveitada no lote seguinte ou pode ser retirada (HAHN, 2004). A cama aviária tem por função evitar o contato direto da ave com o piso, evita oscilações de temperatura, e serve de substrato para absorção dos resíduos produzidos pelas aves (urina e fezes), bem como a incorporação de penas e restos de alimentos (GOMES; GOMES, 2008; VIEIRA, 2011).

Considerando os dados obtidos por Santos, Junior e Sakomura (2005), onde em média são produzidos 1,75 Kg de cama por ave, e que somente o estado do Paraná, abateu em 2014 cerca de 1.250.123.609 cabeças de frango (SINDIAVIPAR, 2014), estima-se que foram gerados aproximadamente 2.187.716.315,25 milhões de toneladas de cama de frango.

O principal destino da cama de frango é sua utilização na agricultura como fertilizante, porém existem outras aplicações como: a reutilização nos lotes subsequentes da produção (ÁVILA et al, 2007) e na produção de biogás (PALHARES, 2004).

A cama de frango foi muito utilizada na alimentação de bovinos, bem como na adubação das pastagens no Brasil (DUTRA; DÖBEREINER; SOUZA, 2005). Entretanto, em 2001, foi vetada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, sob a Instrução Normativa N° 15, de 17 de julho de 2001, a comercialização, produção e utilização da cama de aviário para estes fins (BRASIL, 2001).

Entre os patógenos encontrados na cama de frango, que podem ser um risco para a saúde humana e de outros animais, podemos citar: o vírus da doença de New Castle, *Chlamydia*, oocistos de *Eimeria*, *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*,

Listeria monocytogenes, *Mycobacterium avium*, *Clostridium botulinum*, *Salmonella enterica* e *E. coli* (BHATTACHARYA; TAYLOR, 1975; DUTRA; DÖBEREINER; SOUZA, 2005; HAHN et al., 2012).

2.3 Adubo Orgânico de Origem Aviária

No Brasil, a Instrução Normativa nº 07 de 17 de maio de 1999, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 1999), dispõe que o adubo orgânico de origem animal pode ser utilizado desde que este esteja livre de contaminantes e de substâncias que sejam tóxicas, porém não detalha como o processo para tal eliminação dos contaminantes deve ser feita. A comercialização da cama de aviário como fertilizante deve seguir o proposto pelo MAPA no Decreto nº 4954/04 e na Instrução Normativa nº15/05.

Uma prática comum observada nas propriedades que possuem frangos de corte, é o amontoamento da cama aviária, ao lado dos próprios aviários, coberta por uma lona de poliestireno. Ávila e colaboradores (2007) sugerem que a cama deve ser retirada do aviário, amontoadada a uma altura de 1,50 m, recobertas com uma lona de plástico por um período de 30 a 45 dias, sendo umedecida caso esteja muito seca. A compostagem implica na redução do volume dos resíduos, destrói sementes de plantas daninhas além de microrganismos patogênicos (BERNAL; ALBURQUERQUE; MORA, 2009).

A compostagem é dependente de vários fatores, que podem acelerar ou retardar o processo, entre eles destacamos: a umidade, o tamanho das partículas, a concentração de nutrientes, e principalmente a temperatura, que serve como indicador de início e término da compostagem (HAHN, 2004). Durante as fases iniciais do processo, os compostos orgânicos são metabolizados pelos microrganismos, resultando na produção de CO₂, NH₃, H₂O e calor, que se acumula no interior da "pilha", elevando a temperatura (BERNAL; ALBURQUERQUE; MORA, 2009). Atkinson, Jones e Gauthier (1996) observaram que a temperatura das "pilhas" de cama de frango subiu rapidamente, atingindo 55°C após um período de 20 horas, as quais perduraram por 16 dias. Bakshi e Fontenot (1998) registraram uma

temperatura máxima de 65°C após 7 dias de compostagem, em uma profundidade de 45 centímetros.

A temperatura na "pilha" da cama de frango é crucial na sobrevivência dos microrganismos patogênicos. Sweeten e Auvermann (2008) sugerem que temperaturas entre 55°C e 71°C inibem o crescimento de muitos patógenos. Jeffrey e colaboradores (1998) observaram que um período de 28 dias não foi suficiente para eliminar totalmente *E. coli*, sugerindo um maior tempo de compostagem, o que corrobora com as recomendações de Ávila e colaboradores (2007) sobre um período de compostagem ideal de 30 a 45 dias. Miller e colaboradores (2013) pesquisando patógenos no adubo orgânico final, não encontraram *Salmonella*, *E. coli* sorotipo O157:H7 e *L. monocytogenes*.

2.4 *Escherichia coli*

E. coli é um bacilo Gram negativo, pertencente à família Enterobacteriaceae, anaeróbio facultativo, não esporulado, oxidase negativa, e que pode ou não apresentar motilidade. Utiliza fontes de carbono como acetato e glicose, que são usados para o crescimento, e não metaboliza o citrato. Produzem ácidos a partir da fermentação da glicose, com ou sem produção de gás (HOLT et al., 1994).

E. coli é encontrada na microbiota intestinal do homem e de outros animais de sangue quente como bovinos e aves (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004), e até o final da década de 50 foi considerada como não patogênica (OLSVIK et. al., 1991). Apesar, da maioria das enterobactérias não ser patogênica, elas podem apresentar fatores de virulência, causando infecções geralmente de natureza intestinal (NATARO; KAPER, 1998). São responsáveis por importantes patologias como: enterite, septicemia, infecções do trato urinário (ITU) e até meningite, causando grandes prejuízos em diversas áreas da saúde (KAPER, 2005).

E. coli é um dos principais agentes de infecções intestinais e extraintestinais em diferentes hospedeiros. Amostras de *E. coli* relacionadas às infecções intestinais, tanto em humanos como em outros animais, são denominadas "*E. coli* Diarreio gênica" (DEC) e podem ser caracterizados em diferentes patotipos de

acordo com seus fatores de virulência (CLEMENTS et al., 2012; NATARO; KAPER, 1998).

Segundo Clements e colaboradores (2012), cepas de DEC associadas aos humanos, podem ser caracterizadas de acordo com seu perfil de patogenicidade, fatores de virulência e sintomatologia clínica, em 8 grupos: Enteropatogênicas (EPEC), Enterotoxigênicas (ETEC), Enteroinvasivas (EIEC), Enterohemorrágicas (EHEC), Enteroagregativas (EAEC), *E. coli* aderência difusa (DAEC), Enteroagregativa produtora de Shiga-Toxina (STEAEC) e *E. coli* aderente-invasiva (AIEC).

Entretanto, cepas de *E. coli* relacionadas com infecções extraintestinais são denominadas "*E. coli* Patogênica Extraintestinal" (ExPEC) (SMITH; FRATAMICO; GUNTHER, 2007).

2.5 *E. coli* Patogênica Extraintestinal (ExPEC)

Diferentes variantes patogênicas de *E. coli* podem causar doenças fora do trato gastrointestinal, entre elas destacamos as que causam infecções urinárias ou uropatogênicas (UPEC), septicemia (SEPEC) e meningite neonatal (NMEC) (KÖHLER; DOBRINDT, 2011; PITOU, 2012). Há também cepas de *E. coli* capazes de causar infecções extraintestinais em aves, como: septicemia, aerossaculite salpingite, onfalite, entre outras, e são denominadas "*E. coli* Patogênica para Aves" (APEC) (DHO-MOULIN; FAIRBROTHER, 1999; KNÖLB et al., 2012). Dois novos subgrupos de *E. coli* patogênica em animais foram propostos, um denominado *E. coli* Patogênica Mamária (MPEC) (SHPIGEL; ELAZAR; ROSENSHINE, 2008) e *E. coli* Patogênica Endometrial (EnPEC) (SHELDON et al., 2010). Amostras de ExPEC geralmente apresentam fatores de virulência como adesinas, invasinas, toxinas e sistemas de captação de ferro (JOHNSON; RUSSO, 2005; JOHNSON; STEEL, 2000; RODRIGUEZ-SIEK et al., 2005).

Análises filogenéticas têm classificado as amostras de *E. coli* em 4 grupos filogenéticos, designados A, B1, B2 e D (CLERMONT; BONACORSI; BINGEN, 2000). ExPEC são distintas filogeneticamente de *E. coli* comensal e DEC, onde

cepas de ExPEC patogênicas pertencem principalmente ao grupo B2 e em menor frequência ao grupo D (EWERS et al., 2007, MELLATA, 2013). Cepas de DEC encontram-se nos grupos B1, D e em menor frequência no grupo A (SANTOS et al., 2009), enquanto que cepas comensais estão, em grande parte, no grupo filogenético A e B1 (TENAILLON et al., 2010).

Recentemente, estudos epidemiológicos e moleculares de ExPEC identificaram vários reservatórios em potencial, como o próprio trato intestinal humano, além de reservatórios animais e seus derivados, esgoto e fontes ambientais (MANGES; JOHNSON, 2012). A transmissão de cepas de ExPEC não ocorre apenas de humano para humano, mas também de outros animais para humanos, assim como de humanos para outros animais (BÉLANGER et al., 2011).

Estudos mostram uma relação estreita entre ExPEC humana e APEC. A presença de genes de virulência em comum e padrões filogenéticos, indicam uma relação entre APEC e ExPEC humana (MORA et al., 2013; MOULIN-SCHOULEUR et al., 2007). Skyberg e colaboradores (2006) mostraram em seu trabalho que cepas comensais, que receberam plasmídeos de APEC, foram capazes de crescer na urina humana e de camundongos, o que sugere que estes plasmídeos sejam reservatórios de genes ligados a urovirulência. Ewers e colaboradores (2007) sugerem que APEC seja um veículo ou um reservatório para muitos genes de virulência de ExPEC humana (UPEC e NMEC), sendo APEC considerada um agente zoonótico.

Nos últimos anos, o número de cepas de *E. coli* resistentes aos antimicrobianos aumentou bruscamente (BERGERON et al., 2012). A utilização de antimicrobianos como promotores de crescimento na alimentação de aves é um fator que contribuiu para o aumento na produção (FURTULA et al., 2010). Seu uso indiscriminado aumenta a prevalência de cepas resistentes, e consequentemente a troca de genes entre as bactérias (FOXMAN; MORAN; BROWN, 2007). ExPEC é capaz de desenvolver resistência a vários agentes antimicrobianos contribuindo para um aumento no risco à saúde humana e maiores custos de cuidados da saúde (ASLAM et al., 2014). Um fato que fortalece a ligação entre APEC e ExPEC humana está no padrão uniforme de resistência aos antimicrobianos ou mesmo genes de resistência adquiridos por consumo de carne de frango (MANGES et al., 2007;

OVERDEVEST et al., 2011). Merchant e colaboradores (2013) isolaram *E. coli* da cama de frango e observaram a presença de cepas com genes de resistência a diversos antimicrobianos além de genes de virulência, sugerindo que cuidados devem ser tomados ao utilizar esta cama de frango como adubo. A contaminação dos produtos de cultivo por *E. coli* apresentando tais genes, caracteriza um risco zoonótico e um problema para a saúde pública e o ambiente.

2.6 Fatores de Virulência em ExPEC

Fatores de virulência podem ser definidos como fatores específicos que contribuem para a virulência e são codificados por genes que estão presentes no agente patogênico e ausente em cepas não patogênicas (MOKADY; GOPHNA; RON, 2005). Entre os fatores de virulência presentes em (ExPEC), incluem adesinas, toxinas, revestimento polissacarídico (incluindo cápsulas e lipopolissacarídeos), sideróforos, mecanismos de resistência sérica e invasinas. Tais fatores de virulência ajudam o microrganismo a colonizar as superfícies do hospedeiro, evitando e/ou subvertendo os mecanismos de defesa do mesmo, prejudicando e/ou invadindo suas células e tecidos, e incitando uma resposta inflamatória nociva, desse modo gerando uma doença clínica (BIDET; BONARCORSI; BINGEN, 2012; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

Entretanto, o fator determinante não é a presença ou ausência de um gene relacionado com a virulência, mas seu nível de expressão, que pode ser variável entre as cepas patogênicas e não patogênicas (MOKADY; GOPHNA; RON, 2005).

Cepas de ExPEC possuem fatores de virulência específicos que lhes conferem uma capacidade de sobreviver em diferentes nichos fora do seu habitat intestinal normal, tanto em mamíferos quanto em aves (MELLATA, 2013). Muitos genes associados à virulência têm sido identificados em ExPEC, entre elas, (i) adesinas - *papC* e *papG* (fímbria P), *ecpA* (fímbria adesiva extracelular) *fimH* (componente da fímbria do tipo I), *tsh* (hemaglutinina temperatura sensível); (ii) sistemas de captação de ferro - *iroN* (síntese de receptores do sideróforo salmoquelina), *iutA* (síntese do sideróforo aerobactina), *fyuA* (receptor de yersiniabactina) e *sitA* (proteína periplasmática ligadora de ferro); (iii) proteases -

ompT (codifica a produção de proteínas de membrana externa; (iv) invasinas - *ibeA* (proteína invasora); (v) resistência ao soro - *iss* e *traT* (resistência sérica), (vi) toxinas - *hlyF* e *hlyA* (produção de hemolisina), *cnf1* e *cnf2* (fator citotóxico necrosante tipo 1 e 2) (BÉLANGER et al., 2011; EWERS et al., 2009; JOHNSON; STEEL, 2000; JOHNSON et al., 2008).

2.6.1 Adesinas

E. coli patogênica possuem fatores de adesão específicos que lhe permite colonizar locais que normalmente não habitam (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). O processo de colonização dos tecidos do hospedeiro envolvem adesinas, tanto fimbriais quanto afimbriais, que podem atuar simultaneamente ou em diferentes estágios da infecção (SALDAÑA et al., 2009).

ExPEC pode expressar uma variedade de adesinas, entre elas as adesinas fimbriais. São estruturas proteicas de superfície, que reconhece sítios específicos na célula hospedeira, como um esquema de chave-fechadura (KLEM; HANCOCK; SCHEMBRI, 2010).

A fímbria do tipo 1 é codificada por um grupo de genes *fim*, onde pelo menos sete estão presentes em um único operon (DHO-MOULIN; FAIRBROTHER, 1999). Esta fímbria possui cerca de 7 nm de espessura e 0,2 a 2 µm de comprimento (KLEM; HANCOCK; SCHEMBRI, 2010). O gene *fimA* codifica o maior componente da fímbria, *fimH* codifica a adesina da fímbria do tipo 1, *fimB* e *fimE* são reguladores da fase fimbrial e *fimF* e *fimG* são proteínas auxiliares das subunidades (ANTÃO; WIELER; EWERS, 2009; MOL; OUDEGA, 1996).

A fímbria ECP, chamada de *E. coli* "*common pillus*" representa a família de fímbrias extracelulares encontrada em cepas comensais e patogênicas (BLACKBURN et al., 2009).

A fímbria é codificada por um operon que possui seis genes (*ecpRABCDE*) onde o maior componente da fímbria é uma proteína com aproximadamente 18 kDa codificada pelo gene *ecpA* (POUTTU et al., 2001). Esta associada com amostras de

meningite neonatal e septicemia, onde foi originalmente chamada de fímbria Mat (meningite associada e com temperatura regulada) (GARNETT et al., 2012).

A fímbria P, reconhece glicopeptídeos contendo α -D-galactose (1-4) β -D-galactose, e está associada a infecções do trato urinário por UPEC, e por ser encontrada em linhagens de APEC (DOZOIS et al., 1992; KALLENIIUS et al., 1980). É uma fímbria codificada pelo operon *pap*, que compreende os genes: *papA* que codifica a subunidade maior do corpo da fímbria; *papE*, *papF* e *papG* que codificam as subunidades menores; *papC* e *papD* que são responsáveis pela polimerização e transporte dos peptídeos da fímbria; *papH* que ajuda na fixação na célula.

A hemaglutinina temperatura-sensível (TSH) é outro exemplo de adesina bacteriana. É codificada pelo gene *tsh* que está inserido em um plasmídeo conjugativo associado à produção de colicina V, além de carregar genes do operon aerobactina (DOZOIS et al., 2000).

A hemaglutinina foi isolada e caracterizada pela primeira vez por Provence e Curtiss (1992), em amostras de APEC que causavam aerossaculite e colicepticemia. É uma proteína com aproximadamente 140 kDa, sendo expressa em temperaturas baixas (26-30°C) e reprimida à 42°C.

Rodriguez-Siek e colaboradores (2005), comparando os fatores presentes em APEC e UPEC, encontraram o gene *tsh* em 63% e 39,5%, respectivamente. Entretanto, Heimer e colaboradores (2004), analisando amostras humanas encontraram o gene *tsh* em 63% de UPEC e em 33% de *E. coli* isolada de fezes. Assim, os dados sugerem que o gene *tsh* não está presente apenas em APEC, mas sim difundido em amostras de ExPEC.

2.6.2 Sistemas de aquisição de ferro

O ferro é um elemento essencial para a multiplicação bacteriana, além de participar do transporte de elétrons e oxigênio. Porém, a concentração desse ferro é limitada nos locais de infecção extraintestinal, encontrado apenas no interior da células, fazendo parte de proteínas heme (RUSSO et al., 2002). Fatores envolvendo

a aquisição de ferro, como salmoquelina e aerobactina, possuem uma alta prevalência entre os grupos de ExPEC (BÉLANGER et al., 2011; MELLATA, 2013).

Aerobactina e salmoquelina são sideróforos produzidos quando o ferro encontra-se em baixas concentrações nos tecidos e fluídos corpóreos do hospedeiro, tendo como função capturar ferro da transferrina (CAZA; LÉPINE; DOZOIS, 2011).

Os genes que codificam a aerobactina podem ser encontrados inseridos em plasmídeos ou mesmo no cromossomo bacteriano. Os genes do operon *iucABCD* codificam enzimas para a síntese da aerobactina e o gene *iutA*, codifica seu receptor.

Os genes do operon *iroBCDEN* codificam o sideróforo salmoquelina que está presente em *Salmonella enterica* e algumas cepas de ExPEC (CAZA et al., 2008). Sorsa e colaboradores (2003) demonstraram que a expressão do gene *iroN* é regulada pela concentração de ferro presente no meio.

Outros fatores também estão relacionados a captação do ferro, como o receptor de yersiniabactina codificado pelo gene *fyuA*, encontrada originalmente em *Yersinia* spp. (JOHNSON; RUSSO, 2005) e um transportador periplasmático de ferro codificado pelo gene *sitA* (SABRI; LÉVEILLÉ; DOZOIS, 2006).

2.6.3 Toxinas e Proteases

A hemolisina, é uma proteína formadora de poros na membrana de células, capaz de lisar leucócitos, fibroblastos, granulócitos e principalmente eritrócitos, pois disponibiliza íons ferro para o microrganismo.

A α -hemolisina é uma proteína secretada pelo sistema de secreção do tipo I, e sua síntese, secreção e ativação são determinadas pelo operon *hlyCABD* (GENTSCHEV; DIETRICH; GOEBEL, 2002). Esta α -hemolisina está relacionada com cepas de UPEC pertencendo ao grupo filogenético B2 (WELCH et al., 1981).

O gene *hlyF* é frequentemente encontrado em amostras de APEC por ser uma possível hemolisina aviária, também encontrada em amostras de NMEC (PEIGNE et al., 2009). Skyberg, Johnson e Nolan (2008), mostraram uma alta

expressão do gene *hlyF* nas amostras de APEC, quando comparado a outros genes (*iroN*, *iutA*, *cvaC* e *tsh*).

O fator citotóxico necrosante (CNF) é uma exotoxina bacteriana associada principalmente com cepas patogênicas de ExPEC que causam infecção do trato urinário e meningite (BOQUET, 2001).

CNF1 e CNF2 são toxinas capazes de causar necrose e letalidade *in vivo*, além de induzir alterações no citoesqueleto em cultura de células (BLANCO et al., 1996). O CNF1 foi descrito pela primeira vez na década de 80, como uma toxina capaz de reorganizar os microfilamentos de actina na célula eucariótica (CAPRIOLI et al., 1983; FIORENTINI et al., 1988). O CNF1 e CNF2 são proteínas monoméricas termo-lábeis com cerca de 115 e 110 kDa, respectivamente (BLANCO et al., 1996). O CNF1 é codificado pelo gene *cnf1* localizado em uma ilha de patogenicidade, próximo ao operon da α -hemolisina (BOQUET, 2001), e o CNF 2 é codificado por um gene plasmidial (FALBO et al., 1993).

OmpT é a uma protease que pertence a família das omptinas, e estão presentes em membros da família Enterobacteriaceae (THOMASSIN et al., 2012).

O gene *ompT*, codifica proteínas localizadas na membrana externa e tem sido caracterizado como um ativador do plasminogênio, com a capacidade de hidrolisar a protamina e bloquear a sua entrada. As proteínas por ele produzidas ajudam na permanência da *E. coli* no trato urinário, prolongando a infecção (VANDEPUTTE-RUTTEN et al., 2001).

2.6.4 Resistência ao soro

Alguns microrganismos possuem a capacidade de evadir o sistema imunológico do hospedeiro, devido a presença de fatores como antígenos capsulares, lipopolissacarídeos e proteínas da membrana externa.

A proteína Iss, codificada pelo gene *iss* (increased serum survive), tem cerca de 10 kDa e fica localizada na membrana externa bacteriana, sendo resistente a hidrólise ácida (NOLAN et al., 2003). A ação da proteína ocorre pelo bloqueio do

sistema complemento que atua na lise da membrana celular bacteriana (BINNS; MAYDEN; LEVINE, 1982). Essa característica é importante para a patogênese uma vez que auxilia a bactéria a persistir nos fluidos e órgãos internos do hospedeiro (MELLATA et al., 2003). O gene *iss* foi descrito por Binn, Davies e Hardy em 1979, e está associado ao plasmídeo ColV que codifica a produção de colicina em *E. coli* humana (BINNS; DAVIES; HARDY, 1979).

Pfaff-McDonough e colaboradores (2000) demonstraram a presença deste gene em amostras comensais, o que sugere que a presença do gene não é suficiente para identificar uma cepa como virulenta.

O gene *traT*, inserido em plasmídeos F ou F-like de resistência á antibióticos, codifica uma proteína de membrana externa chamada de TraT, com cerca de 25 kDa, encontrada em grande número na superfície da célula bacteriana (NEMETH; MUCKLE; LO, 1991).

Sugere-se que sua ação seja a de interferir a opsonização da via alternativa do sistema complemento, através da restrição e alteração do padrão de deposição de C3 na membrana bacteriana, inibindo a fagocitose (AGUERO et al., 1884).

2.6.5 Ilhas de Patogenicidade (PAI)

Grandes regiões do DNA compostas por cassetes de genes, incluindo elementos genéticos móveis (transposons, integrons e sequências de inserção) foram denominados de ilhas genômicas (IG). Estas IGs que possuem genes associados à virulência, foram então chamadas de ilhas de patogenicidade (PAI - Pathogenic Islands) (GAL-MOR; FINLAY, 2006).

O conceito de PAI foi introduzido por Hacker e colaboradores (1990) que ao estudarem a virulência de isolados de UPEC, observaram uma ligação entre os genes que codificavam fatores de colonização e genes que codificavam hemolisinas.

As PAIs possuem algumas características específicas como, grandes porções de DNA com tamanhos entre 10 a 200 kb, constituição por citosina e guanina, diferente da proporção encontrada no cromossomo, e presença de regiões

chamadas de "hot spots", que possuem pontos onde inserções ou deleções são facilitadas (VIEIRA, 2009).

PAIs possuem um repertório genético variado e podem codificar funções, que dependem em grande parte do ambiente onde a bactéria vive. Entre os genes encontrados dentro das PAIs estão fatores de adesão, salmoquelinas, exotoxinas, invasinas e sistemas de secreção (GAL-MOR, FINLAY, 2006)

As ilhas patogênicas mais estudadas em ExPEC, são as encontradas em cepas de UPEC: PAI I e II identificadas em *E. coli* J96 e *E. coli* CFT073; e PAI I, II, III e IV em *E. coli* 536, verificando-se que a PAI IV₅₃₆ é a mais frequente em UPEC (MIDDENDORF et al., 2004; SABATÉ et al., 2006).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGÜERO, M. E. et al. A plasmid-encoded outer membrane protein, TraT, enhances resistance of *Escherichia coli* to phagocytosis. **Infection and Immunity**, v. 46, n. 3, p. 740-746, 1984.
- ANTÃO, Esther-Maria; WIELER, Lothar H.; EWERS, Christa. Adhesive threads of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. **Gut Pathogens**, v. 1, n. 1, p. 1-12, 2009.
- ASLAM, Mueen et al. Characterization of Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* isolated from retail poultry meats from Alberta, Canada. **International Journal of Food Microbiology**, v. 177, p. 49-56, 2014.
- ATKINSON, Cheryl F.; JONES, Daniel D.; GAUTHIER, Joseph J. Biodegradability and microbial activities during composting of poultry litter. **Poultry Science**, v. 75, n. 5, p. 608-617, 1996.
- ÁVILA, Valdir S. et al. Boas práticas de produção de frangos de corte. **Concórdia: Embrapa Suínos e Aves**. 28p. 2007.
- BAKSHI, M. P. S.; FONTENOT, J. P. Processing and nutritive evaluation of broiler litter as livestock feed. **Animal Feed Science and Technology**, v. 74, n. 4, p. 337-345, 1998.
- BÉLANGER, Louise et al. *Escherichia coli* from animal reservoirs as a potential source of human extraintestinal pathogenic *E. coli*. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 62, n. 1, p. 1-10, 2011
- BELUSSO, Diane; HESPANHOL, Antonio Nivaldo. A evolução da avicultura industrial brasileira e seus efeitos territoriais. **Revista Percursos**, v. 2, n. 1, p. 25-51, 2010.
- BERGERON, Catherine Racicot et al. Chicken as reservoir for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in humans, Canada. **Emerging Infectious Diseases**, v. 18, n. 3, p. 415-421, 2012.
- BERNAL, M. P.; ALBURQUERQUE, J. A.; MORAL, R. Composting of animal manures and chemical criteria for compost maturity assessment. A review. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 22, p. 5444-5453, 2009.
- BHATTACHARYA, A. N.; TAYLOR, J. C. Recycling animal waste as a feedstuff: A review. **Journal of Animal Science**, v. 41, n. 5, p. 1438-1457, 1975.
- BIDET, P.; BONARCORSI, S.; BINGEN, E. Virulence factors and pathophysiology of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. **Archives de Pediatrie: Organe Officiel de la Societe Francaise de Pediatrie**, v. 19, p. S80-92, 2012.

BINNS, Matthew M.; DAVIES, D. L.; HARDY, K. G. Cloned fragments of the plasmid ColV, I-K94 specifying virulence and serum resistance. **Nature**, v. 279, n. 5716, p. 778-781, 1979.

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

BLACKBURN, Dana et al. Distribution of the *Escherichia coli* common pilus among diverse strains of human enterotoxigenic *E. coli*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 6, p. 1781-1784, 2009.

BLANCO, M. et al. Polymerase chain reaction for detection of *Escherichia coli* strains producing cytotoxic necrotizing factor type 1 and type 2 (CNF1 and CNF2). **Journal of Microbiological Methods**, v. 26, n. 1, p. 95-101, 1996.

BOQUET, P. The cytotoxic necrotizing factor 1 (CNF1) from *Escherichia coli*. **Toxicon**, v. 39, n. 11, p. 1673-1680, 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº15 de 17 de julho de 2001 - Art. 2. Dispõe sobre a produção, a comercialização de proteína e gordura de mamíferos destinadas à alimentação de ruminantes. Disponível em: <<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=cnsultarLegislacaoFederal>>. Acesso em: 16 novembro 2014.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº007 de 17 de maio de 1999 - Art. 1. Dispõe sobre as normas para a produção, tipificação, processamento, envase, distribuição, identificação e certificação da qualidade de produtos orgânicos, sejam de origem animal ou vegetal. Disponível em: <<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=cnsultarLegislacaoFederal>>. Acesso em: 16 novembro 2014.

CAPRIOLI, A. et al. Partial purification and characterization of an *Escherichia coli* toxic factor that induces morphological cell alterations. **Infection and Immunity**, v. 39, n. 3, p. 1300-1306, 1983.

CAZA, Mélissa et al. Specific roles of the *iroBCDEN* genes in virulence of an avian pathogenic *Escherichia coli* O78 strain and in production of salmochelins. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 8, p. 3539-3549, 2008.

CAZA, Mélissa; LÉPINE, François; DOZOIS, Charles M. Secretion, but not overall synthesis, of catecholate siderophores contributes to virulence of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v. 80, n. 1, p. 266-282, 2011.

CLEMENTS, Abigail et al. Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. **Gut Microbes**, v. 3, n. 2, p. 71-87, 2012.

CLERMONT, Olivier; BONACORSI, Stéphane; BINGEN, Edouard. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 10, p. 4555-4558, 2000.

CORRÊA, Juliano Corulli; MIELE, Marcelo. A cama de aves e os aspectos agrônômicos, ambientais e econômicos. In: PALHARES, J. C. P.; KUNZ, A. Manejo ambiental na avicultura, **Concórdia: Embrapa Suínos e Aves**. p. 125-152, 2011.

COSTA, Paulo Manuel Rodrigues Martins Resistências antimicrobianas em avicultura. In: CONGRESSO DE CIÊNCIAS VETERINÁRIAS, SPCV, Oeiras, pp. 251-260, 2002.

DHO-MOULIN, Maryvonne; FAIRBROTHER, John Morris. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). **Veterinary Research**, v. 30, n. 2-3, p. 299-316, 1999.

DOZOIS, C. M. et al. Relationship between the Tsh autotransporter and pathogenicity of avian *Escherichia coli* and localization and analysis of the Tsh genetic region. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 7, p. 4145-54, Jul 2000.

DOZOIS, Charles M. et al. *pap*-and *pil*-related DNA sequences and other virulence determinants associated with *Escherichia coli* isolated from septicemic chickens and turkeys. **Infection and Immunity**, v. 60, n. 7, p. 2648-2656, 1992.

DUTRA, Iveraldo S.; DÖBEREINER, Jürgen; SOUZA, Aires M. Botulism in beef and dairy cattle fed with poultry litter. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 25, n. 2, p. 115-119, 2005.

EWERS, Christa et al. Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: how closely related are they?. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 297, n. 3, p. 163-176, 2007.

EWERS, Christa et al. Intestine and environment of the chicken as reservoirs for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains with zoonotic potential. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 1, p. 184-192, 2009.

FALBO, V. et al. Isolation and nucleotide sequence of the gene encoding cytotoxic necrotizing factor 1 of *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 61, n. 11, p. 4909-4914, 1993.

FIORENTINI, C. et al. Cytoskeletal changes induced in HEp-2 cells by the cytotoxic necrotizing factor of *Escherichia coli*. **Toxicon**, v. 26, n. 11, p. 1047-1056, 1988.

FOXMAN, Betsy; MORAN, Ki; BROWN, Patricia. Antibiotic resistance and pyelonephritis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 45, n. 3, p. 281-283, 2007.

FURTULA, Vesna et al. Veterinary pharmaceuticals and antibiotic resistance of *Escherichia coli* isolates in poultry litter from commercial farms and controlled feeding trials. **Poultry Science**, v. 89, n. 1, p. 180-188, 2010.

GAL-MOR, Ohad; FINLAY, B. Brett. Pathogenicity islands: a molecular toolbox for bacterial virulence. **Cellular Microbiology**, v. 8, n. 11, p. 1707-1719, 2006.

GARNETT, James A. et al. Structural insights into the biogenesis and biofilm formation by the *Escherichia coli* common pilus. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 10, p. 3950-3955, 2012.

GENTSCHEV, Ivaylo; DIETRICH, Guido; GOEBEL, Werner. The *E. coli* α -hemolysin secretion system and its use in vaccine development. **Trends in Microbiology**, v. 10, n. 1, p. 39-45, 2002.

GOMES, Ana Paula Wendling; GOMES, Adriano Provezano. Sistema de integração na avicultura de corte: um estudo de caso na região de Viçosa, MG. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA E SOCIOLOGIA RURAL. 2008

HACKER, Jörg et al. Deletions of chromosomal regions coding for fimbriae and hemolysins occur in vitro and in vivo in various extra intestinal *Escherichia coli* isolates. **Microbial Pathogenesis**, v. 8, n. 3, p. 213-225, 1990.

HAHN, L. et al. Persistência de patógenos e do antibiótico salinomicina em pilhas de compostagem de cama de aviário. **Archivos de Zootecnia**, v. 61, n. 234, p. 279-285, 2012.

HAHN, Leandro. **Processamento da cama de aviário e suas implicações nos agroecossistemas**. 2004. 130 fls. Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2004.

HEIMER, Susan R. et al. Autotransporter genes *pic* and *tsh* are associated with *Escherichia coli* strains that cause acute pyelonephritis and are expressed during urinary tract infection. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 1, p. 593-597, 2004.

HOLT, John G. et al. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. Williams and Wilkins, Baltimore, p. 1-25, 1994.

JEFFREY, Joan S. et al. Research notes: Prevalence of selected microbial pathogens in processed poultry waste used as dairy cattle feed. **Poultry Science**, v. 77, n. 6, p. 808-811, 1998.

JOHNSON, James R.; RUSSO, Thomas A. Molecular epidemiology of extraintestinal pathogenic (uropathogenic) *Escherichia coli*. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 295, n. 6, p. 383-404, 2005.

JOHNSON, James R.; STELL, Adam L. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. **Journal of Infectious Diseases**, v. 181, n. 1, p. 261-272, 2000.

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

KÄLLENIUS, G. et al. Identification of a carbohydrate receptor recognized by uropathogenic *Escherichia coli*. **Infection**, v. 8, n. 3, p. S288-S293, 1980.

KAPER, James B. Pathogenic *Escherichia coli*. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 295, n. 6, p. 355-356, 2005.

KAPER, James B.; NATARO, James P.; MOBLEY, Harry L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 123-140, 2004.

KLEMM, Per; HANCOCK, Viktoria; SCHEMBRI, Mark A. Fimbrial adhesins from extraintestinal *Escherichia coli*. **Environmental Microbiology Reports**, v. 2, n. 5, p. 628-640, 2010.

KNÖBL, Terezinha et al. Prevalence of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) clone harboring *sfa* gene in Brazil. **The Scientific World Journal**, v. 2012.

KÖHLER, Christian-Daniel; DOBRINDT, Ulrich. What defines extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*?. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 301, n. 8, p. 642-647, 2011.

MANGES, Ameer R. et al. Retail meat consumption and the acquisition of antimicrobial resistant *Escherichia coli* causing urinary tract infections: a case-control study. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 4, n. 4, p. 419-431, 2007.

MANGES, Ameer R.; JOHNSON, James R. Foodborne origins of *Escherichia coli* causing extraintestinal infections. **Clinical Infectious Diseases**, p. cis502, 2012.

MELLATA, Melha et al. Role of virulence factors in resistance of avian pathogenic *Escherichia coli* to serum and in pathogenicity. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 1, p. 536-540, 2003.

MELLATA, Melha. Human and avian extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: infections, zoonotic risks, and antibiotic resistance trends. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 10, n. 11, p. 916-932, 2013.

MERCHANT, Laura E. et al. Characterization of antibiotic-resistant and potentially pathogenic *Escherichia coli* from soil fertilized with litter of broiler chickens fed antimicrobial-supplemented diets. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 58, n. 9, p. 1084-1098, 2013.

MIDDENDORF, Barbara et al. Instability of pathogenicity islands in uropathogenic *Escherichia coli* 536. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 10, p. 3086-3096, 2004.

MILLER, Cortney et al. Analyzing indicator microorganisms, antibiotic resistant *Escherichia coli*, and regrowth potential of foodborne pathogens in various organic fertilizers. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 10, n. 6, p. 520-527, 2013.

MOKADY, Daphna; GOPHNA, Uri; RON, Eliora Z. Extensive gene diversity in septicemic *Escherichia coli* strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 1, p. 66-73, 2005.

MOL, Olaf; OUDEGA, Bauke. Molecular and structural aspects of fimbriae biosynthesis and assembly in *Escherichia coli*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 19, n. 1, p. 25-52, 1996.

MORA, Azucena et al. Poultry as reservoir for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* O45: K1: H7-B2-ST95 in humans. **Veterinary Microbiology**, v. 167, n. 3, p. 506-512, 2013.

MOULIN-SCHOULEUR, Maryvonne et al. Common virulence factors and genetic relationships between O18: K1: H7 *Escherichia coli* isolates of human and avian origin. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 10, p. 3484-3492, 2007.

NATARO, James P.; KAPER, James B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 1, p. 142-201, 1998.

NEMETH, Judith; MUCKLE, C. Anne; LO, Reggie Y. C. Serum resistance and the *traT* gene in bovine mastitis-causing *Escherichia coli*. **Veterinary Microbiology**, v. 28, n. 4, p. 343-351, 1991.

NOLAN, L. K. et al. Resistance to serum complement, *iss*, and virulence of avian *Escherichia coli*. **Veterinary Research Communications**, v. 27, n. 2, p. 101-110, 2003.

OLSVIK, Ørjan et al. Pathogenic *Escherichia coli* found in food. **International Journal of Food Microbiology**, v. 12, n. 1, p. 103-113, 1991;

OVERDEVEST, Ilse et al. Extended-spectrum β -lactamase genes of *Escherichia coli* in chicken meat and humans, The Netherlands. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 7, p. 1216-1222, 2011.

PALHARES, Julio César P. Uso da cama de frango na produção de biogás. **Concórdia: Embrapa Suínos e Aves**, 2004.

PEIGNE, Chantal et al. The plasmid of *Escherichia coli* strain S88 (O45: K1: H7) that causes neonatal meningitis is closely related to avian pathogenic *E. coli* plasmids and is associated with high-level bacteremia in a neonatal rat meningitis model. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 6, p. 2272-2284, 2009.

PAFF-MCDONOUGH, Samantha J. et al. Complement resistance-related traits among *Escherichia coli* isolates from apparently healthy birds and birds with colibacillosis. **Avian Diseases**, p. 23-33, 2000.

PIATTI, Gabriella et al. Virulence factors in urinary *Escherichia coli* strains: phylogenetic background and quinolone and fluoroquinolone resistance. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 2, p. 480-487, 2008.

PITOUT, Johann D. D. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: a combination of virulence with antibiotic resistance. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, 2012.

POUTTU, Ritta et al. *matB*, a Common Fimbrillin Gene of *Escherichia coli*, Expressed in a Genetically Conserved, Virulent Clonal Group. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 16, p. 4727-4736, 2001.

PROVENCE, David L.; CURTISS, Roy III. 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, n. 11, p. 4460-4467, 1992.

REGITANO, Jussara Borges; LEAL, Rafael Marques Pereira. Comportamento e impacto ambiental de antibióticos usados na produção animal brasileira. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 34, n. 3, p. 601-16, 2010.

RIZZI, Aldair Tarcísio. **Mudanças tecnológicas e reestruturação da indústria agroalimentar: o caso da indústria de frangos no Brasil**. 1993. 194fls. Tese (Doutorado em Economia). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1993.

RODRIGUEZ-SIEK, Kylie E. et al. Comparison of *Escherichia coli* isolates implicated in human urinary tract infection and avian colibacillosis. **Microbiology**, v. 151, n. 6, p. 2097-2110, 2005.

RUSSO, Thomas A. et al. *iroN* functions as a siderophore receptor and is a urovirulence factor in an extraintestinal pathogenic isolate of *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 12, p. 7156-60, Dec 2002.

RUSSO, Thomas A.; JOHNSON, James R. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. **Journal of Infectious Diseases**, v. 181, n. 5, p. 1753-1754, 2000.

SABATÉ, M. et al. Pathogenicity island markers in commensal and uropathogenic *Escherichia coli* isolates. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 12, n. 9, p. 880-6, Sep 2006.

SABRI, Mourad; LÉVEILLÉ, Simon; DOZOIS, Charles M. A *SitABCD* homologue from an avian pathogenic *Escherichia coli* strain mediates transport of iron and manganese and resistance to hydrogen peroxide. **Microbiology**, v. 152, n. 3, p. 745-758, 2006.

SALDAÑA, Zeus et al. The *Escherichia coli* common pilus and the bundle-forming pilus act in concert during the formation of localized adherence by enteropathogenic *E. coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 191, n. 11, p. 3451-3461, 2009.

SANTOS, Ana Carolina de Mello et al. A virulência de *Escherichia coli* patogênica extra-intestinal (ExPEC) em relação à idade e ao sexo do hospedeiro. **Mundo Saúde (Impr.)**, v. 33, n. 4, p. 392-400, 2009.

SANTOS, Tânia Mara Baptista; JUNIOR, Jorge de Lucas.; SAKOMURA, Nilva Kazue. Efeitos de densidade populacional e da reutilização da cama sobre o desempenho de frangos de corte e produção de cama. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 100, n. 553-554, p. 45-52, 2005.

SHELDON, I. Martin et al. Specific strains of *Escherichia coli* are pathogenic for the endometrium of cattle and cause pelvic inflammatory disease in cattle and mice. **PLoS One**, v. 5, n. 2, p. e9192, 2010.

SHPIGEL, Nahum Y.; ELAZAR, Sharon; ROSENSHINE, Ilan. Mammary pathogenic *Escherichia coli*. **Current Opinion in Microbiology**, v. 11, n. 1, p. 60-65, 2008.

SINDIAVIPAR. Disponível: <<http://www.sindiavipar.com.br/>>. Acesso em: 17 de Novembro de 2014.

SKYBERG, Jerod 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. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 11, p. 6287-6292, 2006.

SKYBERG, Jerod A.; JOHNSON, Timothy J.; NOLAN, Lisa K. Mutational and transcriptional analyses of an avian pathogenic *Escherichia coli* ColV plasmid. **BMC Microbiology**, v. 8, n. 1, p. 24, 2008.

SMITH, James L.; FRATAMICO, Pina M.; GUNTHER, Nereus W. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 4, n. 2, p. 134-163, 2007.

SORSA, Liisa Johanna et al. Characterization of an *iroBCDEN* gene cluster on a transmissible plasmid of uropathogenic *Escherichia coli*: evidence for horizontal transfer of a chromosomal virulence factor. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 6, p. 3285-3293, 2003.

SWEETEN, John M.; AUVERMANN, Brent W. Composting manure and sludge. **Available Electronically from <http://hdl.handle.net/1969.1/87650>**. 2008.

TAVARES, Luciano de Paulo; RIBEIRO, Kárem Cristina de Sousa. Desenvolvimento da avicultura de corte brasileira e perspectivas frente à influenza aviária. **Organizações Rurais & Agroindustriais**, v. 9, n. 1, 2011.

TENAILLON, Olivier et al. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 3, p. 207-217, 2010.

THOMASSIN, Jenny-Lee et al. OmpT outer membrane proteases of enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli* contribute differently to the degradation of human LL-37. **Infection and Immunity**, v. 80, n. 2, p. 483-492, 2012.

UBABEF. Produção Brasileira de Carne de Frango por Produto em 2012 , Relatório Anual. 2013.

UBABEF. Produção Brasileira de Carne de Frango por Produto em 2013 , Relatório Anual. 2014.

VANDEPUTTE-RUTTEN, Lucy et al. Crystal structure of the outer membrane protease OmpT from *Escherichia coli* suggests a novel catalytic site. **The EMBO Journal**, v. 20, n. 18, p. 5033-5039, 2001.

VIEIRA, Maria de Fátima Araújo. **Caracterização e análise da qualidade sanitária de camas de frango de diferentes materiais reutilizados sequencialmente**. 2011. 81fls. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola), Universidade de Viçosa, Viçosa. 2011.

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

VIEIRA, Norberto Martins; DIAS, Roberto Serpa. Uma abordagem sistêmica da avicultura de corte na economia brasileira. In: NEVES, M. F.; BIALOSKORSKI, S.; SCARE, R. F. CONGRESSO BRASILEIRO DE ECONOMIA E SOCIOLOGIA RURAL. 2005

WELCH, Rod A. et al. Haemolysin contributes to virulence of extra-intestinal *E. coli* infections. **Nature**, v. 294, 1981.

ZHAO, Lixiang et al. Comparison of virulence factors and expression of specific genes between uropathogenic *Escherichia coli* and avian pathogenic *E. coli* in a murine urinary tract infection model and a chicken challenge model. **Microbiology**, v. 155, n. 5, p. 1634-1644, 2009.

ExPEC virulence factors in *Escherichia coli* isolates from avian organic fertilizer

Luís Eduardo de Souza Gazal^a, Juan Josué Puño-Sarmiento^a, Leonardo Pinto Medeiros^a, Paula Signolfi Cyoia^a, Wanderlei Dias da Silveira^b, Renata Katsuko Takayama Kobayashi^a, Gerson Nakazato^{a*}.

^aDepartment of Microbiology, Center of Biological Sciences, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brazil, CP 6001.

^bDepartment of Genetic, Molecular Biology and Bioagents, Biology Institute, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil, CP6001.

***Corresponding author:** Gerson Nakazato, Department of Microbiology, Center of Biological Sciences, Universidade Estadual de Londrina, Campus Universitário, CEP 86055-990, Londrina, PR, Brazil, Phone: +55(43) 3371-4396, Fax: +55 (43) 3371-4788, e-mail: gnakazato@uel.br.

Abstract

Poultry litter is commonly used as fertilizer in agriculture. However, this poultry litter must be processed to be used, since they have a large number of pathogenic microorganisms such *Escherichia coli*. The goals of this study were to isolate and characterize *E. coli* from avian organic fertilizer. Sixty-four *E. coli* strains were isolated from avian organic fertilizer and characterized with virulence factors, pathogenicity island, phylogenetic group, antimicrobial resistance, biofilm formation and adhesion to HEp-2 cells. Sixty-three isolates showed at least one virulence gene (*fimH*, *ecpA*, *sitA*, *traT*, *iutA*, *iroN*, *hlyF*, *ompT*, *iss*). Among the main phylogenetic groups described by Clermont were predominant groups A (59.3%) and B1 (34.3%). The pathogenicity island CFT073II (51.5%) was the most prevalent among the isolates. Thirty-two isolates (50%) were resistant to at least one antimicrobial agent. Approximately 90% of isolates were adhered to HEp-2 cells, with an aggregative adherence (74.1%) as predominant pattern. In the biofilm assay, it was observed that 75% of isolates have not produce biofilm. These results showed that these isolates have pathogenic factors that are also found in *E. coli* pathogenic for humans.

Keywords: *Escherichia coli*, composting, organic fertilizer, virulence factors, antimicrobial resistance.

Introduction

In 2011, Brazilian chicken meat production reached 13.05 million tons, maintaining its position as the third-largest producer after the USA and China and first in world-wide export (Ubabef, 2013). Consequently, with increases in poultry production, high amounts of poultry litter are produced. Approximately 1.75 kg of poultry litter are produced per kilogram of poultry (Santos et al., 2005), thus, in 2011, Brazil produced approximately 22.83 million tons of poultry litter.

Manure, or animal waste, are commonly used as fertilizer in organic and conventional agriculture, and mainly used for vegetable production (Johannessen et al., 2004; Oliveira et al., 2010). The main fertilizer used is poultry litter; however, the use of this poultry litter can lead to problems, such as pollution by nutrients, chemicals and microorganisms (Hahn, 2004). Thus, this waste must be properly treated before being used. Some farmers use poultry litter following the Normative Instruction n° 007, Ministry of Agriculture and Supply, which allows the use of animals, since these compounds are free of contaminants (Brasil, 1999), however, the normative not specify how this material should be processed.

The composting process is a widely method used to make an organic waste safe and suitable for use (Wilkinson et al., 2011). During the initial stages, called bio-oxidation phase, simple organic compounds are metabolized by the microorganisms, resulting in CO₂, NH₃, water vapor and heat, which accumulates in the windrow, raising the temperature. High temperatures reduces the number of pathogens and weed from organic compound, further decreasing its volume (Bernal et al., 2009).

Organic fertilizer presents a viable alternative to other production systems, with benefits such as large amounts of nutrients, low levels of pathogens such as

bacteria, parasites and weeds, easy handling and stockage, and low production costs (Oliveira et al., 2004; Sweeten & Auvermann, 2008).

Among the diverse bacteria present in organic fertilizer, there are some Gram-positive and Gram-negative organisms (Zhong et al., 2010). *Escherichia coli* is a Gram-negative bacteria that belongs to the Enterobacteriaceae family and is present in the intestinal tract of humans and other animals. *E. coli* strains are categorized into commensal, Diarrheagenic *E. coli* (DEC) and Extraintestinal Pathogenic *E. coli* (ExPEC), based on virulence profile and clinical reports (Kaper et al., 2004).

DEC strains are divided into different pathotypes, characterized by their virulence factors (Clements et al., 2012). Although *E. coli* is known to cause intestinal diseases, the frequency, diversity, potential severity and economic impacts of infections caused by ExPEC also have great importance (Mellata et al., 2003). ExPEC strains harbor virulence genes that allow them to cause extraintestinal infections. The virulence characteristics present in most ExPEC strains include iron acquisition mechanisms (siderophores), fimbrial adhesins such as type 1 and P, serum resistance, capsule, and toxins such as hemolysin and cytotoxic necrotizing factor type 1 and 2 (Russo et al., 2002).

Furthermore, the increase in prevalence of antimicrobial resistance in microbial communities is worrying (Miller et al., 2013). In clinical veterinary practice, antibiotics are used as therapy and for prevention of bacterial infections and as growth promoters, increasing the efficacy of feed (Furtula et al., 2010). Studies have shown that antibiotic resistance genes can be transferred between commensal and pathogenic bacteria through mobile plasmids in poultry (Poppe et al., 2005), and between strains of animal compost and manure (Guan et al., 2007).

Thus, it is important to characterize the bacteria presents in fertilizer of avian origin, that cause disease in man or spread resistance genes (Merchant et al., 2012). Our study aimed to detect the presence of ExPEC virulence genes, antimicrobial resistance and other phenotypic characteristics, in *E. coli* isolates from organic fertilizer of avian origin.

Materials and methods

Organic fertilizer samples and bacterial strains

From December 2011 to June 2012, 40 sample of avian organic fertilizers were collected from 12 farms in Londrina region (Northern Paraná, Brazil). The organic fertilizer used in this study was a final product of poultry litter composting process ready to be used and marketed. Approximately twenty-five grams of organic fertilizer was collected using latex gloves and transported to the laboratory into sterilized glass jars that were stored in a refrigerator (4°C). The samples were plated on MacConkey agar (Oxoid, Basingstoke, UK) and incubated at 37°C for 24 h. Two to three colonies from each plate were selected and evaluated by biochemical assays, EPM, MILi and Simmons Citrat agar (Ewing, 1986; Toledo, 1982a, 1982b), to confirm *E. coli* colonies. The confirmed isolates were stored in Brain Heart Infusion (BHI) (Difco®, Sparks, Maryland, USA) containing 25% glycerol (Sigma®, Saint Louis, Missouri, USA) at -80°C. Negative and positive controls, used in this study, belong to the bacterial collection of the Laboratory of Basic and Applied Bacteriology - Department of Microbiology - Universidade Estadual de Londrina.

DNA extraction

The strains were grown in Luria Bertani broth (LB) (Difco®, Sparks, Maryland, USA) at 37°C for 24 h. After centrifugation, pellets were resuspended in 200 µL of

sterile water, boiled for 10 min and centrifuged at 12,000 × *g* for 6 min. The boiled lysates were used as a template for the PCR assays.

Virulence genotyping

All isolates were examined for the presence of the five genes (*iutA*, *iroN*, *hlyF*, *iss* and *ompT*) with respect to pathogenicity in APEC, as described by Johnson and collaborators (2008) (Table 1). Twelve others different virulence factor genes, found in ExPEC strains, were used for to characterize the bacterial isolates: (i) bacterial adhesion (*papC*, *papG*, *tsh*, *ecpA* and *fimH*), (ii) iron acquisition (*fyuA* and *sitA*), (iii) invasion (*ibeA*), (iv) serum resistance (*traT*), (v) toxins (*hlyA*, *cnf-1* and *cnf-2*). These genes were using in PCR assays, as previously described (Le Bouguenec et al., 1992; Yamamoto et al., 1995; Blanco et al., 1996; Johnson & Steel, 2000; Dozois et al., 2000; Blackburn et al., 2009) (Table 1).

Determination of phylogenetic groups

E. coli strains were classified by phylogenetic group using a technique previously described by Clermont and collaborators (2000), based on PCR. For PCR assays, the genes *chuA* (required for heme transport in enterohemorrhagic O157:H7 *E. coli*) and *yjaA* (initially identified in the recent complete genome sequence of *E. coli* K-12) and a DNA fragment, *TspE4C2* (anonymous fragment), were used (Table 1).

Pathogenicity island (PAI)

The test was carried out in two multiplex reactions, as previously described by Sabaté and collaborators (2006). For the first PCR multiplex, the following genes were used: *PAI III536* (S-fimbriae and an iron siderophore system); *PAI IV536* (yersiniabactin siderophore system); *PAI IICFT073* (P-fimbriae and iron-regulated genes) (Table 1); and for the second PCR multiplex, the following genes were used:

PAI I536 (α -hemolysin, CS12 fimbriae and F17-like fimbrial adhesin); *PAI II536* (α -hemolysin and P-related fimbriae); *PAI IJ96* (α -hemolysin and P-fimbriae); and *PAI ICFT073* (α -hemolysin, P-fimbriae and aerobactin) (Table 1).

Adherence and biofilm assays

HEp-2 cells were used in adherence assays as previously described by Cravioto and collaborators (1979), with slight modifications. The HEp-2 cells were grown in 24-well sterile microplates (BD Falcon, Bedford, MA, USA) and round cover slips (13 mm in diameter) were placed prior to inoculation. The cells were grown in each well with 1 mL of Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Invitrogen®, Carlsbad, California, USA) containing 10% fetal calf serum (Invitrogen®, Carlsbad, California, USA) for 24 h at 37°C with 5% CO₂. The cells were used at 70% confluence. After the cells were grown, the plates were washed twice with sterile, phosphate-buffered saline (0.05 M, pH 7.4 (PBS). One milliliter of DMEM, supplemented with 2% fetal calf serum and 3% D-mannose (Sigma®, Saint Louis, Missouri, USA), and 40 μ L of bacterial culture incubated overnight in LB broth (Difco®, Sparks, Maryland, USA) were added into each well and incubated at 37°C for 3 h. After the cells had grown, the wells were washed twice with PBS, DMEM containing 2% fetal calf serum was added, and the cells were incubated for 3 h. Next, the wells were washed once with PBS, fixed with absolute methanol (Merck®, Darmstadt, DEU) for 15 min and stained with May-Grunwald (Sigma®, Saint Louis, Missouri, USA) and Giemsa (Sigma®, Saint Louis, Missouri, USA) for 10 min each. The slides were observed using a light microscope with oil immersion lens. The patterns of adherence were determined as previously described by (Nataro et al., 1987; Scaletsky et al., 1984).

Biofilm assays were performed according to methodology previously described by Wakimoto and collaborators (2004), with slight modifications. All *E. coli* strains were grown in LB broth for 24 h at 37°C. Five microliters of culture was inoculated in 195 µL of DMEM containing 0.45% glucose in 96-well polystyrene plates (BD Falcon, Bedford, MA, USA), and incubated for 24 h at 37°C. Each sample was stained for five minutes with 0.5% crystal violet and washed four times with PBS (0.01 M, pH 7.4), and 200 µL of 95% (v/v) ethanol was added. Quantification was carried at 570 nm using an automated plate reader (Synergy™ HT, Biotek, Vermont, USA). The biofilm formation data were expressed as means ± SD. Based on the results from the biofilm assay, the strains were classified into three groups according to absorbance: no biofilm production ($OD_{570} < 0.1$), weak biofilm production ($0.1 \leq OD_{570} \leq 0.2$) and strong biofilm production ($OD_{570} > 0.2$).

The adherence and biofilm assays reference strain EAEC 042 (*aggR*+, aggregative adherence) was used as a positive control, and *E. coli* K12 Hb101 was used as a negative control.

Antimicrobial susceptibility

Antimicrobial susceptibility determined using the disk diffusion method, as recommended by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2008, 2012). All *E. coli* isolates were tested for antimicrobial agents after previous inoculation on Mueller Hinton agar (Difco®, Sparks, Maryland, USA) using a swab. The following antimicrobial agents were used: amoxicillin (AMO, 10 µg), amoxicillin-clavulanic acid (AMC, 30 µg), ampicillin (AMP, 10 µg), aztreonam (ATM, 30 µg), cefotaxime (CTX, 30 µg), imipenem (IPM, 10 µg), tetracycline (TET, 30 µg), gentamicin (GEN, 10 µg), chloramphenicol (CHL, 30 µg), trimethoprim-sulfamethoxazole (SXT, 25 µg), nalidixic acid (NAL, 30 µg), ciprofloxacin (CIP, 5 µg), norfloxacin (NOR, 10 µg) and

streptomycin (STR, 10 µg), colistin (COL, 10 µg) and polymyxin B (POL, 300U) (LaborClin®, Pinhais, Paraná, Brazil). Enrofloxacin (ENR, 5 µg) (LaborClin®, Pinhais, Paraná, Brazil) was also tested because this antimicrobial is commonly used in veterinary clinics. *E. coli* strain ATCC 25922 was used as a quality control for antimicrobial susceptibility testing.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using the χ^2 (Chi-square) test for the bacterial groups. Differences were considered significant at $P < 0.05$, and the data were expressed as the means \pm SD. The statistical analyses were performed using the *BioEstat* version 5.3 software.

Results

***Escherichia coli* isolates, virulence factors and phylogenetic groups**

A total of 64 *E. coli* isolates have been identified, plated on MacConkey agar and biochemistry characterized. Four isolates were positive for APEC pentaplex virulence genes (OF8, OF15, OF40, OF43) (Table 2). Strains OF8 (*iutA*) and OF15 (*iroN*) were positive for only one gene each. However, isolates OF40 (*iutA*, *hlyF*, *iroN*, *iss* and *ompT*) and OF43 (*iutA*, *hlyF*, *iss* and *ompT*) were positive to five and four genes of APEC pentaplex, respectively, characterizing these strains as possible or potential APEC. The *fimH* and *ecpA* genes were found in higher proportions, of 89.0% and 81.2%, respectively. Lower proportions of genes *traT* (32.8%) and *sitA* (6.2%) were found. All isolates were negative for the other eight genes investigated. Description and distribution of genes investigated is shown in Table 2.

All strains were assigned into four main phylogenetic groups. Most strains belonged to phylogenetic groups A, with 38 isolates (59.3%), and B1, with 22 isolates

(34.3%). The groups B2 and D presented three (4.6%) and one (1.5%) isolates, respectively.

Pathogenicity island assay

Two multiplex PCRs were performed for each strain. Five PAIs (III536, IV536, IICFT073, ICFT073 and II536) were observed among the *E. coli* strains. PAI I 536 and PAI I J96 were not detected using this assay. The assay showed that the more prevalent PAI between the positive samples was IICFT073, which was present in 33 strains (51.5%), followed by 13 strains for PAI II536 (20.3%), and 11 strains for PAI III536 (17.1%) ($P < 0.01$). Forty *E. coli* strains were positive for pathogenicity islands (62.5%); among these, 24 strains were positive for only 1 PAI (60%), eight strains for 2 PAIs (20%), and five strains for 3 PAIs (12.5%). Three strains were positive for 4 PAI (7.5%): OF35 (III536, IICFT073, ICFT073, II536), OF51 and OF54 (III536, IV536, IICFT073, II536) (Table 2).

Adherence to HEp-2 cells and biofilm formation

The majority of strains adhered to HEp-2 cells, and three adherence patterns were observed: aggregative, aggregative-diffuse and diffuse. Fifth-eighth of the 64 strains were adherents (90.6%), 43 strains were adherence aggregative (74.1%) ten were adherence aggregative-diffuse (17.2%), one was adherence diffuse (1.7%), four (6.9%) presented adherence but not could be characterized ($P < 0.05$) (Table 2), and six were non-adherent.

Of the 64 isolates, 48 (75%) did not produce biofilm. Among strains that produced biofilm, 12 (18.75%) were classified as moderate biofilm producers and only four (6.25%) as strong biofilm producers ($P > 0.05$) (Table 2).

Antimicrobial susceptibility

Resistance to 17 antimicrobials was examined for all 64 *E. coli* isolates, and it was observed that 32 (50.0%) isolates from organic fertilizer were resistant to at least one antimicrobial. The majority of isolates with antimicrobial resistance were resistant to tetracycline (35.9%), amoxicillin (20.3%), ampicillin (18.7%), streptomycin (17.1%) and trimethoprim-sulfamethoxazole (12.5%). Two isolates were resistant to 5 antimicrobials (OF33 and OF43) and one isolate (OF61) was resistant to 6, and this resistance relationship covered 4 antimicrobial classes. All isolates were susceptible to aztreonam, chloramphenicol, cefotaxime, ciprofloxacin, imipenem, norfloxacin, enrofloxacin, colistin and polymyxin B.

Discussion

Composting is a process used for the biological stabilization of organic and chemical wastes by the transformation of matter (Bernal et al., 2009), and reduces the number of pathogenic microorganisms by the exposure time, high temperature and production of antibiotics by microorganisms due to microbial competition (Hahn, 2004).

During the collection period, it was observed that in practice, few poultry farmers in the region that perform composting process on their properties. Commonly, these poultry farmers used a simple methodology, by simply stacking the poultry litter near or around the plantation, covered or not by a polystyrene canvas. This process quickly increases the temperature of the compost in a few days, as demonstrated by (Bakshi & Fontenot, 1998; Atkinson et al., 1996). The exposure of solid waste compost to temperatures above 60°C reduces species diversity (Strom, 1985). Wilkinson and collaborators (2011) showed that the score of *E. coli* in poultry litter was reduced by >99% in 1 h at 55 or 65°C in laboratory conditions. The final

organic fertilizer was free from pathogens such as *E. coli* strain O157:H7, *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes*; however, 30% of the analyzed samples were positive for *E. coli*, as demonstrated by (Miller et al., 2013). The author concluded that indigenous microorganisms compete with bacterial pathogens for nutrients and inhibit the growth of those pathogens, which explains the isolation difficulties and low numbers of colonies.

The relationship between human and avian ExPEC strains has been researched (Moulin-Schouleur et al., 2007). Although the avian strains may be more virulent to chickens, they are also pathogenic to mammals, which presents a zoonotic risk (Ron, 2006). Because these human and avian ExPEC strains are similar in genetic composition, the potential of APEC as source and reservoir for human ExPEC should be considered.

In our studies, two strains were considered as potential APEC for harboring APEC pentaplex genes, as suggested by Johnson and collaborators (2008). Four other genes investigated were found among isolates of *E. coli* organic fertilizer (*fimH*, *ecpA*, *traT* and *sitA*). Type 1 pili encoded by *fimH* gene plays an important role in host-pathogen (Schwartz et al., 2013). Its expression increases UPEC virulence because the pathogen adhesin its invasion in bladder epithelial cells (Martinez et al., 2000). The *E. coli* common pilus originally called fimbriae Mat (meningitis associated and set temperature) (Garnett et al., 2012), is a common adhesin encoded by the *ecpA* gene (Blackburn et al., 2009), and is strongly associated with neonatal meningitis and sepsis samples.

Some studies suggest that ExPEC samples belonging to groups A and B1, generally have little virulence factors, while samples belonging to the groups B2 and D, harbor a larger number of virulence genes (Ewers et al., 2007). Rodriguez-Siek

and collaborators (2005) demonstrated that the majority of APEC strains belonged to group A (38.0%), whereas most of UPEC strains belonged to group B2 (65.0%). The author suggests there is no uniformity among each of the four phylogenetic groups in UPEC and APEC strains. The distribution of our isolates between phylogenetic groups showed that the majority belonging to the phylogenetic groups A (59.3%) and B1 (34.3%), followed by a low number of isolates to group B2 (4.6%) and D (1.5%), Thus, there is no relationship between the phylogenetic group and strains harboring virulence genes present in our studies. The analyzes in our study did not corroborate other studies involving the phylogenetic groups and virulence factors (Ewers et al., 2007; Kobayashi et al., 2011)

Fifty isolates of *E. coli* from human microbiota were isolated from human microbiota and 20 (40%) these were positive for PAIs (Sabaté et al., 2006). In our study, we analyzed 64 organic avian fertilizer *E. coli* strains, and 40 (62.5%) were negative for all PAI. The most frequent islands in our study were IICFT073 PAI, PAI II536 and PAI III536, whereas in the study of Sabaté and collaborators (2006), the most frequent were PAI IV536, PAI ICFT073, which demonstrates the different distributions of PAIs between samples of commensal *E. coli* and organic avian fertilizer *E. coli*. The author found PAI III536 in 2 (2%) samples but, in our study, PAI was found in nearly 18% of the samples. Furthermore, PAI IJ96 was not detected in any of the isolates, similar to the findings of. PAI IV536 is presented in the literature as the most abundant PAI in the Enterobacteriaceae family (Schubert et al., 1998; Schubert et al., 2002; Sabaté et al., 2006). According to Middendorf and collaborators (2004), this island is quite stable in *E. coli* 536-O6:K15:H31 (originally isolated from a patient with acute pyelonephritis), which could explain its high frequency. However, in this study, the incidence of this island was not high and

occurred in only 9.37% of the samples. According to some studies, PAI H536 and PAI IJ96 are classified as unstable and can be easily lost (Sabaté et al., 2006) which could explain the low percentage in this study.

Bacterial colonization is one of the most important stages of the infection process. In our study, the great majority of *E. coli* strains adhered to human epithelial cells and the adherence patterns were comparable to DEC pattern described by (Nataro et al., 1987) for aggregative pattern and (Scaletsky et al., 1984) for diffuse adhesion. Our data, showed that aggregative adhesion was the dominant pattern (73%), however, Da Silveira and collaborators (2002) showed three adherence patterns (localized, diffuse and aggregative) in APEC strains, being diffuse adhesion the dominant pattern.

In recent years, the transfer of resistance genes to pathogenic bacteria in humans has been of great concern for public health (Carson et al., 2008). The use of antibiotics in animals and humans has caused an increase in resistance in pathogenic bacteria, as well as in the microbiota of these animals (Van den Bogaard & Stobberingh, 2000). In general, 32 (50%) of our isolates were resistant to at least one antimicrobial. Our isolates showed low resistance levels (Table 2), compared with some countries, such as in feces samples from different chicken farms in east China, where the isolates showed high resistance rates to sulfamethoxazole, nalidixic acid, tetracycline, streptomycin, ampicillin, trimethoprim-sulfamethoxazole, enrofloxacin, ciprofloxacin, norfloxacin and chloramphenicol (Jianguo et al., 2012). Merchant and collaborators (2012) which worked with isolates from poultry litter, showed high resistance rates to tetracycline, ampicillin, amoxicillin-clavulanic acid. Alternatively, this decrease could be a positive effect of the prohibited use of tetracycline, beta-lactams, quinolones and sulfonamides as growth promoters since

2009, and of chloramphenicol since 1999, by the Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply (Normative Instruction N° 26, July 9, 2009). Despite our lower resistance index when compared with others countries, the presence of strains resistant to antimicrobials in our work should be an alert regarding the indiscriminate use of these antimicrobials and the pressure that these bacteria suffer, which leads to emergence of resistant strains.

In summary, we found a low number of virulence genes, as well as a low antimicrobial resistance among isolates. However, the presence of isolates harboring important virulence factors and antimicrobial resistance represents a potential zoonotic risk because these strains serve as a genetic bank for extraintestinal pathogenic *E. coli* strains.

Acknowledgements

We thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), who enabled the execution of this study. We would also like to thank the Virology Laboratory at the Universidade Estadual de Londrina for providing cell cultures and to Erick Kenji Nishio for statistical analysis.

Conflict of interest

No conflict of interest declared

References

- Atkinson, C.F., Jones, D.D., Gauthier, J.J.** 1996. Biodegradability and microbial activities during composting of poultry litter. *Poult. Sci.*; 75:608-617, doi: 10.3382/ps.0750608.
- Bakshi, M.P.S., Fontenot, J.P.** 1998. Processing and nutritive evaluation of broiler litter as livestock feed. *Anim. Feed Sci. Tech.*; 337-345, doi:10.1016/S0377-8401(98)00181-3.
- Bernal, M.P., Albuquerque, J.A., Moral, R.** 2009. Composting of animal manures and chemical criteria for compost maturity assessment. A review. *Bioresour. Technol.*; 100:5444-5453, doi:10.1016/j.biortech.2008.11.027.

- Blackburn, D., Husband, A., Saldaña, Z., Nada, R.A., Klena, J., Qadri, F., Girón, J.A.** 2009. Distribution of the *Escherichia coli* common pilus among diverse strains of human enterotoxigenic *E. coli*. *J. Clin. Microbiol.*; 47(6), 1781-1784, doi:10.1128/JCM.00260-09.
- Blanco, M., Blanco, J.E., Blanco, J., Alonso, M.P., Balsalobre, C., Mourino, M., Madrid, C., Juárez, A.** 1996. Polymerase chain reaction for detection of *Escherichia coli* strains producing cytotoxic necrotizing factor type 1 and type 2 (CNF1 and CNF2). *J. Microbiol. Methods*; 26(1), 95-101, doi:10.1016/0167-7012(96)00900-1.
- Brasil.** 1999. Normas para a produção, tipificação, processamento, envase, distribuição, identificação e certificação da qualidade de produtos orgânicos, sejam de origem animal ou vegetal in Instrução Normativa nº 007 de 17 de maio de 1999. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasil 1999.
- Carson, C.A., Reid-Smith, R., Irwin, R.J., Martin, W.S., McEwen, S.A.** 2008. Antimicrobial resistance in generic fecal *Escherichia coli* from 29 beef farms in Ontario. *Can. J. Vet. Res.*; 72:119-128.
- Clements, A., Young, J.C., Constantinou, N., Frankel, G.** 2012. Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. *G. Microbes*; 3:71-87, doi: 10.4161/gmic.19182.
- Clermont, O., Bonacorsi, S., Bingen, E.** 2000. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66:4555-4558, doi: 10.1128/AEM.66.10.4555-4558.2000.
- CLSI.** 2008. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals Approved Standard., Approved Standard, M31-A3, third ed. CLSI, vol. third ed. CLSI. M31-A3, Wayne, PA, USA.
- CLSI.** 2012. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically, Approved Standard, M07-A9, ninth ed. CLSI, Wayne, PA, USA.
- Cravioto, A., Gross, R.J., Scotland, S.M., Rowe, B.** 1979. An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes. *Curr. Microbiol.*; 3:95-99, doi: 10.1007/BF02602439.
- Da Silveira, W., Ferreira, A., Brocchi, M., Maria de Hollanda, L., Pestana de Castro, A.F., Yamada, A.T., Lancellotti, M.** 2002. Biological characteristics and pathogenicity of avian *Escherichia coli* strains. *Vet. Microbiol.*, 85:47-53, doi: 10.1016/S0378-1135(01)00482-5.
- Dozois, C.M., Dho-Moulin, M., Brée, A., Fairbrother, J.M., Desautels, C., Curtiss, R.** 2000. Relationship between the Tsh autotransporter and pathogenicity of avian *Escherichia coli* and localization and analysis of the Tsh genetic region. *Infect. Immun.* ; 68(7), 4145-4154, doi: 10.1128/IAI.68.7.4145-4154.2000.
- Ewers, C., Li, G., Wilking, H., Kießling, S., Alt, K., Antão, E.M., Laturnus, C., Diehl, I., Glodde, S., Homeier, T., Böhnke, U., Steinruck, H., Phillip, H.C., Wieler, L.H.** 2007. Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: How closely related are they?. *Inter. J. Med. Microbiol.* 297(3), 163-176, doi: 10.1016/j.ijmm.2007.01.003.
- Ewing, W.H.** 1986. Edwards and Ewing's Identification of Enterobacteriaceae. Elsevier Science Publishing Company, New York.
- Furtula, V., Farrell, E.G., Diarrassouba, F., Rempel, H., Pritchard, J., Diarra, M.S.** 2010. Veterinary pharmaceuticals and antibiotic resistance of *Escherichia coli* isolates in poultry litter from commercial farms and controlled feeding trials. *Poult. Sci.*; 89:180-188 doi: 10.3382/ps.2009-00198.
- Garnett, J.A., Martínez-Santos, V.I., Saldaña, Z., Pape, T., Hawthorne, W., Chan, J., Simpson, P.J., Cota, E., Puente, J.L., Girón, J.A., Matthews, S.** 2012. Structural insights into the biogenesis

and biofilm formation by the *Escherichia coli* common pilus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA; v. 109, n. 10, p. 3950-5, doi: 10.1073/pnas.1106733109.

Guan, J., Wasty, A., Grenier, C., Chan, M. 2007. Influence of temperature on survival and conjugative transfer of multiple antibiotic-resistant plasmids in chicken manure and compost microcosms. Poultr. Sci.; 86:610-613, doi: 10.1093/ps/86.4.610.

Hahn, L. 2004. Processamento da cama de aviário e suas implicações nos agroecossistemas. Magister. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brazil.

Jianguo, Y., Weihua, C., Huafu, W., Wei, Z. 2012. Antimicrobial susceptibility and virulence factors of *Escherichia coli* isolates obtained from faeces samples of chickens in east China. Afric. J. Microbiol. Res.; 6:1591-1596, doi: 10.5897/AJMR11.1543.

Johannessen, G.S., Frøseth, R.B., Solemdal, L., Jarp, J., Wasteson, Y., Rørvik, L.M. 2004. Influence of bovine manure as fertilizer on the bacteriological quality of organic iceberg lettuce. J. Appl. Microbiol.; 96(4), 787-794, doi: 10.1111/j.1365-2672.2004.02208.x.

Johnson, J.R., Stell, A.L. 2000. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. J. Infect. Dis.; 181, 1, 261-72, doi: 10.1086/315217.

Johnson, T.J., Wannemuehler, Y., Doetkott, C., Johnson, S.J., Rosenberger, S.C., Nolan, L.K. 2008. Identification of minimal predictors of avian pathogenic *Escherichia coli* virulence for use as a rapid diagnostic tool. J. Clin. Microbiol.; 46:3987-3996, doi: 10.1128/JCM.00816-08.

Kaper, J.B., Nataro, J.P., Mobley, H.L. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. Nat. Rev. Microbiol.; 2:123-140, doi: 10.1038/nrmicro818.

Kobayashi, R.K., Aquino, I., Ferreira, A.L., Vidotto, M.C. 2011. EcoR phylogenetic analysis and virulence genotyping of avian pathogenic *Escherichia coli* strains and *Escherichia coli* isolates from commercial chicken carcasses in southern Brazil. Food. Pathog. Dis. 8:631-634, doi: 10.1089/fpd.2010.0726.

Le Bouguenec, C., Archambaud, M., Labigne, A. 1992. Rapid and specific detection of the *pap*, *afa*, and *sfa* adhesin-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains by polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol.; 30(5), 1189-1193.

Martinez, J.J., Mulvey, M.A., Schilling, J.D., Pinkner, J.S., Hultgren, S.J. 2000. Type 1 pilus-mediated bacterial invasion of bladder epithelial cells. EMBO J.; v.19. p.2803-2812, 10.1093/emboj/19.12.2803.

Mellata, M., Dho-Moulin, M., Dozois, C.M., Curtiss, R., Brown, P.K., Arne, P., Brée, A., Desautels, C., Fairbrother, J.M. 2003. Role of virulence factors in resistance of avian pathogenic *Escherichia coli* to serum and in pathogenicity. Infect. Immun.; 71:536-540, doi: 10.1128/IAI.71.1.536-540.2003.

Merchant, L.E., Rempel, H., Forge, T., Kannangara, T., Bittman, S., Delaquis, P., Topp, E., Ziebell, K.A., Diarra, M.S. 2012. Characterization of antibiotic-resistant and potentially pathogenic *Escherichia coli* from soil fertilized with litter of broiler chickens fed antimicrobial-supplemented diets. Can. J. Microbiol.; 58:1084-1098, doi: 10.1139/w2012-082.

Middendorf, B., Hochhut, B., Leipold, K., Dobrindt, U., Blum-Oehler, G., Hacker, J. 2004. Instability of pathogenicity islands in uropathogenic *Escherichia coli* 536. J. Bacteriol., 186:3086-3096, doi: 10.1128/JB.186.10.3086-3096.2004.

Miller, C., Heringa, S., Kim, J., Jiang, X. 2013. Analyzing indicator microorganisms, antibiotic resistant *Escherichia coli*, and regrowth potential of foodborne pathogens in various organic fertilizers. Food. Pathog. Dis.; 10:520-527, doi: 10.1089/fpd.2012.1403.

Moulin-Schouleur, M., Reperant, M., Laurent, S., Bree, A., Mignon-Grasteau, S., Germon, P., Rasschaert, D., Schouleur, C. 2007. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains of avian and

human origin: link between phylogenetic relationships and common virulence patterns. *J. Clin. Microbiol.*; 45:3366-3376, doi: 10.1128/JCM.00037-07.

Nataro, J.P., Kaper, J.B., Robins-Browne, R., Prado, V., Vial, P., Levine, M.M. 1987. Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. *Pediat. Infect. Dis. J.*; 6:829-831.

Oliveira, F.N.S., Lima, H.J.M., Cajazeira, J.P., Fortaleza, C.E. 2004. Use of compost in organic farming systems. Embrapa Agroindústria Tropical, Brazil.

Oliveira, M., Usall, J., Vinas, I., Anguera, M., Gatiús, F., Abadias, M. 2010. Microbiological quality of fresh lettuce from organic and conventional production. *Food. Microbiol.*; 27:679-684, doi: 10.1016/j.fm.2010.03.008.

Poppe, C., Martin, L.C., Gyles, C.L., Reid-Smith, R., Boerlin, P., McEwen, S.A., Prescott, J.F., Forward, K.R. 2005. Acquisition of resistance to extended-spectrum cephalosporins by *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Newport and *Escherichia coli* in the turkey poult intestinal tract. *Appl. Environ. Microbiol.*; 71:1184-1192, doi: 10.1128/AEM.71.3.1184-1192.2005.

Rodriguez-Siek, K.E., Giddings, C.W., Doetkott, C., Johnson, T.J., Fakhr, M.K., Nolan, L.K. 2005. Comparison of *Escherichia coli* isolates implicated in human urinary tract infection and avian colibacillosis. *Microbiol.*; 151:2097-2110, doi: 10.1099/mic.0.27499-0.

Ron, E.Z. 2006. Host specificity of septicemic *Escherichia coli*: human and avian pathogens. *Curr. Opin. Microbiol.*; 9:28-32, doi: 10.1016/j.mib.2005.12.001.

Russo, T.A., McFadden, C.D., Carlino-MacDonald, U.B., Beanan, J.M., Barnard, T.J., Johnson, J.R. 2002. *IroN* functions as a siderophore receptor and is a urovirulence factor in an extraintestinal pathogenic isolate of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*; 70:7156-7160, doi: 10.1128/IAI.70.12.7156-7160.2002.

Sabaté, M., Moreno, E., Perez, T., Andreu, A., Prats, G. 2006. Pathogenicity island markers in commensal and uropathogenic *Escherichia coli* isolates. *Clin. Microbiol. Infect.*; 12:880-886, doi: 10.1111/j.1469-0691.2006.01461.x.

Santos, T.M.B., Lucas, J.J., Sakomura, N.K. 2005. Effects of broiler stocking density and poultry litter reuse in broiler performance and poultry litter production. *Rev. Port. Ciên. Vet.*; 553-554:45-52.

Scaletsky, I. C.; Silva, M. L.; Trabulsi, L. R. 1984. Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. *Infect. Immun.*, v. 45, n. 2, p. 534-536, doi: 0019-9567/84/080534-03\$02.00/0.

Schubert, S., Picard, B., Gouriou, S., Heesemann, J., Denamur, E. 2002. *Yersinia* high-pathogenicity island contributes to virulence in *Escherichia coli* causing extraintestinal infections. *Infect. Immun.*; 70:5335-5337, doi: 10.1128/IAI.70.9.5335-5337.2002.

Schubert, S., Rakin, A., Karch, H., Carniel, E., Heesemann, J. 1998. Prevalence of the "high-pathogenicity island" of *Yersinia* species among *Escherichia coli* strains that are pathogenic to humans. *Infect. Immun.*; 66:480-485.

Schwartz, D.J., Kalas, V., Pinkner, J.S., Chen, S.L., Spaulding, C.N., Dodson, K.W., Hultgren, S.J. 2013. Positively selected FimH residues enhance virulence during urinary tract infection by altering FimH conformation. *Proceed. Nat. Acad. Sci.*; 110(39),15530-15537, doi:10.1073/pnas.1315203110.

Strom, P.F. 1985. Effect of temperature on bacterial species diversity in thermophilic solid-waste composting. *Appl. Environ. Microbiol.*, 50:899-905.

Sweeten, J.M., Auvermann, B.W. 2008. Composting Manure and Sludge. *Agrilife Extension*. 479 ed. The Texas A&M University System, Colorado, TX, pp 06-08.

Toledo, M.R.F., Fontes, C.F., Trabulsi, L.R. 1982a. EPM – a modification of Rugai and Araujo medium for simultaneous test of gas production from glucose, H₂S, urease and tryptophan deaminase. *Rev. Microbiol.*; 13:309-315.

Toledo, M.R.F., Fontes, C.F., Trabulsi, L.R. 1982b. MILi – a medium for detection of motility, indole, and lysine decarboxylase. *Rev. Microbiol.*; 13:230-235.

Ubabef. 2013. Annual Report of Brazilian Poultry Association. Brazilian Poultry Union, São Paulo, Brazil.

Van den Bogaard, A.E., Stobberingh, E.E. 2000. Epidemiology of resistance to antibiotics. Links between animals and humans. *Int. J. Antimicrob. Agent.*; 14:327-335, doi: 10.1016/S0924-8579(00)00145-X.

Wakimoto, N., Nishi, J., Sheikh, J., Nataro, J.P., Sarantuya, J., Iwashita, M., Manago, K., Tokuda, K., Yoshinaga, M., Kawano, Y. 2004. Quantitative biofilm assay using a microtiter plate to screen for enteroaggregative *Escherichia coli*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*; 71:687-690.

Wilkinson, K.G., Tee, E., Tomkins, R.B., Hepworth, G., Premier, R. 2011. Effect of heating and aging of poultry litter on the persistence of enteric bacteria. *Poult. Sci.*; 90:10-18, doi: 10.3382/ps.2010-01023.

Yamamoto, S., Terai, A., Yuri, K., Kurazono, H., Takeda, Y., Yoshida, O. 1995. Detection of urovirulence factors in *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. *FEMS Immun. Med. Microbiol.*; 12(2), 85-90, doi: 10.1111/j.1574-695X.1995.tb00179.x.

Zhong, W., Gu, T., Wang, W., Zhang, B., Lin, X., Huang, Q., Shen, W. 2010. The effects of mineral fertilizer and organic manure on soil microbial community and diversity. *Plant. Soil*; 326:523-523, doi: 10.1007/s11104-009-9988-y.

ANEXOS

Table 1. Primer sequence, size of gene and reference for virulence factors, phylogenetic groups and pathogenicity island of *E. coli* from organic fertilizer

Primers	Primer sequence (5'- 3')	Size of gene	Reference
Pathogenicity island			
PAI I536	TAATGCCGGAGATTCATTGTC AGGATTTGTCTCAGGGCTTT	1.800	Sabaté et al., 2006
PAI II536	CTACGTCAGGCTGGCTTTG TCGTGCTCAGTCCGGAATTT	1.000	Sabaté et al., 2006
PAI III 536	CGGGCATGCATC AATTATCTTTG TGTGTAGATGCAGTCACTCCG	200	Sabaté et al., 2006
PAI IV 536	AAGGATTCGCTGTTACCGGAC TCGTCCGGCAGCGTTTCTTCT	300	Sabaté et al., 2006
PAI ICFT073	GGACATCCTGTTACAGCGCGCA TCGCCACCAATCACAGCGAAC	930	Sabaté et al., 2006
PAI IICFT073	ATGGATGTTGTATCGCGC ACGAGCATGTGGATCTGC	400	Sabaté et al., 2006
PAI IJ96	CATGTCCAAAGCTCGAGCC TGGCATCCACATTATCG	400	Sabaté et al., 2006
Phylogenetic groups			
<i>chuA</i>	GACGAACCAACGGTCAGGAT TGCCGCCAGTACAAAGACA	279	Clermont et al., 2000
<i>yjaA</i>	TGAAGTGTACAGAGCGCTG ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC	211	Clermont et al., 2000
<i>TspE4C2</i>	GAGTAATGTCGGGGCATTCA CGCGCCAACAAAGTATTACG	152	Clermont et al., 2000
Virulence factors			
<i>iroN</i>	AATCCGGCAAAGAGACGAACCGCCT GTTCCGGCAACCCCTGCTTTGACTTT	553	Johnson et al., 2008
<i>ompT</i>	TCATCCCGGAAGCCTCCCTCACTACTAT TAGCGTTTGCTGCACTGGCTTCTGATAC	496	Johnson et al., 2008
<i>hlyF</i>	GGCCACAGTCGTTTAGGGTGCTTACC GGCGGTTTAGGCATTCCGATACTCAG	450	Johnson et al., 2008
<i>iss</i>	CAGCAACCCGAACCACTTGATG AGCATTGCCAGAGCGGCAGAA	323	Johnson et al., 2008
<i>iutA</i>	GGCTGGACATCATGGAACTGG CGTCGGGAACGGGTAGAATCG	302	Johnson et al., 2008
<i>ecpA</i>	TGAAAAAAAAAGGTTCTGGCAATAGC CGCTGATGAGGAGAAAGTGAA	483	Blackburn et al., 2009
<i>tsh</i>	GGTGGTGCACTGGAGTGG AGTCCAGCGTGATAGTGG	640	Dozois et al., 2000
<i>hlyA</i>	AAC AAG GAT AAG CAC TGT TCT GGC ACC ATA TAA GCG GTC ATT CCC GTC	1177	Yamamoto et al., 1994
<i>cnf1</i>	AGGATGGAG TTT CCT ATGCAGGAG CAT TCA GAG TCC TGC CCT CAT TAT T	498	Yamamoto et al., 1994
<i>cnf2</i>	AAT CTA ATT AAA GAG AAC CAT GCT TTG TAT ATC TA	543	Blanco et al., 1996
<i>ibeA</i>	AGG CAG GTG TGC GCC GCG TAC TGG TGC TCC GGC AAA CCA TGC	170	Johnson and Steel, 2000
<i>fyuA</i>	TGA TTA ACC CCG CGA CGG AA CGC AGT AGG CAC GAT CTT GTA	880	Johnson and Steel, 2000
<i>sitA</i>	AGGGGGCACAACCTGATTCTCG TACCGGGCCGTTTTCTGTGC	608	Johnson and Steel, 2000
<i>traT</i>	GGT GTG GTG CGA TGA GCA CAG CAC GGT TCA GCC ATC CCT GAG	290	Johnson and Steel, 2000
<i>papC</i>	GAC GGC TGT ACT GCA GGG TGT GGC G ATA TCC TTT CTG CAG GCA GGG TGT GGC	328	Le Bouguéneq et al., 1992
<i>papG</i>	CTG TAA TTA CGG AAG TGA TTT CTG ACT ATC CGG CTC CGG ATA AAC CAT	1070	Johnson and Steel, 2000
<i>fimH</i>	TGCAGAACGGATAAGCCGTGG GCAGTCACCTGCCCTCCGGTA	508	Johnson and Steel, 2000

Table 2. Genotypic and phenotypic characteristics of *E. coli* isolates from organic fertilizer.

Isolate	Virulence genes of ExPEC	Phylogenetic group	Pattern of adherence HEp-2	Phenotype of resistance	Biofilm	Island of pathogenicity
OF 3	<i>fimH / ecpA</i>	A	AA	-	STRONG	-
OF 4	<i>fimH</i>	A	AA	NAL / AMO / STR	WEAK	-
OF 5	<i>traT / fimH / ecpA</i>	A	AA/DA	-	NON-BP	IICFT073
OF 6	<i>traT / fimH / ecpA</i>	A	AA	-	WEAK	IICFT073
OF 11	<i>ecpA</i>	A	AA	AMO / AMP / TET	NON-BP	IV536 / ICFT073
OF 12	<i>traT / fimH / ecpA</i>	A	NA	AMO	NON-BP	IICFT073 / II536
OF 13	<i>traT / fimH / ecpA</i>	A	NA	-	NON-BP	IICFT073
OF 14	<i>traT / fimH / ecpA</i>	A	NA	-	NON-BP	IICFT073
OF 15	<i>IroN</i>	A	AA	AMO / AMC / AMP	WEAK	IICFT073
OF 19	<i>fimH</i>	A	AA	NAL / SXT	NON-BP	-
OF 20	<i>ecpA</i>	A	NC	-	STRONG	IV536
OF 21	-	A	AA	-	NON-BP	IV536 / IICFT073
OF 22	<i>fimH / ecpA</i>	A	AA	-	STRONG	IICFT073
OF 24	<i>fimH / ecpA</i>	A	AA	-	NON-BP	IICFT073 / II536
OF 29	<i>fimH / ecpA</i>	A	NC	AMO / AMP / TET	WEAK	II536
OF 30	<i>fimH / ecpA</i>	A	NC	TET	NON-BP	-
OF 31	<i>fimH</i>	A	NA	NAL / SXT / TET	WEAK	III536 / IICFT073 / II536
OF 32	<i>fimH</i>	A	AA	TET	NON-BP	III536 / IICFT073 / II536
OF 33	<i>sitA / traT / fimH</i>	A	AA	AMO / AMP / STR / SXT / TET	NON-BP	III536 / IICFT073 / ICFT073
OF 34	<i>traT / fimH</i>	A	AA	-	STRONG	III536 / IICFT073 / II536
OF 35	<i>fimH</i>	A	AA	TET	NON-BP	III536 / IICFT073 / ICFT073 / II536
OF 37	<i>fimH / ecpA</i>	A	AA/DA	-	WEAK	-
OF 38	<i>fimH / ecpA</i>	A	NC	-	NON-BP	-
OF 40	<i>sitA / traT / iroN / hlyF / iutA / iss / ompT / fimH / ecpA</i>	A	AA	AMP / STR / SXT / TET	NON-BP	-
OF 41	<i>fimH / ecpA</i>	A	AA/DA	-	NON-BP	-
OF 42	<i>fimH / ecpA</i>	A	AA	-	NON-BP	-
OF 44	<i>fimH / ecpA</i>	A	AA	STR / SXT / TET	NON-BP	-
OF 46	<i>traT / fimH / ecpA</i>	A	AA	STR	NON-BP	-
OF 49	<i>fimH / ecpA</i>	A	AA	-	NON-BP	-
OF 53	<i>fimH / ecpA</i>	A	AA	STR / TET	NON-BP	ICFT073 / II536
OF 55	<i>fimH / ecpA</i>	A	AA	NAL / SXT / TET	NON-BP	III536 / IICFT073
OF 56	<i>traT / fimH / ecpA</i>	A	AA	NAL / SXT / TET	NON-BP	III536 / IICFT073 / ICFT073
OF 57	<i>fimH / ecpA</i>	A	AA	-	NON-BP	IICFT073
OF 58	<i>fimH</i>	A	AA	TET	NON-BP	III536 / IICFT073
OF 59	<i>ecpA</i>	A	AA/DA	AMO / AMP / STR / TET	NON-BP	IICFT073
OF 60	<i>fimH</i>	A	AA	-	NON-BP	IICFT073
OF 61	<i>fimH</i>	A	AA	NAL / AMO / AMC / AMP / STR / TET	NON-BP	IICFT073
OF 63	<i>ecpA</i>	A	AA	-	NON-BP	IICFT073
OF 1	<i>traT / fimH / ecpA</i>	B1	AA	AMO / AMP / TET	NON-BP	-
OF 2	<i>fimH / ecpA</i>	B1	AA/DA	AMO / AMP	WEAK	-
OF 7	<i>traT / fimH / ecpA</i>	B1	NA	-	WEAK	IICFT073

OF 8	<i>sitA / traT / iutA / fimH / ecpA</i>	B1	AA	AMC	NOM-BP	IICFT073
OF 9	<i>traT / fimH / ecpA</i>	B1	AA	AMP	NON-BP	IICFT073
OF 10	<i>traT / fimH / ecpA</i>	B1	AA	AMO	NON-BP	IICFT073
OF 16	<i>traT / fimH / ecpA</i>	B1	AA	STR / GEN / TET	NON-BP	IICFT073
OF 17	<i>fimH / ecpA</i>	B1	AA	-	WEAK	-
OF 18	<i>traT / fimH / ecpA</i>	B1	AA/DA	-	NON-BP	-
OF 23	<i>fimH / ecpA</i>	B1	AA	-	WEAK	IICFT073
OF 27	<i>fimH / ecpA</i>	B1	AA	-	NON-BP	II536
OF 28	<i>fimH / ecpA</i>	B1	AA/DA	-	NON-BP	III536 / IICFT073
OF 39	<i>traT / fimH / ecpA</i>	B1	AA/DA	-	NON-BP	-
OF 45	<i>fimH / ecpA</i>	B1	NA	AMO / AMP / TET	NON-BP	-
OF 47	<i>traT / fimH / ecpA</i>	B1	AA	-	NON-BP	-
OF 50	<i>fimH / ecpA</i>	B1	AA	STR / TET	NON-BP	II536
OF 51	<i>fimH / ecpA</i>	B1	AA	TET	NON-BP	III536 / IV536 / IICFT073 / II536
OF 52	<i>fimH / ecpA</i>	B1	AA	TET	NON-BP	II536
OF 54	<i>fimH / ecpA</i>	B1	AA	TET	NON-BP	III536 / IV536 / IICFT073 / II536
OF 62	<i>fimH / ecpA</i>	B1	AA	-	NON-BP	-
OF 64	<i>ecpA</i>	B1	AA	-	NON-BP	IV536
OF 25	<i>fimH / ecpA</i>	B2	AA	-	NON-BP	IICFT073
OF 26	<i>traT / fimH / ecpA</i>	B2	DA	-	NON-BP	-
OF 36	<i>fimH / ecpA</i>	B2	AA	-	NON-BP	-
OF 48	<i>fimH / ecpA</i>	B2	AA/DA	-	NON-BP	-
OF 43	<i>sitA / traT / hlyF / iutA / iss / ompT / fimH / ecpA</i>	D	AA/DA	AMO / AMP / STR / SXT / TET	NON-BP	-

Biofilm formation: NON-BF - no biofilm formed; STRONG - strong adherence; WEAK - weak adherence.

Adherence patterns: AA - Aggregative; DA - Diffuse; AA/DA - Aggregative-Diffuse; NC - Non-Characteristic; NA - Non-Adherence.

Antimicrobial: amoxicillin (AMO); amoxicillin-clavulanic acid (AMC); ampicillin (AMP); aztreonam (ATM); cefotaxime (CTX); imipenem (IPM); tetracycline (TET); gentamicin (GEN); chloramphenicol (CHL); trimethoprim-sulfamethoxazole (SXT); nalidixic acid (NAL); ciprofloxacin (CIP); norfloxacin (NOR); streptomycin (STR); enrofloxacin (ENR); colistin (COL); and polymyxin B (POL).

3.0 CONCLUSÕES

- Embora presente na carne e cama de frango, um baixo número de cepas de *E. coli* foram isoladas no adubo orgânico.
- A caracterização de *E. coli* isolada de adubo orgânico é de extrema importância, uma vez que, este material é comumente utilizado na agricultura e cepas de *E. coli* foram encontradas neste material.
- A presença de cepas abrigando genes de virulência e resistência aos antimicrobianos, no adubo orgânico, nos alerta sobre um possível risco zoonótico.