

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE VETERINÁRIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

CARACTERIZAÇÃO PATOLÓGICA E MOLECULAR DA COLIBACILOSE EM  
FRANGOS DE CORTE DE MOÇAMBIQUE E EM GALINHAS POEDEIRAS DO BRASIL

**Paula Augusto Taunde**

Porto Alegre  
2021

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**CARACTERIZAÇÃO PATOLÓGICA E MOLECULAR DA COLIBACIOSE EM  
FRANGOS DE CORTE DE MOÇAMBIQUE E EM GALINHAS POEDEIRAS DO  
BRASIL**

**Autor: Paula Augusto Taunde**

**Tese apresentada como requisito parcial  
para a obtenção do grau de Doutor em  
Ciências na área de Medicina Veterinária  
Preventiva e Patologia: Patologia Animal e  
Patologia Clínica.**

**Orientador: Prof. Dr. David Driemeier**

**PORTO ALEGRE**

**2021**

**“O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001”.**

CIP - Catalogação na Publicação

Taunde, Paula Augusto  
Caracterização patológica e molecular da  
colibacilose em frangos de corte de Moçambique e em  
galinhas poedeiras do Brasil / Paula Augusto Taunde.  
-- 2021.  
51 f.  
Orientador: David Driemeier.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, , Porto Alegre, BR-RS, 2021.

1. Colibacilose. 2. Aves. 3. Histopatologia. 4.  
Genes de Virulência. 5. Bacteriologia. I. Driemeier,  
David, orient. II. Título.

Paula Augusto Taunde

**CARACTERIZAÇÃO PATOLÓGICA E MOLECULAR DA COLIBACILOSE EM  
FRANGOS DE CORTE DE MOÇAMBIQUE E EM GALINHAS POEDEIRAS DO  
BRASIL**

Aprovada em 27 SET 2021

APROVADA POR:

---

Prof. Dr. David Driemeier  
Orientador e Presidente da Comissão

---

Profa. Dra. Luciana Sonne  
Membro da Comissão

---

Prof. Dr. Eduardo Conceição de Oliveira  
Membro da Comissão

---

Prof. Dr. Benito Guimarães de Brito  
Membro da Comissão

## DEDICATÓRIA

Dedico esta Tese aos meus pais Augusto Taunde e Deonísia Mozene, ao meu esposo Figueiredo Artur Muinge e aos meus filhos Mézbell, Kyara e Júnior, pelo apoio, amor incondicional e pelos momentos de alegria.

*Meu Paizão amado! Acredito que se fosse possível me ligaria para dizer o quão estás orgulhoso de mim. E eu deste lado em meio as lágrimas de felicidade apenas diria:*

*Saudades de você, meu PAI!!!*

## AGRADECIMENTOS

À Deus, pai do universo, por iluminar meus caminhos, guiar meus passos e pela proteção divina.

A CAPES, pela bolsa concedida durante o período da minha formação, ao meu orientador Professor Doutor David Driemeier pelo auxílio, pelos conselhos, ajuda e disponibilidade em todos os momentos durante todo período. O senhor será sempre especial na minha vida tanto profissional como pessoal. Muitíssimo obrigada Professor por tudo!

Aos meus pais, Augusto Taunde e Deonísia Mozene, pela vida, por me mostrarem o caminho acadêmico e pelo incentivo bem como insistência desde o primeiro ano de escola. No meio de tantas dificuldades sempre pautaram pela formação dos seus descendentes. Obrigado é pouco perante tudo que fizeram por mim.

Agradecimento especial endereço ao meu esposo, pelo suporte, apoio, pelo companheirismo em todos os momentos. Você foi minha bengala que sempre disponível e acessível para me levantar dos momentos de queda que tive, nunca esquecerei; aos meus filhos (3), irmãos (8) e sobrinhos (26) pelos momentos de alegria e de distração rumo ao alcance do objetivo que me fez atravessar o Oceano Atlântico.

Aos avicultores pelo fornecimento de seus animais e por aceitaram que fossem usados para o estudo, vai o meu obrigado.

Ao Professor Doutor Cláudio Laisse, pela facilidade desde o processo para obtenção de carta de aceite, pela força e incentivo durante a coleta das amostras: a frase de ordem que sempre levarei: isso faz parte da formação, Khanimambo!

Ao Professor Doutor Saulo Pavarini e a Professora Doutora Luciana Sonne pelos ensinamentos, pela convivência e pelos momentos de entretenimento e de laser que fizeram parte dessa caminhada, o meu obrigado!

Agradeço também ao senhor Sécio Huo, colega Velosa Mattai da Secção de Anatomia Patológica da FaVet – UEM, pela ajuda durante a realização das necropsias e processamento das amostras.

A senhora Salda e ao senhor Reginaldo, vai o meu obrigado pela ajuda no processamento microbiológico das amostras.

Obrigado às técnicas do Laboratório de patologia da UFRGS (Bárbara e Cíntia), pela ajuda e colaboração no processamento histológico das amostras.

Os agradecimentos se estendem a Dra Virgínia do Laboratório de Virologia da Direção de Ciências Animais, pela ajuda e apoio durante o processamento molecular das amostras (extração de DNA).

Ao Benito do IPVDF, a Professora Doutora Renata Katsuko Takayama Kobayashi, a Maisa Fabiana Menk Costa, Hellen da Universidade Federal de Londrina, um especial agradecimento pela ajuda no processamento molecular das amostras.

Não deixaria de agradecer aos colegas do Setor de Patologia Veterinária da UFRGS (os técnicos, os pós-graduandos, os estagiários e residentes), pela convivência, parceria e pelo apoio. Cada um dos que conheci contribuiu significativamente para o alcance do meu objetivo, especialmente o Matheus Bianchi, Cíntia De Lorenzo, Welden, Paula Reis, Marcele, Lauren, Ana Mori, Bianca Cecco, Luan, Ronaldo Bianchi, Felipe, Jacqueline, Mônica, Luiza e Andréia.

Finalmente, o meu obrigado endereço à todas as pessoas que de forma direta ou indireta contribuíram para a concretização deste sonho.

## RESUMO

A colibacilose aviária é uma doença bacteriana que causa elevados prejuízos na avicultura de todo o mundo. O objetivo deste estudo é descrever os aspectos patológicos, moleculares e bacteriológicos da colibacilose em frangos de corte e em galinhas provenientes de Moçambique e Brasil, respectivamente. O trabalho foi dividido em dois artigos. O primeiro descreve a colibacilose em 49 frangos de três a 35 dias e o segundo faz a pesquisa dos genes de virulência em 15 amostras de frangos e oito de galinhas poedeiras provenientes de Moçambique e Brasil, respectivamente, que vieram a óbito após e submetidos a necropsia para coleta de diversos órgãos para processamento histológico, microbiológico, imunohistoquímico e molecular. Macroscopicamente, em frangos foi observado deposição acentuada de fibrina principalmente no coração [100% (49/49)], fígado [100% (49/49)], rins [8,2% (4/49)] e pulmão [18,4% (9/49)]. Na histologia, a lesão prevalente foi serosite fibrinoheterofílica entremeada em fibrina e acompanhada por agregados bacterianos cocobacilares. Em galinhas poedeiras foi observado durante a necropsia desidratação, palidez da crista, bem como aumento difuso do baço e material friável amarelado na luz intestinal. Microscopicamente, a enterite fibrinoheterofílica associado à fibrina, macrófagos e ocasionais células gigantes multinucleadas e plasmócitos foi a lesão mais prevalente. Na microbiologia, foram isoladas colônias puras de *Escherichia coli* em frangos [24,5% (12/49)] e galinhas poedeiras [12,5% (1/8)], com acentuada marcação positiva na imunohistoquímica para anticorpo anti-*Escherichia coli* em amostras de frango em amostras de frango analisadas. Foi realizada a reação em cadeia de polimerase (PCR) multiplex para pesquisa de cinco genes de virulência de *E. coli* onde houve positividade em 80% (12/15) de frangos de corte e 62,5% (5/8) em galinhas. Com os resultados obtidos, concluiu-se que a colibacilose foi a causa da morte dos frangos e das galinhas em estudo infectadas por cepas patogênicas resistentes e multirresistentes para vários antimicrobianos apesar destas terem proveniência bem como manejo diferente.

**Palavras chave:** Aves. Colibacilose. Histopatologia. Genes de Virulência. Bacteriologia.

## ABSTRACT

*Colibacillosis is a bacterial disease that causes high economic losses in the poultry industry worldwide. The aimed of this study is describe the pathological, molecular and bacteriological aspects of colibacillosis in broiler chickens and in layers from Mozambique and Brazil, respectively. The study was separated in two papers. The first describe the disease in Forty-nine broiler chickens with 3 to 35 days, the second paper screams virulance genes in fifteen poultry and in eight layer samples from Mozambique and Brazil repectively that died and necropsied to histologic, microbiology, imuno-histoquimic and molecular analise. Macroscopically, was observed in broiler chickens severe fibrin deposition mainly in the heart [100% (49/49)], liver [100% (49/49)], kidneys [8.2% (4/49)] and in the lungs [18.4% (9/49)]. Microscopically, the fibrin-hecterofilic enteritis associated with fibrin, macrophags and occasional multinucleated giant cells and plasm cells was prevalent lesion observed. In microbiological culture was isolated E. coli colonies in broilers [24,5% (12/49)] and in hens chickens [12,5% (1/8). 49], with marked positive staining for anti-Escherichia coli antibody in the immunohistochemistry to broilers sample. Multiplex polymerase chain reaction (PCR) was performed for despite to five E. coli virulence genes, there were positivity in 80% (12/15) of broiler chickens and 20% (1/5) in layer. With the results obtained, can conclude that colibacillosis was the cause of death for broiler chickens and layers that were infected with pathogenic and resistant strains for many antimicrobial, although they had origins and management differences.*

**Keywords:** *Poultry. Colibacillosis. Histopathology. Virulence Genes. Bacteriology.*

## SUMÁRIO

<b>1.INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
<b>2.REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>16</b>
<b>3.ARTIGO 1.....</b>	<b>23</b>
<b>4.ARTIGO 2.....</b>	<b>32</b>
<b>5.CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>50</b>
<b>6.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>51</b>

## 1.INTRODUÇÃO

A avicultura de corte é de grande importância na produção, acessibilidade e disponibilidade mundial de proteína animal em comparação com outras fontes de proteína (FAO, 2013; ABALAKA *et al.*, 2017), o que favoreceu a ocorrência de inúmeras mudanças neste setor com o intuito de melhorar a cadeia de produção de frangos (FAO, 2013).

Este melhoramento consiste em aumentar cada vez mais a densidade das aves além da tecnificação do manejo, o que propicia a ocorrência e disseminação de doenças infecciosas virais ou bacterianas (ABALAKA *et al.*, 2017), que são responsáveis por elevadas perdas na avicultura industrial em todo mundo (KHATON *et al.*, 2005; CAVERO *et al.*, 2009).

A maioria das doenças em aves de corte são causadas por agentes bacterianos, como a *Escherichia coli* (*E.coli*), bactéria comensal do trato gastrointestinal (KABIR, 2010), das vias respiratórias superiores (GUABIRABA & SCHOULER, 2015), bem como da pele e penas das aves (DHO-MOULIN & FAIRBROTHER, 1999). Esta bactéria é responsável por um quadro localizado ou sistêmico denominado colibacilose (CAVERO *et al.*, 2009; GUABIRABA & SCHOULER, 2015; DE CARLI *et al.*, 2015), e pode agir como agente primário ou secundário (KABIR, 2010; ABALAKA *et al.*, 2017).

Esta doença apresenta distribuição mundial, e é a mais diagnosticada em países africanos (ANYANWU EZEASOR; NGWU, 2014; ABALAKA *et al.*, 2017) incluindo Moçambique (FAO, 2013), onde causa inúmeros prejuízos devido principalmente a redução da conversão alimentar, baixo ganho de peso, aumento dos custos com tratamento, morte das aves, condenação de carcaças (CAVERO *et al.*, 2009; AL-ARFAJ *et al.*, 2015; CASAGRANDE *et al.*, 2017) e baixa taxa de eclosão (DHO-MOULIN & FAIRBROTHER, 1999; BARNES; NOLAN, VAILLANCOURT, 2008; DZIVA & STEPHENS, 2008).

A ocorrência da doença depende da interação entre fatores predisponentes e cepas altamente patogênicas responsáveis pela resistência, sobrevivência e disseminação bem como manutenção da infecção no hospedeiro (KABIR, 2010, GUABIRABA & SCHOULER, 2015). A patogenicidade da bactéria é garantida por vários genes e factores de virulência que definem o quadro clínico-patológico (BARNES; NOLAN, VAILLANCOURT, 2008; ABALAKA *et al.*, 2017).

A pecuária em Moçambique apresenta além de papel financeiro, também social e cultural para a população moçambicana (PERTTULA, 2009; FAO, 2013), com o segmento aviário a dominar o espaço (MA, 2011; NICOLAU; BORGES; DE SOUZA, 2011). A avicultura de corte é praticada majoritariamente por pequenos criadores de maneira

independente e na maioria das vezes em condições sanitárias precárias (INE, 2011; FAO, 2013). Esta atividade apresenta inúmeros benefícios por servir como fonte de renda, participar na geração de emprego, além de garantir a segurança alimentar pela disponibilidade e acessibilidade de proteína animal em comparação com outras fontes de proteínas (CARRILHO *et al.*, 2016; OPPEWAL; DA CRUZ; NHABINDE, 2016).

Apesar do crescimento contínuo da avicultura moçambicana nas últimas décadas (OPPEWAL; DA CRUZ; NHABINDE, 2016), este setor enfrenta vários obstáculos com destaque de problemas sanitários, devido a surtos frequentes de colibacilose que culmina com mortalidade massiva das aves desde os primeiros dias de vida (FAO, 2013).

A doença constitui a principal causa de baixa produtividade em todo mundo tanto na avicultura de corte como de postura (JOHNSON *et al.* 2008; DE CARLI *et al.*, 2015; ABALAKA *et al.*, 2017), devido a existência de várias cepas da bactéria altamente virulentas (BARNES; NOLAN, VAILLANCOURT, 2008; BORZI *et al.*, 2018) e resistentes a vários antimicrobianos (GUABIRABA & SCHOULER, 2015; VOUNBA *et al.*, 2019) o que dificulta o sucesso do tratamento, daí a importância do estudo dos fatores extrínsecos e intrínsecos envolvidos na patogênese e patogenicidade da doença tanto em pequenos, médios como em grandes avicultores. O objetivo geral deste trabalho é descrever os aspectos epidemiológicos, patológicos e moleculares da colibacilose em frangos de corte de Moçambique e em galinhas poedeiras do Brasil.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Etiologia

*Escherichia coli* (*E. coli*) é uma bactéria da família Enterobacteriaceae, gram-negativa, cocobacilar (NAKAZATO *et al.*, 2009; KABIR, 2010; GUABIRABA & SCHOULER, 2015), anaeróbica facultativa (NAKAZATO *et al.*, 2009), não formadora de esporos, móvel, com tamanho que varia de 2-3 x 0,6 µm, causadora de uma das principais doenças infecciosas em várias espécies aviárias, a colibacilose (BARNES; NOLAN; VAILLANCOURT, 2008; DZIVA & STEVENS, 2010; GUABIRABA & SCHOULER, 2015).

Dentre vários sorotipos existentes, os que estão relacionados com a doença clínica em pelo menos 15 a 60% dos casos são O1, O2 e O78 (DHO-MOULIN & FAIRBROTHER, 1999; EWERS *et al.*, 2003; DZIVA & STEVENS, 2010).

*E. coli* dispõe de vários fatores de virulência, o que inclui adesinas, toxinas, protectinas, mecanismos de aquisição de ferro e invasinas (DHO-MOULIN & FAIRBROTHER, 1999; NAKAZATO *et al.*, 2000). Há ainda sistema de resistência à bactericidas, cápsula, temperatura sensível a hemaglutinina (DHO-MOULIN & FAIRBROTHER, 1999), metabolismo de glicose, sistema de autotransportadores, e complexos de lipopolissacarídeos (EWERS *et al.*, 2003) que garantem a sua sobrevivência, resistência aos fagócitos e sua patogenicidade (NAKAZATO *et al.*, 2000).

Mais de 40 genes de virulência de *E. coli* são conhecidos e estes são responsáveis pela resistência, sobrevivência e proliferação da bactéria no hospedeiro (BARNES; NOLAN, VAILLANCOURT, 2008; BORZI *et al.*, 2018). Contudo, os mais detectados e usados para diferenciar as cepas patogênicas das cepas não patogênicas (fecais) incluem *sitA*, *iroN*, *hlyF*, *iss*, *iutA* e *etsA* (BARNES; NOLAN, VAILLANCOURT, 2008), além de *cvaC*, *tsh*, *fyuA*, *irp-2*, *ompT*, and *hlyF* (DE CARLI *et al.*, 2015).

*E. coli* aviária patogênica (APEC) também pode estar envolvida em quadros extra-intestinais em outras espécies incluindo em humanos (ExPEC), o que sugere um potencial zoonótico da bactéria (NAKAZATO *et al.*, 2009; DE CARLI *et al.*, 2015; VOUNBA *et al.*, 2019).

Algumas características morfo-tintoriais são típicas da *E. coli*. Em Ágar tergitol-7, as colônias aparecem de coloração amarelada, já em Ágar MacConkey, são rosa brilhante com precipitado ao redor, ou podem apresentar coloração escura com brilho metálico quando inoculadas em eosina-azul de metileno (EMB) (DHO-MOULIN & FAIRBROTHER, 1999; BARNES; NOLAN, VAILLANCOURT, 2008).

### 2.3 Colibacilose em aves

A colibacilose é de ocorrência mundial e constitui um dos maiores obstáculos na avicultura (KHATON *et al.*, 2005; CAVERO *et al.*, 2009), devido a mortalidade massiva das aves, além de desenvolvimento retardado, formação de lotes desuniformes (ASK *et al.*, 2006), queda de postura e condenação de carcaças (CAVERO *et al.*, 2009; AL-ARFAJ *et al.*, 2015; CASAGRANDE *et al.*, 2017).

Várias espécies aviárias de qualquer idade são susceptíveis à doença, com destaque para frangos (CAVERO *et al.*, 2009; ABALAKA *et al.*, 2017), perus e patos (DE CARLI *et al.*, 2015). Contudo infecções naturais já foram relatadas em poedeiras (CAVERO *et al.*, 2009), pombos, avestruz, emas, aves aquáticas, galinha d'angola e em codornas (BARNES; NOLAN, VAILLANCOURT, 2008; AL-ARFAJ *et al.*, 2015; BORZI *et al.*, 2017).

A ocorrência da doença resulta da interação de vários fatores predisponentes, aliado ao comprometimento dos mecanismos de defesa do hospedeiro e, conseqüentemente, aumento da susceptibilidade (KABIR, 2010; DE CARLI *et al.*, 2015). A colibacilose pode ser agravada pela presença de co-infecções bacterianas ou virais (DOU *et al.*, 2015).

Dentre os fatores predisponentes, são incluídos os de origem viral como Adenovírus Tipo I, Pneumovírus, Vírus da enterite hemorrágica, Coronavírus (Bronquite infecciosa), Doença de Newcastle, Influenza, Reovírus e Vírus da Anemia infecciosa aviária (BARNES; NOLAN, VAILLANCOURT, 2008; CASAGRANDE *et al.*, 2019).

Em relação aos fatores de origem parasitária, há destaque para forma larval da *Ascaridia*, *Eimeria* spp., *Cryptosporidium*, *Histomonas*) e de origem bacteriana, que inclui Bordetela aviária, *Pasteurella multocida*, *Campylobacter jejuni*, *Mycoplasma* spp. e *Chlamydophila* sp.) (KHATON *et al.*, 2005; BARNES; NOLAN, VAILLANCOURT, 2008; DZIVA & STEVENS, 2010).

Comorbidades alimentares como hipervitaminoses A e E, e avitaminose A, podem ser consideradas participantes na promoção da colibacilose, bem como o manejo inadequado, ventilação deficiente, contaminação ambiental, fornecimento de água e ração contaminada, restrição alimentar, temperaturas extremas, excesso de amônia e índices elevados de micotoxinas (BARNES; NOLAN, VAILLANCOURT, 2008; KABIR, 2010; CASAGRANDE *et al.*, 2017).

As principais vias de transmissão descritas em caso de colibacilose, incluem a infecção por inalação de partículas contaminadas, que conseqüentemente resulta na forma septicêmica da doença (CAVERO *et al.*, 2009; GUABIRABA & SCHOUER, 2015), contudo a via oro-

fecal e a transmissão vertical ocorrem com frequência e favorece a disseminação do agente (KABIR, 2010; ABALAKA *et al.*, 2017).

#### **2.4 Patogênese**

Dependendo dos fatores envolvidos na instalação da doença, o período de incubação é geralmente curto (de 1 a 3 dias) (KABIR, 2010; ABALAKA *et al.*, 2017). Após a infecção, dois fatores de virulência (adesinas e fímbrias) favorecem a fixação da bactéria e, subsequentemente, a sua multiplicação e disseminação (BARNES; NOLAN; VAILLANCOURT, 2008). Esta etapa procede com extravasamento e disseminação da bactéria pelo organismo (BARNES; NOLAN; VAILLANCOURT, 2008), aumento de produção e secreção de citocinas IL-1, IL-6 e o fator de necrose tumoral, e, conseqüentemente acúmulo de fluidos e proteínas nos tecidos (ASK *et al.*, 2006; BARNES; NOLAN; VAILLANCOURT, 2008). Nesta fase as aves reduzem o consumo de ração e ingestão de água, ocorre perda peso, redução da estrutura óssea tornando o osso suscetível a fraturas (BARNES; NOLAN; VAILLANCOURT, 2008).

Com o aumento da produção dos fatores quimiotáticos, o exsudato torna-se grosseiro com predomínio de macrófagos, plasmócitos e linfócitos, que se transforma em massa firme, seca, de coloração amarelada, com superfície irregular, semelhante a um queijo (cáseo) (BARNES; NOLAN; VAILLANCOURT, 2008).

#### **2.5 Epidemiologia**

*E. coli* é uma bactéria de distribuição cosmopolita e os vários sorotipos da mesma encontram-se na flora intestinal das aves (KABIR, 2010; DE CARLI *et al.*, 2015; GUABIRABA & SCHOULER, 2015) e em outros animais, incluindo humanos (BARNES; NOLAN; VAILLANCOURT, 2008). A bactéria também coloniza vias aéreas superiores (GUABIRABA & SCHOULER, 2015; EWERS *et al.*, 2004), além de pele e penas das aves (DHO-MOULIN & FAIRBROTHER, 1999).

Contudo, acredita-se que pelo menos 10 a 15 % das aves saudáveis são portadoras e excretoras das formas patogênicas da bactéria, fato que favorece a disseminação do agente nas granjas (BARNES; NOLAN; VAILLANCOURT, 2008).

Várias são as fontes de infecções das aves, desde a contaminação fecal dos ovos (EWERS *et al.*, 2004), que culmina com alta mortalidade de aves jovens e morte embrionária, além da disseminação do agente através da distribuição de pintos infectados (ABALAKA *et al.*, 2017).

A contaminação horizontal através de contato entre aves, fezes, e camas infectadas favorece a permanência da bactéria por longos períodos e assim infecção dos lotes subsequentes em casos de má higiene das granjas (EWERS *et al.*, 2003; ABALAKA *et al.*, 2017). Além disso, quantidades consideráveis de cepas patogênicas estão presentes na ração e na água, o que contribui para introdução de novos sorotipos nos plantéis avícolas (DHO-MOULIN & FAIRBROTHER, 1999).

Em poedeiras o impacto da colibacilose é notório, pois as que se recuperam da doença tornam-se portadoras da bactéria e passam a produzir ovos contaminados em mais 26% da sua produção (BARNES; NOLAN; VAILLANCOURT, 2008).

Geralmente a morbidade e mortalidade são altas (mais de 20%) (DHO-MOULIN & FAIRBROTHER, 1999) e varia de acordo com a forma clínica e virulência do agente (BARNES; NOLAN; VAILLANCOURT, 2008; BORZI *et al.*, 2018).

## **2.6 Sinais clínicos e lesões**

Os sinais clínicos observados são variados e dependem dos fatores envolvidos na patogenicidade da doença e do quadro clínico-patológico (DOU *et al.*, 2015), este último que é inversamente relacionado à virulência da bactéria, porque aves infectadas pelas cepas altamente virulentas morrem antes de desenvolverem lesões típicas da doença (BARNES; NOLAN; VAILLANCOURT, 2008).

Em infecções localizadas geralmente observa-se febre, depressão, incoordenação motora, perda de peso, torcicolo e fezes de coloração esverdeada, brancas por vezes amareladas também podem ser visualizadas (BARNES; NOLAN; VAILLANCOURT, 2008; ABALAKA *et al.*, 2017). Aves com quadro septicêmico geralmente não se alimentam, isolam-se, ficam apáticas, prostradas, com os olhos fechados, pescoço e asas caídas e não reagem aos estímulos (BARNES; NOLAN; VAILLANCOURT, 2008).

A interação entre a virulência da bactéria, dose infectante, estado imune, duração da infecção, bem como idade e espécie das aves, determina o padrão e a gravidade do quadro, e a forma de apresentação da doença (localizada ou sistêmica) (KABIR, 2010; GUABIRABA & SCHOULER, 2015; DE CARLI *et al.*, 2015).

A forma localizada em pintos ocorre através da entrada da bactéria pelo umbigo não cicatrizado que acaba afetando o saco vitelino (onfalite) (GUABIRABA & SCHOULER, 2015), onde é possível observar aumento de volume e vermelhidão local, bem como distensão do abdômen (BARNES; NOLAN; VAILLANCOURT, 2008; KABIR, 2010). Outra forma

localizada que ocorre com frequência é a Síndrome da cabeça inchada, lesão que afeta a cabeça e face das aves adultas (KABIR *et al.*, 2010).

Em aves de postura, a colibacilose venérea é fatal e ocorre frequentemente após a primeira inseminação. A lesão é caracterizada por inflamação do oviduto (salpingite), da cloaca, do ceco, além de prolapso, peritonite e retenção de ovos (BARNES; NOLAN; VAILLANCOURT. 2008; GUABIRABA & SCHOULER, 2015). A mucosa afetada fica espessada, ulcerada e coberta por uma membrana diftérica, que causa obstrução do trato reprodutivo inferior (BARNES; NOLAN; VAILLANCOURT, 2008).

O quadro septicêmico, que é mais abrangente e fatal, caracteriza-se por uma poliserosite no sistema respiratório (aerossaculite, pleurite, pneumonia) e em cavidades celomática (pericardite, peri-hepatite e miocardite) (DZIVA & STEVENS, 2008; CASAGRANDE *et al.*, 2017). Nas incubadoras é frequente nas primeiras 24 - 48 horas após a eclosão e resulta na mortalidade de 10 a 20% dos pintos. (BARNES; NOLAN; VAILLANCOURT, 2008).

Uma forma incomum da colibacilose septicêmica, mas que apresenta uma taxa de mortalidade acima de 75% é o coligranuloma (doença de Hjarre), lesão que ocorre esporadicamente em galinhas e perús (KABIR, 2010) e caracterizada por vários granulomas multifocais em diversos órgãos como no fígado, ceco, duodeno e no mesentério (BARNES; NOLAN; VAILLANCOURT, 2008; KABIR, 2010).

A lesão histológica da colibacilose é caracterizada por acentuado infiltrado predominantemente de heterófilos degenerados, acompanhados por ocasionais macrófagos, raras células gigantes multinucleadas, além de linfócitos e plasmócitos (BARNES; NOLAN; VAILLANCOURT, 2008; CASAGRANDE *et al.*, 2017).

Em meio ao infiltrado são encontrados frequentemente agregados bacterianos cocobacilares, e deposição de fibrina (DOU *et al.*, 2015; ABALAKA *et al.*, 2017). Geralmente as aves que se recuperam da forma septicêmica desenvolvem algumas sequelas residuais, como a fibrose hepática, ascite, meningite, encefalite, pan-oftalmite (BARNES; NOLAN; VAILLANCOURT, 2008), artrite, sinovite, salpingite e osteomielite (DZIVA & STEVENS, 2008).

## **2.7 Diagnóstico**

O diagnóstico da colibacilose é feito através da associação dos aspectos clínicos, achados anatomopatológicos, aliados ao isolamento e identificação da bactéria (DHO-MOULIN & FAIRBROTHER, 1999; BARNES; NOLAN; VAILLANCOURT, 2008).

Contudo, deve se evitar a contaminação com conteúdo intestinal dos outros órgãos (DHO-MOULIN & FAIRBROTHER, 1999) e amostras de aves em avançado estado de autólise, por estas apresentarem maior chance de contaminação pelas cepas comensais (BARNES; NOLAN; VAILLANCOURT, 2008). Testes histoquímicos (DHO-MOULIN & FAIRBROTHER, 1999) e moleculares podem também ser usados no diagnóstico de cepas patogênicas (DE LORENZO *et al.*, 2018).

No diagnóstico diferencial da colibacilose devem ser incluídas as doenças que cursam de maneira septicêmica, como a pasteurelose, salmonelose (BARNES; NOLAN; VAILLANCOURT, 2008; BASHAHUN & AMINA, 2017), coccidiose (BASHAHUN & AMINA, 2017) e estreptococose (DEBROY *et al.*, 2008).

## **2.8 Tratamento e controle**

O tratamento da colibacilose é realizado com o uso de antimicrobianos (CAVERO *et al.*, 2009; BORZI *et al.*, 2015; GUABIRABA & SCHOULER, 2015), que podem ser associados ao uso de estimulantes de fagócitos (ácido ascórbico, corticosterona e deoxicorticosterona) (DHO-MOULIN & FAIRBROTHER, 1999).

Todavia, o uso indiscriminado dos antimicrobianos favoreceu a ocorrência de resistência da bactéria para vários antibióticos (GUABIRABA & SCHOULER, 2015; BORZI *et al.*, 2015; VOUNBA *et al.*, 2019), que incluem a tetraciclina, sulfonamida, ampicilina, estreptomicina (BARNES; NOLAN; VAILLANCOURT, 2008; BORZI *et al.*, 2018), penicilina, cefalosporinas e cefalotina (BORZI *et al.*, 2018).

Este incidente despertou atenção para a busca de métodos alternativos como o uso de prebióticos, probióticos, enzimas, acidificantes digestivos, vitaminas, intensificadores do sistema imunológico, antiinflamatórios, apesar da eficácia da maioria deles ser escassa (BARNES; NOLAN; VAILLANCOURT, 2008).

O controle eficaz da colibacilose depende de ações que permitam a identificação e eliminação dos fatores predisponentes aliados ao melhoramento do manejo (DHO-MOULIN & FAIRBROTHER, 1999; GUABIRABA & SCHOULER, 2015).

Uma das formas consiste em evitar a contaminação fecal dos ovos como forma de reduzir a distribuição de pintos infectados (coletar ovos com frequência, manter o material do ninho limpo, descartar ovos rachados ou com contaminação fecal visível, além de fumigar ou desinfetar os ovos dentro de 2 horas após a coleta) (DHO-MOULIN & FAIRBROTHER, 1999; BARNES; NOLAN; VAILLANCOURT, 2008).

A adoção de boas práticas de manejo alimentar e de biosseguridade ajudam no controle da colibacilose (ASK *et al.*, 2006; CAVERO *et al.*, 2009), que pode ser feito baseado em dietas ricas em proteínas, vitaminas A e E e selênio, fornecimento de água de boa qualidade, melhoramento da qualidade do ar, da cama e evitar temperaturas extremas, além de manter a devida higienização dos utensílios (comedouros, bebedouros, exaustores, cortinas e paredes) (DHO-MOULIN & FAIRBROTHER, 1999; BARNES; NOLAN; VAILLANCOURT, 2008).

Outro método muito usado em alguns países para controlar a colibacilose é a vacinação (CAVERO *et al.*, 2009), tanto com vacinas atenuadas, inativadas, recombinantes e de subunidade, além de vacina contra os fatores de virulência específicos (BARNES; NOLAN; VAILLANCOURT, 2008; GUABIRABA & SCHOULER, 2015).

Contudo, nenhuma destas vacinas citadas até então se mostrou completamente eficaz no declínio da doença (CAVERO *et al.*, 2009; GUABIRABA & SCHOULER, 2015), devido ao envolvimento de vários sorogrupos em surtos da doença (BORZI *et al.* 2018).

### 3.MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Local onde foi realizada a pesquisa

Os frangos foram obtidos em granjas localizadas na cidade de Maputo e Matola no Sul de Moçambique. O processamento histológico, bem como o isolamento microbiológico das amostras foram realizados no setor de Anatomia Patológica e Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Veterinária da Universidade Eduardo Mondlane (UEM), Maputo, Moçambique.

A extração do ácido desoxirribonucleico (DNA) das amostras foi feita no Laboratório Central de Veterinária (LCV) da Direção de Ciências Animais (DCA), Maputo, Moçambique. As amostras de tecido emblocadas em parafina e o DNA extraído foram transportados de Moçambique para o Brasil.

As galinhas poedeiras foram obtidas em uma granja localizada na Região do Município Feliz, no Estado do Rio Grande Do Sul, Brasil. A necropsia de 5 aves foram feitas pelo veterinário responsável pela granja e três aves foram necropsiadas no Setor de Patologia Veterinária da UFRGS.

A confecção e coloração de todas as lâminas histológicas, bem como as técnicas de IHQ e PCR para genes de virulência foram realizadas no Setor de Patologia Veterinária (SPV) da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e no Laboratório Molecular do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF), Porto Alegre, Brasil, respectivamente.

Devido à importância da doença na avicultura mundial, esse estudo teve como objetivos: (1) descrever os aspectos epidemiológicos, anatomopatológicos, microbiológicos da colibacilose em frangos de corte do sul de Moçambique; e (2) determinar os genes de virulência de *E. coli* provenientes de frangos e de galinhas poedeiras de Moçambique e Brasil respectivamente acometidos pela doença; (3) Avaliar a sensibilidade e resistência antimicrobiana dos isolados de *E. coli* provenientes de galinhas poedeiras. Desse estudo resultaram dois artigos científicos, que estão incluídos na íntegra mais adiante.

### **3. ARTIGO 1**

Nesse item é apresentado o artigo intitulado:

**Pathological, microbiological and immunohistochemical characterization of avian colibacillosis in broiler chickens of Mozambique.**

Paula Augusto Taunde, Matheus V. Bianchi, Velosa M. Mathai, Cintia De Lorenzo, Benigna D.C.B. Gaspar, Irisalda Maria S.M. Correia, Claudio João M. Laisse and David Driemeier

Artigo publicado no periódico **Pesquisa Veterinária Brasileira**. 41:e06831, 2021



## Pathological, microbiological and immunohistochemical characterization of avian colibacillosis in broiler chickens of Mozambique<sup>1</sup>

Paula Augusto Taunde<sup>2\*</sup>, Matheus V. Bianchi<sup>2</sup>, Velosa M. Mathai<sup>3</sup>,  
Cintia De Lorenzo<sup>2</sup>, Benigna D.C.B. Gaspar<sup>4</sup>, Irisalda Maria S.M. Correia<sup>5</sup>,  
Claudio João M. Laisse<sup>3</sup> and David Driemeier<sup>2</sup>

**ABSTRACT-** Taunde P.A., Bianchi M.V., Mathai V.M., De Lorenzo C., Gaspar B.D.C.B., Correia I.S.M., Laisse C.J.M. & Driemeier D. 2021. **Pathological, microbiological and immunohistochemical characterization of avian colibacillosis in broiler chickens of Mozambique.** *Pesquisa Veterinária Brasileira* 41:e03831, 2021. Setor de Patologia Veterinária, Departamento de Patologia Clínica Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9090, Prédio 42505, Porto Alegre, RS 91540-000, Brazil. E-mail: paulataunde@gmail.com

Avian colibacillosis is an acute and globally occurring infectious disease of domestic and wild birds caused by *Escherichia coli*, and it is associated with considerable economic losses mainly due to the morbidity and mortality associated. The present study aimed to describe the pathological, bacteriological and immunohistochemical aspects of avian colibacillosis in broiler chickens of Mozambique. Forty-nine broiler chicken presented anorexia, decreased weight gain, ataxia, diarrhea, dyspnea, and death in a clinical course of 3-5 days. The birds were raised in five farms (small, medium and large farms) with manual and automatic breeding system, with flocks ranging from 100 to 20,000 birds. At the necropsy, all birds had poor body condition, and the pericardium and the Glisson's capsule of all avian exhibited different degrees of adherence often associated with severe fibrin deposition. The thoracic and abdominal air sacs were thickened and adhered to the costal wall. Mild, moderate or marked hepatomegaly associated with white pinpoint multifocal areas (100%, 49/49) and mild to moderate splenomegaly in 75.5% (37/49) with a mottled surface were observed. The lungs and kidney were enlarged and reddish. Histologically, a multiorgan fibrinoheterophilic polyserositis was observed in 75.5% of the cases (37/49), which were characterized by inflammatory infiltrates composed mainly of degenerative heterophils, macrophages and plasma cells, associated with fibrin deposits and intermixed by coccobacillary bacterial basophilic aggregates. These affected mainly the pericardium (28.6%, 14/49), the pleura (18.4%, 9/49), the Glisson's capsule (10.2%, 5/49), the ventriculus (10.2, 5/33), and the proventriculus (8.2%, 4/49) serosa. Multifocal to coalescing areas of coagulative necrosis associated with similar inflammatory cells were observed mainly in the spleen (28.6%, 14/49), liver (24.5%, 12/49), and intestines (22.4%, 11/49). A similar infiltrate was also observed affecting the the lungs (16.3%, 8/49), the kidney (16.3%, 8/49) and the myocardium (14.3%, 7/49). Isolation and identification of *E. coli* was obtained in 12 cases through bacterial culture. Some organs (2 cases of each farms) were selected and submitted to immunohistochemistry

<sup>1</sup> Received on January 8, 2021.

Accepted for publication on February 16, 2021.

<sup>2</sup> Setor de Patologia Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves 9090, Agronomia, Porto Alegre, RS 91540-000, Brazil. \*Corresponding author: paulataunde@gmail.com

<sup>3</sup> Seção de Anatomia Patológica, Departamento de Para-Clinicas, Faculdade de Veterinária, Universidade Eduardo Mondlane (UEM), Av. de Moçambique Km 15, Maputo, Moçambique.

<sup>4</sup> Seção de Microbiologia, Departamento de Para-Clinicas, Faculdade de Veterinária, Universidade Eduardo Mondlane (UEM), Av. de Moçambique Km 15, Maputo, Moçambique.

<sup>5</sup> Departamento de Produção Animal, Faculdade de Veterinária, Universidade Eduardo Mondlane (UEM), Av. de Moçambique Km 15, Maputo, Moçambique.

anti-*E. coli*, and a positive stain was observed in all tested cases in liver (3/3), heart (4/4), spleen (1/1), lungs (4/4), intestines (4/4), bursa of Fabricius (1/1), ventriculus (1/1), and proventriculus (1/1) tissue sections. These results demonstrate that *E. coli* was the cause of mortality in these birds. Therefore, biosecurity and management measures should be employed to prevent and control the disease occurrence in Mozambique's poultry farming.

INDEX TERMS: Pathology, microbiology, immunohistochemistry, colibacillosis, broiler chickens, Mozambique, avian diseases, infectious diseases, bacteria, *Escherichia coli*, Maputo.

## RESUMO.- [Caracterização patológica, microbiológica e imuno-histoquímica de colibacilose em frangos de corte de Moçambique.]

A colibacilose aviária é uma doença aguda de ocorrência mundial que acomete aves domésticas e silvestres, causada por *Escherichia coli* e resulta em perdas econômicas consideráveis devido à elevada morbidade e mortalidade das aves. O presente estudo teve o objetivo de descrever os aspectos patológicos, bacteriológicos e imuno-histoquímicos de colibacilose aviária em frangos de corte de Moçambique. Um total de 49 frangos de corte apresentaram anorexia, baixo ganho de peso, ataxia, diarreia, dispneia e morte em um curso clínico de 3 a 5 dias. As aves eram provenientes de 5 granjas (pequenas, média e grandes), com sistema de criação manual e automático, com rebanhos que variavam de 100 a 20.000 aves. À necropsia, todas as aves exibiam condição corporal ruim a caquética, além de pericárdio e cápsula de Glisson de todas as aves (100%; n=49) com diferentes graus de aderência e deposição de fibrina de forma difusa acentuada. Os sacos aéreos torácicos e abdominais estavam espessados e aderidos à parede costal. Foi observado ainda hepatomegalia discreta, moderada a severa frequentemente associada com áreas multifocais puntiformes brancocentas (100%; 49/49), e esplenomegalia discreta a moderada, associado a áreas multifocais moteadas (75,5%; 37/49). Os pulmões e rins estavam aumentados e com coloração avermelhada. Histologicamente, observou-se majoritariamente serosite fibrinoheterofílica em 75,5% dos casos (37/49), caracterizadas por infiltrado inflamatório composto por heterófilos degenerados, macrófagos, linfócitos e plasmócitos, com deposição de fibrina entremeada por uma miríade de estruturas bacterianas cocobacilares. Esta lesão foi observada principalmente em pericárdio (28,6%; 14/49), pleura (18,4%; 9/49), cápsula de Glisson (10,2%; 5/49), ventrículo (10,2%; 5/33) e em proventrículo (8,2%; 4/49). Áreas multifocais a coalescentes de necrose de coagulação associada a infiltrado inflamatório semelhante ao descrito foi observado principalmente no baço (28,6%; 14/49), fígado (24,5%; 12/49), e intestinos (8,2%; 4/49). Um infiltrado inflamatório semelhante também foi visualizado em pulmões (16,3%; 8/49), rins (16,3%; 8/49) e miocárdio (14,3%; 7/49). Colônias puras de *E. coli* foram identificadas e isoladas em 12 casos. Alguns órgãos (2 de cada granja) foram submetidos ao exame imuno-histoquímico anti-*E. coli* e marcação positiva foi visualizada em todos os casos testados, como em fígado (3/3), coração (4/4), baço (1/1), pulmão (4/4), intestinos (4/4), bursa de Fabricius (1/1), rim (1/1), ventrículo (1/1) e proventrículo (1/1). Estes resultados demonstram que *E. coli* foi a causa de morte destas aves. Sendo assim, a adoção de boas medidas de biossegurança e de manejo são indispensáveis para a prevenção e controle da ocorrência da doença nas granjas de frango de corte de Moçambique.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Patologia, microbiologia, imuno-histoquímica, colibacilose, frangos de corte, Moçambique, doenças de aves, doenças infecciosas, bactérias, *Escherichia coli*, Maputo.

## INTRODUCTION

Colibacillosis is a bacterial infectious disease that affects domestic and wild birds causing considerable economic losses in industrial and subsistence poultry farms, mainly due to the higher morbidity and mortality, as well as due to the higher costs with medical treatments (Dziva & Stevens 2008, Solà-Ginés et al. 2015). The disease is caused by *Escherichia coli*, a gram-negative, non-spore forming, mobile, cocobacillary bacteria (Barnes et al. 2008, Markey et al. 2013). Many virulence factors have been demonstrated to play a crucial role in the pathogenicity of the strain (Nakazato et al. 2009). In addition, *E. coli* is a commensal bacterium of the intestinal mucosa of birds (Giovanardi et al. 2005, Srinivasan et al. 2014, Guabiraba & Schouler 2015). The presence of some predisposing factors, such as stress, poor immune status, coinfections (Dziva & Stevens 2008, Oliveira et al. 2019), physiological factors, environmental factors, as well as nutritional factors (Barnes et al. 2008), are associated with clinical disease. The disease may occur causing a massive mortality of poultry of multiple ages (Srinivasan et al. 2014). The condition is worldwide distributed and constitutes one of the major challenges in industrial and subsistence poultry (Oliveira et al. 2019, Kim et al. 2020), mainly due to delayed development of affected birds, resulting in uneven batches (Ask et al. 2006), decreased egg production and condemnation of carcasses at the slaughter (Barnes et al. 2008, Al-Arfaj et al. 2016). Colibacillosis may present as a localized or systemic condition (Cavero et al. 2009, Kabir 2010, Guabiraba & Schouler 2015), with the main clinical signs characterized by polyserositis, coligranuloma, omphalitis, septicemia, enteritis, and salpingitis (Barnes et al. 2008, Kabir 2010). The diagnosis of the condition may be obtained by the association of the clinical and pathological features in addition to the isolation and identification of the etiological agent (Barnes et al. 2008, Abalaka et al. 2017).

Mozambique's poultry farming is an important economic activity that generates income and employment in that country (FAO 2013, De Oliveira et al. 2015, MA 2007). Moreover, colibacillosis constitutes one of the major challenges for poultry productivity, being one of the main conditions diagnosed in poultry farming in Mozambique (FAO 2013). Similarly, the condition has been previously described in Africa in poultry of Nigeria (Anyanwu et al. 2014, Abalaka et al. 2017), Zimbabwe (Mbunga & Nyararai 2015), as well as in laying hens of Egypt (Wafaa & Median 2011) and Senegal (Voumba et al. 2019). Despite the lack of reports of colibacillosis in Mozambique, the increased mortality, reduced productivity in poultry, as well as decreased egg production in laying hens constitute an important barrier for poultry industry of this country. Therefore, the aim of this study was to describe the pathological, bacteriological, and immunohistochemical (IHC) findings of colibacillosis in poultry of Mozambique.

## MATERIALS AND METHODS

Birds that died were submitted to necropsy, and multiple fragments of organs were collected, fixed in 10% neutral buffered formalin for 48 hours, routinely processed for histology, embedded in paraffin, cut at 3µm and stained by hematoxylin and eosin (HE). The birds that were severely autolyzed were discarded from this study. During the visits to the farms, information regarding the size of the batch, age of the birds, adopted handling, poultry bedding condition, hygienic conditions, ventilation status, as well as clinical status of the birds were obtained.

For isolation and identification of the agent, samples of the liver, spleen, heart and lungs from 12 birds from different farms were subjected to microbiological analysis. Since the gross pattern of lesions was similar between the farms, at least one sample of each farm was randomly selected for microbiological analysis. Therefore, bacterial culture was performed from samples of three birds from Farm A, three from Farm B, one from Farm C, two from Farm D and three from Farm E. The samples were inoculated onto 5% blood agar and MacConkey agar, incubated for 24 hours at 37°C and the obtained colonies were identified through the association of cultural, morphologic and biochemical characteristics according to Markey et al. (2013).

Diagnosis confirmation was obtained through the detection of *Escherichia coli* antigens within multiple organs by the immunohistochemical technique (IHC). For this, one case of each farm was randomly selected, making a total of 18 tissue fragments: liver, heart, intestines and lungs, spleen, bursa of Fabricius, ventriculus and proventriculus. Antigenic retrieval was obtained by heating the sections with citrate buffer (pH 6.0) for 10 min, and nonspecific reactions were blocked with 5% skinny milk for 15 min at room temperature. The slides were incubated overnight at room temperature with the primary polyclonal antibody anti-*E. coli* (obtained from rabbit, ViroStart, Portland, Maine, USA) at a dilution of 1:200. The amplification signal was achieved by the peroxidase-labeled antibody method (MACH 4, Universal HRP-Polymer, Biocare Medical, Pacheco, California, USA), and the reaction was revealed with the chromogen 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC, Biocare Medical, Pacheco, California, USA). The slides were counterstained with Harris hematoxylin. As negative control, tissue sections of liver, lungs, heart and intestines were incubated with phosphate buffered solution (PBS) instead of the primary antibody, and as positive controls, tissue sections of intestine, liver, heart and lungs positive for *E. coli* infection were employed (De Lorenzo et al. 2018).

## RESULTS

### Epidemiological findings and clinical signs

From December 2018 to February 2019, five broiler chicken farms located at the Maputo and Matola cities, presented increased levels of mortality of the birds with a clinical presentation of weight loss. The farms were classified as small (C), medium (D and E) and large sizes (A and B), and housed, respectively 100-2,000 birds, 2,000 to 20,000 birds, and above 20,000 birds. All farms had conventional buildings, with some particular features among them. Farms A and B had a ventilation system with exhausters fans, roofs with internal isolation system, automatic feeders and nipple drinker's system. The bedding was composed by wood shavings and it was in a good conservation status; however, the hygienic status was poor. Farms C, D and E had manual creation systems, with manual feeders and drinkers, poor

natural ventilation system based on handling side-curtains, the hygiene was poor with moist bedding in advanced state of decay, and sick birds were not segregated. In all farms, during the visit (from 9 a.m. to 16 p.m.) it was noted that all birds had only access to water, were deprived from food, and some of the birds tried to ingest the bedding. In addition, the batches were severely uneven, with small, medium and large birds. Besides that, some birds mainly in three farms presented clinical signs of ataxia, dyspnea, cough, sneezing, white to yellowish diarrhea, and cachexia, especially in small to medium size farms.

The chicks were acquired from local incubators and the feeding was composed of protein, carbohydrates, minerals and vitamins, besides commercially available probiotics. The production cycle of the broilers ranged from 28 to 40 days. All owners highlighted that appropriate sanitary breaks of eight to 15 days were conducted, in addition to routine vaccination for Newcastle disease, infectious bronchitis and infectious bursitis, following the manufacturer instructions and according to the national vaccination program of broiler chicken in Mozambique (Do Amaral & Mlay 2012).

The clinical course varied according to the farms. Farm A housed 18,000 to 20,000 chicks per lot (one month). The birds from this study were 15 to 30 days-old broilers and during the cycle it was registered diarrhea, weight loss, and mortality since the first week of life. Farm B housed 20,000 chicks per day, and the main complaint was weight loss, anorexia, and mortality affecting all age ranges. The farm had its own incubator for the supply of chicks, but it had a poor hatching rate. Farm C was the smallest, located less than 5m from the owner house, with a dog kennel closely and a capacity of 250-300 chicks per cycle. At this location, it was registered weight loss, diarrhea, loss of appetite, and mortality along all productive cycle. Farm D housed up to 5,000 birds per cycle, and presented recurrent cough unresponsive to antibiotic treatment, anorexia, dyspnea, diarrhea, weight loss, and mortality starting at the first week of life. Additionally, at the vicinities of the farm there were areas with cattle, goat and sheep production. Farm E housed 2,000 to 4,000 chicks, with birds presenting a clinical course of ataxia, cough, dyspnea, whitish diarrhea, weight loss, and anorexia. Similarly to Farm D, this farm had at the vicinities areas of cattle, goat and laying hens production.

In all farms, antibiotic treatment was employed with oxytetracycline, streptomycin, erythromycin, and gentamycin, but there was no clinical improvement. The owners highlighted that antibiograms were not previously conducted.

The morbidity rate was high (not estimated) in all farms, while the mortality rate in all productive cycle ranged from 3.9% to 25.6%. During the analyzed period, 15 to 400 birds died per cycle at these farms.

### Necropsy findings

At the external exam, birds from Farms A, D and E had a poor to cachectic body condition when compared to birds from Farms B and C, which had a regular body condition. Table 1 presents the number of birds submitted to necropsy and its age range according to each farm. Birds from Farm D had also ocular seropurulent exudates and torticollis. The birds from Farm E had also ataxia, besides ocular discharge and were in a poor body condition.

**Table 1. Distribution of necropsied animals and age range according to each farm**

Farm	Birds	Age range (days)	Necropsied birds	Conclusive cases
A	16	15 and 28	10	7
B	19	3, 9 and 12	12	10
C	4	30	2	2
D	7	35	7	7
E	25	19 and 20	25	23
Total	71		56	49

In a total, 71 birds were analyzed, of which 56 were submitted to necropsy and a conclusive diagnosis was obtained in 49 cases. The remaining birds were discarded due to severe autolysis. At the internal exam, distinct degrees of adherence and severe fibrin deposits were observed at the pericardium (75.5%, 37/49) (Fig.1), at the Glisson's capsule (75.5%, 37/49) (Fig.2), and at the lungs (61.2%, 30/49) affecting mainly birds with an age range of 9 to 35 days. A variable hepatomegaly (mild, moderate and severe) was observed in all birds, frequently occurring in association to multifocal pinpoint whitish areas (75.5%, 37/49) occasionally reddish (24.5%, 12/49). The liver was yellowish, occasionally orange, in 10.2% of the cases (5/49). Mild to moderate splenomegaly, frequently with a mottled aspect, was observed in birds from all farms, with an exception to Farm D. The thoracic (anterior and posterior) and abdominal air sacs were thickened and adhered in all adult birds. In Farm D, there was only thickening of the thoracic air sacs. Birds from Farms A, B, C, and E had dark-reddish kidneys occasionally covered with fibrin deposits. Birds with diarrhea had a diffuse reddish intestinal mucosa with liquid dark-red to white contents in 8.2% of the cases (4/49).

#### Histopathology

Microscopically, distinct degrees of fibrinoheterophilic serositis were observed mainly involving the pericardium, pleura, air sacs, ventricular and proventricular serosa. The lesion was characterized by a diffuse infiltrate of intact and degenerate heterophils, macrophages often in phagocytic activity, which were intermixed by marked fibrin deposits and a myriad of coccobacilli bacterial structures (Fig.3). A mononuclear infiltrate composed of macrophages, lymphocytes, and plasma cells was observed frequently at the periportal spaces of the liver (Fig.4), at the interstitial space of the kidney and the lungs, as well as in air sacs and myocardium. The liver also presented multifocal to coalescent coagulative necrosis (24.5%, 15/49) and diffuse intracytoplasmic vacuolization of hepatocytes (32.7%, 16/49). The spleen had, mostly in adult birds, fibrinoid necrosis of follicular germinal centers and splenic arterioles (30.6%, 15/49) (Fig.5) and marked white pulp hyperplasia 28.6% (14/49) of the cases, respectively. A moderate enteritis with infiltrate of heterophils, lymphocytes, and plasma cells, often intermixed by multiple coccobacilli bacterial structures at the apical surface of the villi, was observed in 8.2% of the cases (4/49). Circulatory changes characterized by fibrinoid necrosis of blood vessels, thrombosis, congestion and hemorrhages were noted in 63.3% of the cases (31/49) and especially in the liver, lungs, spleen and kidneys. IHC exam anti-*Escherichia coli* revealed

marked multifocal immunolabeling in all fragments analyzed for each farm (Fig.6).

#### Bacteriology

Gram-negative small rods were identified in all 12 samples analyzed, which represented all farms of this study. Based on the biochemical (IMViC: indole+/MR+/VP-/citrate-) and morphological features of the colonies, the isolates were classified as *E. coli*.

#### DISCUSSION

The diagnosis of avian colibacillosis in the present study was obtained through the association of the epidemiological, clinical-pathological, bacteriological, and immunohistochemical findings. Colibacillosis manifests mainly as a septicemic disease involving multiple organs (Dutta et al. 2013, Abalaka et al. 2017). In the present study, the extra-intestinal form was the most frequent and observed mainly in all farms (A, B, C and E). The distinct clinical picture and severity of lesions observed in these farms may be related to the different handlings, vaccination, and bird's nutrition, in addition to some environmental stressful factors (Khaton et al. 2008, Kabir 2010) and immune status (Kabir 2010, Dziva & Stevens 2008). The association of different predisposing factors may result in distinct clinical pictures (Barnes et al. 2008, Abalaka et al. 2017), during the period in which the birds died (summer), the southern region of Mozambique registered high temperatures, varying from 36 to 42°C (INAM 2018). Environmental factors, such as extreme heat, high humidity and poor ventilation, constitutes major challenges in poultry industry world widely, both for industrial and subsistence systems, since it increases bird's susceptibility to diseases, especially with an infectious origin, such as colibacillosis (Chansiripornchai 2009, Casagrande et al. 2017). *Escherichia coli* is an avian commensal agent of the intestinal tract (Barnes et al. 2008, Srinivasan et al. 2014, Guabiraba & Schouler 2015), and, despite several predisposing factors were identified (high temperatures, prolonged fasting, poor ventilation), (Giovanardi et al. 2005, Barnes et al. 2008). Since birds were submitted to prolonged fasting, it may have favored a pursuit for other alternative sources of food, such as bedding. This may have been the infection source, as the agent is frequently found and excreted in feces of both infected and asymptomatic carrier's (Chansiripornchai 2009, Guabiraba & Schouler 2015). Additionally, it is believed that 10-15% of the birds in farms are asymptomatic carriers of pathogenic *E. coli*, and that, in the presence of stressful factors, these birds may develop disease and disseminate the agent throughout the farms (Anyanwu et al. 2014), these can still cause death of these birds and low productivity of the farms as observed in the present study.

*E. coli* infection may be contained by adopting good handling practices, appropriate vaccination and biosecurity measures (Guabiraba & Schouler 2015). In Mozambique, the vaccination against colibacillosis in birds is still not adopted; nonetheless, control and prevention for infectious diseases, including colibacillosis, is obtained through biosecurity measures, which varies according to the farm, but is often poor. This contributes to the settlement of infectious diseases as colibacillosis, which was reported in this study both in large, medium and small farms. Still, colibacillosis outbreaks are also detected in countries that employ the vaccination against the

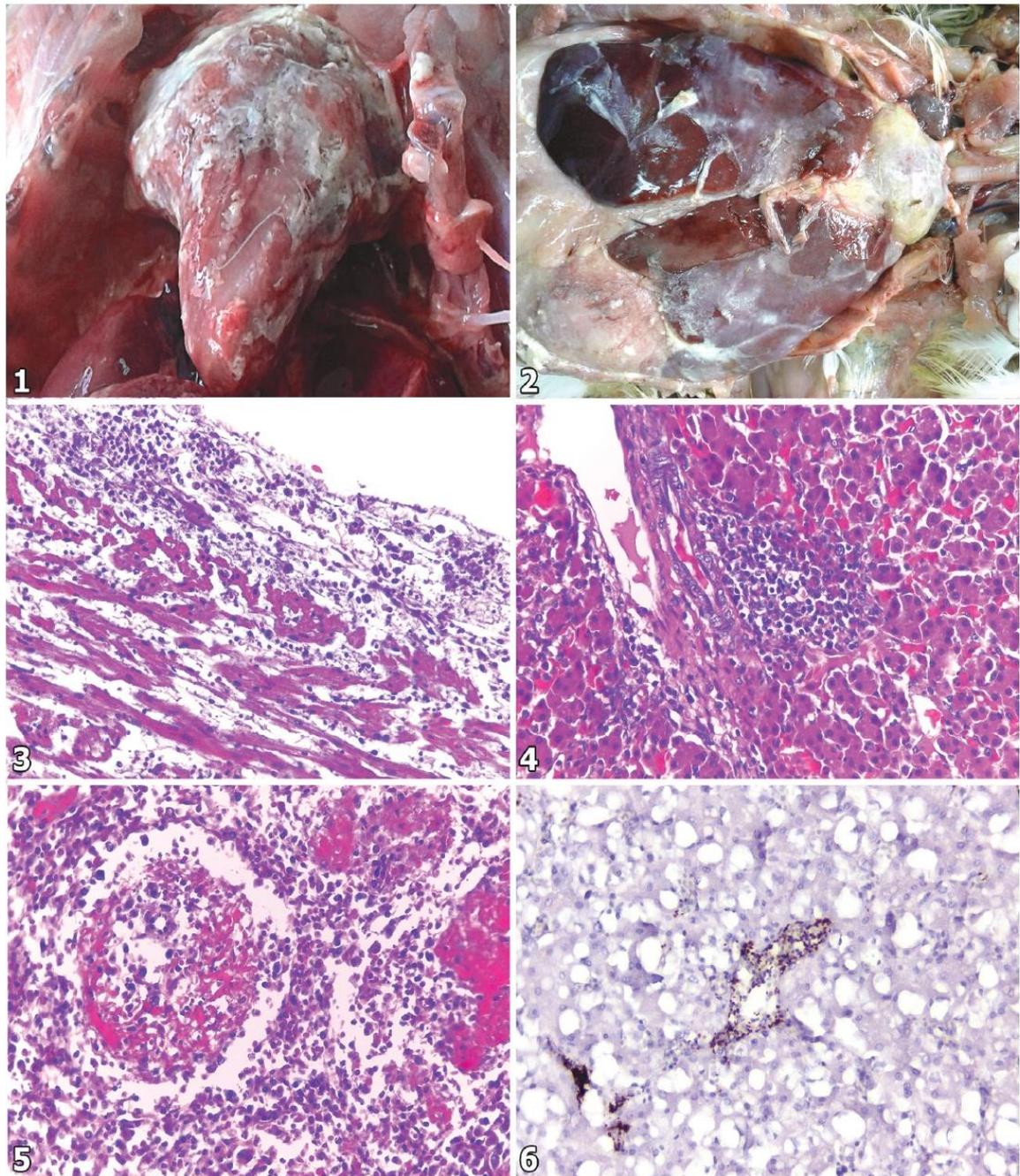


Fig.1-6. (1) Gross and microscopical findings of natural infection by *Escherichia coli* in poultry birds of Mozambique. (2) Heart. Areas of pericardial adherence characterized by severe fibrin deposits. (3) Liver. Enlarged, with multifocal areas covered by fibrin deposits. (4) Heart. Severe thickening of the pericardium with multiple intact and degenerate heterophils, macrophages, lymphocytes, and plasma cells intermixed by fibrin. HE, obj.40 $\times$ . (5) Liver. Moderate infiltrate of macrophages, lymphocytes, and plasma cells predominantly at the periportal spaces. HE, obj.40 $\times$ . (6) Spleen. Fibrinoid necrosis of follicular centers and blood vessels (splenic arteriole). HE, obj.40 $\times$ . (7) Liver. Multifocal immunolabeling for *E. coli* in a periportal area and in sinusoids. IHC anti-*E. coli*, obj.40 $\times$ .

disease, such as in France, India, and Asiatic countries (Cavero et al. 2009, Guabiraba & Schouler 2015, Abalaka et al. 2017). This suggests that the disease is an important cause of low productivity in poultry industry world widely (Cavero et al. 2009, Dutta et al. 2013), as observed in this study.

Colibacillosis affects avian with a wide age range (Kabir 2010, Srinivasan et al. 2014), and in young animals it usually occurs as omphalitis and yolk-sac infection (Abalaka et al. 2017). However, these lesions were not observed in the present study, although three and nine days-old chicks were also affected. The occurrence of the disease in young avian is related, not only to an elevated susceptibility at this age range (Barnes et al. 2008), but also to fecal infection of eggs, as in the present cases. Fecal contamination of eggs and posterior infection of chicks constitutes the major source of infection in these cases, with a challenge in controlling the condition (Barnes et al. 2008, Kabir 2010). This may result, in addition to embryonic death, in supplying infected chicks and, consequently, further spread of the agent, poor development and mortality of the birds due to the disease (Kabir 2010).

The presence of coinfections favors disease occurrence and determines the severity of the colibacillosis (Hossain et al. 2015, Casagrande et al. 2017, Kim et al. 2020). In Mozambique, despite vaccination efforts against the main viral conditions in poultry reports of Newcastle disease, Influenza infection, infectious bronchitis, pasteurellosis and salmonellosis outbreaks are frequent (FAO 2013). This study has not conducted any search for antibodies for these viral agents, yet, we cannot discard a coinfection with these agents in the present cases (Khaton et al. 2008, Hossain et al. 2015). Colibacillosis was the cause of death of all birds in the present study with gross and microscopical typical lesions, in spite of distinct lesion severity, which corroborates with the mortality caused by colibacillosis in broiler chicken (Abalaka et al. 2017) and in ranging from zero to six weeks-old (Hossain et al. 2015). Septicemic colibacillosis is the most frequent condition related to *E. coli* in birds, wherein clinical signs are characterized by depression, fever and high mortality (Kabir 2010), with fibrinoheterophilic polyserositis lesions similarly to the present study, especially in avian beyond 3 days of age. This corroborates the findings in broiler chickens (Abalaka et al. 2017), laying hens (Kabir 2010, Srinivasan et al. 2014), ducks (Barnes et al. 2008) and pigeons (Dutta et al. 2013). Additionally, lesions were observed mainly in the heart, liver, air sacs, pleura and at the serosa of the stomachs.

The inflammatory, necrotic lesions and the degenerative lesions observed in the of the present study, are commonly described in naturally occurring (Dutta et al. 2013, Srinivasan et al. 2014, Abalaka et al. 2017) and experimental cases of colibacillosis (Dwars et al. 2009, Wafaa & Median 2011, Ozaki et al. 2018). Its occurrence is related mainly to vascular lesions caused by bacterial toxins (Wafaa & Median 2011, Srinivasan et al. 2014). The difference at the presentation and severity of lesions in this study may be related to some factors such as handling, age, and feeding of the birds. In laying hens with colibacillosis, intestinal lesions are more prevalent (Khaton et al. 2008), but in our study intestinal involvement was less common than heart, liver, lungs and kidneys involvement. Nonetheless, our findings were similar to those obtained in broiler chickens up to two weeks-old (Wafaa & Median 2011).

Pulmonary involvement is relatively common in *E. coli* infections, and it results from inhalation of bacteria disseminated through direct contact between sick or asymptomatic animals (Horn et al. 2012), as well as through high levels of ammonium or through coinfections by *Mycoplasma* spp., infectious bronchitis virus, pneumovirus, and Newcastle virus (Barnes et al. 2008, Dwars et al. 2009, Casagrande et al. 2017). These agents are related to necrotic lesions of the respiratory epithelium and later bacterial colonization, being bacterial inhalation one of the main forms of air sacs infection in susceptible birds independently of the age (Barnes et al. 2008). In the present study, the birds were housed in bedding in advanced state of decay, which allied to the poor ventilation system may have favored the high levels of ammonia with a subsequent development of colibacillosis (Barnes et al. 2008, Ewers et al. 2004).

The pattern of gross and microscopical lesions of colibacillosis varies individually and according to the virulence of the agent (Oliveira et al. 2019). Spleen is one the main organs affected in septicemic forms of colibacillosis, in which it can be grossly enlarged and mottled by pale areas, while microscopically it may exhibit necrosis of follicular centers, hemosiderosis, lymphoid depletion, besides white pulp hyperplasia (Barnes et al. 2008, Chansiripornchai 2009). These lesions were observed in 35 birds of the present study, and were predominantly characterized by areas with fibrinoid necrosis and lymphoid depletion in agreement with previous findings in broiler chicken of 15 to 34 days-old (Kabir et al. 2010, Abalaka et al. 2017).

Enteritis was observed in the present study and constitutes an unusual finding of avian colibacillosis, in spite of this lesion being commonly described in other mammals affected by *E. coli*, such as humans (Barnes et al. 2008), pigs (De Lorenzo et al. 2018), and cattle (Bashahun & Amina 2017). The clinicopathological picture presented by the birds in this study is similar to that previously described in poultry chicken (Wafaa & Median 2011), pigeons (Dutta et al. 2013) and piglets (De Lorenzo et al. 2018). However, intestinal involvement of colibacillosis depends on some factors involved in the pathogenesis of the condition and varies according to each animal species (Guabiraba & Schouler 2015, Bashahun & Amina 2017).

Antibiotic therapy has been considered an important determinant for reducing economic losses by colibacillosis (Dou et al. 2016, Kim et al. 2020). To mitigate the severity of the clinical picture in these birds, all farms attempted an antibiotic treatment; however, clinical cases continued to occur, what suggests a possible bacterial resistance to the drugs employed. Although antibiograms for the isolates obtained were not conducted in this study, previous studies have described resistance of *E. coli* do a wide array of antibiotics (Dou et al. 2016, Borzi et al. 2018), including those used in the birds of the present study. Bacterial resistance constitutes a major problem in preventing and controlling infectious diseases world widely (Solà-Ginés et al. 2015, Oliveira et al. 2019, Kim et al. 2020). A common practice that may have favored bacterial resistance in these cases is the administration of subtherapeutic doses of antibiotics at the first week of life of birds, which is employed to reduce subsequent occurrence of infectious diseases. Uncontrolled use of antibiotics favors

resistance development of bacteria and difficult the treatment of clinical cases (Solà-Ginés et al. 2015, Dou et al. 2016).

Bacterial isolation and proper morphological and/or biochemical identification constitute an important tool for the diagnosis of infectious diseases, such as colibacillosis (Barnes et al. 2008). Many factors may interfere with the quality of the test, such as the clinical picture, immune status, and antibiotic therapy (Khaton et al. 2008). Additionally, despite antibiotic therapy and factors related to the animals, such as distinct origins and distinct clinical pictures, isolation of pure colonies was obtained from samples of all analyzed farms.

Antigenic detection at immunohistochemical (IHC) analysis is an important tool for the diagnosis of infectious diseases in animals (Dwars et al. 2009). In this study, there was marked multifocal immunostaining in all analyzed tissues. Similarly, previous studies have reported marked multifocal immunostaining for *E. coli* in experimentally infected poultry (Dwars et al. 2009) and in naturally infected pigs (De Lorenzo et al. 2018). IHC was an important tool to confirm the diagnosis in the present study, since a wide array of clinical signs was observed in these birds, which should be differentiated from other diseases with an acute course, such as salmonellosis, pasteurellosis (Barnes et al. 2008, Bashahun & Amina 2017), coccidiosis (Bashahun & Amina 2017), enterococcosis, besides *Klebsiella* sp. infection (DeRoy et al. 2008). Differential diagnosis of salmonellosis was based on the absence of large intestine lesions, of coccidiosis due to the absence of parasite forms in the small intestine, of pasteurellosis due to the involvement of the spleen, as well as the isolation of *E. coli*.

## CONCLUSION

Colibacillosis was the cause of death of these birds, and it is an important cause of low productivity of subsistence producers and poultry industry in Mozambique.

**Acknowledgements.** - We thank the "Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico" (CNPq), the "Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior" (CAPES), and the "Fundo Nacional de Investigação" (FNI - Projeto 16A, 9ª Chamada) for supporting this study. To the lab technicians Leonardo Ngoca and Sercio Huo, from the "Secção de Anatomia Patológica", "Faculdade de Veterinária" of "Universidade Eduardo Mondlane" (UEM), and Salda Ndlalane and Reginaldo Guambe, from the "Secção de Microbiologia" of "Faculdade de Veterinária" of UEM for the technical support. To the owners and managers of the poultry, for making it possible the execution of this study. To the lab technician Bárbara Krebs from the "Setor de Patologia Veterinária" at the "Faculdade de Veterinária" of the "Universidade Federal do Rio Grande do Sul", for the help in performing some of the complementary tests.

**Conflict of interest statement.** - The authors have no competing interests.

## REFERENCES

- Abalaka S.E., Sani N.A., Idoko I.S., Tenuche O.Z., Oyelowo F.O., Ejeh S.A. & Enem S.I. 2017. Pathological changes associated with an outbreak of colibacillosis in a commercial broiler flock. *Sokoto J. Vet. Sci.* 15(3):95-102. <<https://dx.doi.org/10.4314/sokjvs.v15i3.14>>
- Al-Arfaj A.A., Ali M.S., Hessain A.M., Zakri A.M., Dawoud T.M., Al-Maary K.S. & Moussa I.M. 2016. Phenotypic and genotypic analysis of pathogenic *Escherichia coli* virulence genes recovered from Riyadh. *Saudi J. Biol. Sci.* 23(6):713-717. <<https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.11.011>> <PMid:27872566>
- Anyanwu M.U., Ezeasor C.K. & Ngwu M.I. 2014. Case report of misdiagnosis of avian colibacillosis in laying birds. *Anim. Res. Int.* 11(2):1998-2003.
- Ask B., van der Waaij E.H., Stegeman J.A. & van Arendonk J.A.M. 2006. Genetic variation among broiler genotypes in susceptibility to colibacillosis. *Poult. Sci.* 85(3):415-421. <<https://doi.org/10.1093/ps/85.3.415>> <PMid:16553269>
- Barnes H.J., Nolan K.L. & Vaillancourt J-P. 2008. Colibacillosis, p.619-716. In: Saif Y.M., Fadly A.M., Glisson J.R., McDougald L.R., Nolan L.K. & Swayne D.E. (Eds). *Disease of Poultry*. 12th ed. Blackwell Publishing, New Jersey.
- Bashahun G.M. & Amina A. 2017. Colibacillosis in calves: a review of literature. *J. Anim. Sci. Vet. Med.* 2(3):62-71. <<https://dx.doi.org/10.31248/JASVM2017.041>>
- Borzi M.M., Cardozo M.V., Oliveira E.S., Pollo A.S., Guastalli E.A.L., Santos L.F. & Ávila F.A. 2018. Characterization of avian pathogenic *Escherichia coli* isolated from free-range helmeted guineafowl. *Braz. J. Microbiol.* 49(Supl.1):107-112. <<https://dx.doi.org/10.1016/j.bjmm.2018.04.011>>
- Casagrande R.A., Machado G., Guerra P., Castro L.A., Spanemberg A., Silva S.C., Cardoso M.R.I. & Driemeier D. 2017. Caracterização anatomopatológica e bacteriológica em frangos de corte condenados totalmente por colibacilose sob Serviço de Inspeção Federal. *Pesq. Vet. Bras.* 37(9):949-957. <<https://dx.doi.org/10.1590/s0100-736x2017000900009>>
- Cavero D., Schmutz M., Philipp H-C. & Preisinger R. 2009. Breeding to reduce susceptibility to *Escherichia coli* in layers. *Poult. Sci.* 88(10):2063-2068. <<https://dx.doi.org/10.3382/ps.2009-00168>> <PMid:19762857>
- Chansiripornchai N. 2009. Comparative efficacy of enrofloxacin and oxytetracycline by different administration methods in broilers after experimental infection with avian pathogenic *Escherichia coli*. *Thai J. Vet. Med.* 39(3):231-236.
- De Lorenzo C., De Andrade C.P., Machado V.S.L., Bianchi M.V., Rolim V.M., Cruz R.A.S. & Driemeier D. 2018. Piglet colibacillosis diagnosis based on multiplex polymerase chain reaction and immunohistochemistry of paraffin-embedded tissues. *J. Vet. Sci.* 19(1):27-33. <<https://dx.doi.org/10.4142/jvs.2018.19.1.27>> <PMid:28693311>
- De Oliveira C.A.O., Pivoto D., Spanhol C.P. & Corte V.F.D. 2015. Developments and competitiveness of Mozambican chicken meat industry. *Revta Adm. IMED* 5(2):205-216. <<https://dx.doi.org/10.18256/2237-7956/raimed.v5n2p205-216>>
- DeRoy C., Roberts E., Jayarao B.M. & Brooks J.W. 2008. Bronchopneumonia associated with extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in a horse. *J. Vet. Diagn. Invest.* 20(5):661-664. <<https://doi.org/10.1177/104063870802000524>> <PMid:18776106>
- Do Amaral C.C. & Mlay G. 2012. Análise de Custos e Rentabilidade da Produção Frangos no Sul de Moçambique - Estudo de caso na granja da Faculdade de Veterinária. Relatório preliminar de pesquisa no. 1. República de Moçambique. p.1-17.
- Dou X., Gong J., Han X., Xu Mi., Shen H., Zhang D., Zhuang L., Liu J. & Zou J. 2016. Characterization of avian pathogenic *Escherichia coli* isolated in eastern China. *Gene* 576(1 Pt 2):244-248. <<https://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2015.10.012>> <PMid:26475938>
- Dutta P., Borah M.K., Sarmah R. & Gangil R. 2013. Isolation, histopathology and antibiogram of *Escherichia coli* from pigeons (*Columba livia*). *Vet. World* 6(2):91-94. <<https://dx.doi.org/10.5455/vetworld.2013.91-94>>
- Dwars R.M., Matthijs M.G.R., Daemen A.J.J.M., van Eck J.H.H., Vervelde L. & Landman W.J.M. 2009. Progression of lesion in the respiratory tract of broilers after single infection with *Escherichia coli* compared to superinfection with *E. coli* after infection with infectious bronchitis virus. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 127(1/2):65-75. <<https://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2008.09.019>> <PMid:19004507>
- Dziva F. & Stevens M.P. 2008. Colibacillosis in poultry: unravelling the molecular basis of virulence of avian pathogenic *Escherichia coli* in their natural hosts. *Avian Pathol.* 37(4):355-366. <<https://dx.doi.org/10.1080/03079450802216652>> <PMid:18622850>

- Ewers C., Janben T., Kiebling S., Philipp H-C. & Wieler L.H. 2004. Molecular epidemiology of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from colisepticemia in poultry. *Vet. Microbiol.* 104(1/2):91-101. <<https://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2004.09.008>> <PMid:15530743>
- FAO 2013. Poultry Sector Mozambique. FAO Animal Production and Health Livestock Country Reviews No. 5, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Mozambique.
- Giovanardi D., Campagnari E., Ruffoni L.S., Pesente P., Ortali G. & Furlattini V. 2005. Avian pathogenic *Escherichia coli* transmission from broiler breeders to their progeny in an integrated poultry production chain. *Avian Pathol.* 34(4):313-318. <<https://dx.doi.org/10.1080/03079450500179046>> <PMid:16147567>
- Guabiraba R. & Schouler C. 2015. Avian colibacillosis: still many black holes. *Microbiol. Let.* 362(15):1-8. <<https://dx.doi.org/10.1093/femsle/fnv118>> <PMid:26204893>
- Horn F., Corre A.M.R., Barbier N.L., Glodde S., Weyrauch K.D., Kaspers B., Driemeier D., Ewers C. & Wieler L.H. 2012. Infections with avian pathogenic and fecal *Escherichia coli* strains display similar lung histopathology and macrophage apoptosis. *PLoS One* 7(7):e41031. <<https://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0041031>> <PMid:22848424>
- Hossain M.B., Chakma S., Noman A. & Van A. 2015. Prevalence of infectious and non-infectious diseases in different age groups of commercial layer chicken in Feni District, Bangladesh. *J. Vet. Med.* 26(1):35-38.
- INAM 2018. Instituto Nacional de Meteorologia. Available at <<http://opais.sapo.mz/inam-preve-vaga-de-calor-e-vento-com-rajadas-para-maputo-e-gaza>> Accessed on Aug. 8, 2019.
- Kabir L.S.M. 2010. Avian colibacillosis and salmonellosis: a closer look at epidemiology, pathogenesis, diagnosis, control and public health concerns. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 7(1):89-114. <<https://dx.doi.org/10.3390/ijerph7010089>> <PMid:20195435>
- Khaton R., Haider M.G., Paul P.K., Das P.M. & Hossain M.M. 2008. Colibacillosis in commercial chickens in Bangladesh. *Bangladesh Vet.* 25(1):17-24. <<https://dx.doi.org/10.3329/bvet.v25i1.4614>>
- Kim Y.B., Yoon M.Y., Jong S.H., Seo K.W., Noh E.B., Son S.H. & Lee Y.J. 2020. Molecular characterization of avian pathogenic *Escherichia coli* from broiler chickens with colibacillosis. *Poult. Sci.* 99(2):1088-1095. <<https://dx.doi.org/10.1016/j.psj.2019.10.047>> <PMid:32029145>
- MA 2007. Estratégia para o Desenvolvimento do Sub-setor Pecuário 2007-2016. Ministério de Agricultura, República de Moçambique.
- Markey B., Leonardo F., Archambault M., Culinane A. & Maguire D. 2013. *Clinical Veterinary Microbiology*. 2nd ed. Vol.2. Mosby Ltd., St Louis, p.249-254.
- Mbanga J. & Nyararai Y.O. 2015. Virulence gene profiles of avian pathogenic *Escherichia coli* isolated from chickens with colibacillosis in Bulawayo, Zimbabwe. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 82(1):e1-e8. <<https://dx.doi.org/10.4102/ojvr.v82i1.850>> <PMid:26017325>
- Nakazato G., De Campos T.A., Stehling E.G., Brocchi M. & Da Silveira W.D. 2009. Virulence factors of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC)1. *Pesq. Vet. Bras.* 29(7):479-486. <<https://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2009000700001>>
- Oliveira E.S., Cardoso M.V., Borzi M.M., Borges C.A., Guastalli E.A.L. & Ávila F.A. 2019. Highly pathogenic and multidrug resistant avian pathogenic *Escherichia coli* in free-range chickens from Brazil. *Braz. J. Poult. Sci.* 21(1):1-7. <<https://dx.doi.org/10.1590/1806-9061-2018-0876>>
- Ozaki H., Yonehara K. & Murase T. 2018. Virulence of *Escherichia coli* isolates obtained from layer chickens with colibacillosis associated with pericarditis, perihepatitis, and salpingitis in experimentally infected chicks and mbryonated eggs. *Avian Dis.* 62(2):233-236. <<https://dx.doi.org/10.1637/11685-060717-ResNote.1>> <PMid:29944397>
- Solà-Ginés M., Cameron-Veas K., Badiola I., Dolz R., Majó N., Dahbi N.G., Viso S., Mora A., Blanco J., Piedra-Carrasco N., González-López J.J. & Migura-García L. 2015. Diversity of multi-drug resistant avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) causing outbreaks of colibacillosis in broilers during 2012 in Spain. *PLoS One* 10(11):e0143191. <<https://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0143191>> <PMid:26600205>
- Srinivasan P., Balasubramaniam G.A., Murthy T.R.G.K. & Balachandran P. 2014. Pathomorphological studies of polyserositis in commercial caged layer chicken. *Asian Pac. J. Trop. Med.* 7(Supl.1):S313-S320. <[https://dx.doi.org/10.1016/S1995-7645\(14\)60252-2](https://dx.doi.org/10.1016/S1995-7645(14)60252-2)> <PMid:25312143>
- Voumba P., Arsenault J., Bada-Alambédji R. & Fairbrother J.M. 2019. Prevalence of antimicrobial resistance and potential pathogenicity, and possible spread of third generation cephalosporin resistance, in *Escherichia coli* isolated from healthy chicken farms in the region of Dakar, Senegal. *PLoS One* 14(3):e0214304. <<https://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0214304>> <PMid:30913237>
- Wafaa A., El-Ghany A. & Madian K. 2011. Control of experimental colisepticaemia in broiler chickens using sarafloxacin. *Life Sci. J.* 8(3):318-328.

**ARTIGO 2**

Nesse item é apresentado o artigo intitulado:

**Deteção de genes de virulência em *Escherichia coli* Isoladas de frangos e galinhas poedeiras com colibacilose septicêmica de Moçambique e do Brasil**

Paula Augusto Taunde<sup>1</sup>, Claudio João Mourão Laisse<sup>2</sup>, Virgínia Nhabomba Chambe<sup>3</sup>, Márcia Elisa Hammerschmitt<sup>1</sup>, Jacqueline Raiter<sup>1</sup>, Thaina Piccolo Vargas<sup>1</sup>, Benito Guimarães de Brito<sup>4</sup>, Kelly Cristina Tagliari de Brito<sup>4</sup>, Renata Katsuko Takayama Kobayashi<sup>5</sup>, Maísa Fabiana Menck Costa<sup>5</sup>, Hellen Yukari Kitagawa<sup>5</sup>, Eduardo Conceição de Oliveira<sup>6</sup>, Luciana Sonne<sup>1</sup> & David Driemeier<sup>1</sup>

Artigo a ser submetido ao periódico **Acta Scientiae Veterinariae**

## ARTIGO DE PESQUISA

**Deteccção de Genes de Virulência em *Escherichia coli* Isoladas em frangos de corte e em galinhas poedeiras com Colibacilose Septicêmica de Moçambique e do Brasil**

Detection of Virulence Genes in *Escherichia coli* Isolates from Poultry with Septicemic Colibacillosis from Mozambique and Brazil

Paula Augusto Taunde<sup>1</sup>, Claudio João Mourão Laisse<sup>2</sup>, Virgínia Nhabomba Chambe<sup>3</sup>, Márcia Elisa Hammerschmitt<sup>1</sup>, Jacqueline Raiter<sup>1</sup>, Thaina Piccolo Vargas<sup>1</sup>, Benito Guimarães de Brito<sup>4</sup>, Kelly Cristina Tagliari de Brito<sup>4</sup>, Renata Katsuko Takayama Kobayashi<sup>5</sup>, Maísa Fabiana Menck Costa<sup>5</sup>, Hellen Yukari Kitagawa<sup>5</sup>, Eduardo Conceição de Oliveira<sup>6</sup>, Luciana Sonne<sup>1</sup> & David Driemeier<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Setor de Patologia Veterinária (SPV), Faculdade de Veterinária (FaVet), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil. <sup>2</sup>Departamento de Paraclinicas, Faculdade de Veterinária (FaVet), Universidade Eduardo Mondlane (UEM), Maputo, Mozambique. <sup>3</sup>Laboratório de Virologia, Direção de Ciências Animais (DCA), Maputo, Mozambique. <sup>4</sup>Laboratório de Saúde das Aves e Inovação Tecnológica, Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF), DDPA - SEAPDR. <sup>5</sup>Laboratório de Bacteriologia Básica e Aplicada da Universidade Estadual de Londrina (UEL), Paraná, PR, Brazil. <sup>6</sup>Laboratório de Patologia Veterinária, Universidade de Caxias do Sul, Caxias, RS, Brazil. CORRESPONDENCE: D. Driemeier [ddriemeier@gmail.com - Tel.: +55 (51) 3308-6107]. Avenida Bento Gonçalves n. 9090, Bairro Agronomia, CEP 91540-000 Porto Alegre, RS, Brazil.

## ABSTRACT

A produção intensiva adotada na avicultura predispõe a ocorrência e disseminação de doenças infecciosas, como a colibacilose. O presente trabalho tem como objetivo identificar genes de virulência de amostras de *E. coli* isoladas de frangos de corte provenientes de Moçambique e de galinhas poedeiras oriundas do Brasil acometidos com a forma septicêmica da doença. Amostras de DNA extraído de 15 macerados de tecidos (fígado, baço, coração e pulmão) provenientes de frangos com idades entre três e 35 dias, pertencentes a cinco granjas localizadas na cidade e província de Maputo, Moçambique; e cinco amostras de DNA (três extraídos de macerados de fígado e coração e dois de blocos de parafina), oriundas de galinhas poedeiras provenientes de uma granja localizada na região Metropolitana de Porto Alegre, Brasil com 25 semanas, foram submetidas à análise molecular para detecção de cinco genes de virulência de interesse. A detecção dos genes de virulência foi realizada através da reação em cadeia da polimerase (PCR) multiplex. Das amostras analisadas, em frangos de corte houve positividade em 80% (12/15) e em galinhas poedeiras os genes foram detectados em 60% (3/5). A maioria das amostras de *E. coli* apresentou dois ou mais genes associados à virulência, podendo ser classificadas como potencialmente APEC. Os isolados de *E. coli* provenientes das galinhas poedeiras foram resistentes a alguns antimicrobianos [21% (4/19)] com maior taxa de resistência para ácido nalidíxico (82 %). As amostras também apresentaram perfil de multirresistência (82 %) e produção fenotípica de ESBL (18%). Com os resultados obtidos, pode-se inferir que os genes de virulência ocorrem de forma desigual nas amostras e a resistência da bactéria aos antimicrobianos dificulta o controle da doença, sendo importante a realização prévia de antibiograma.

**Keywords:** avicultura, APEC, diagnóstico molecular, antibiograma, *Escherichia coli*.

## INTRODUÇÃO

A colibacilose aviária é uma doença infecciosa causada por cepas patogênicas de *Escherichia coli* (*E. coli*) (APEC), responsável por inúmeros prejuízos econômicos mundialmente [1, 9, 10, 17]. A doença é considerada multifatorial e afeta predominantemente animais jovens, com uma ampla variedade de manifestações clínicas [12, 19]. Em frangos de corte, a doença pode causar mortalidade massiva em todas as faixas etárias [1, 3], com polisserosite como lesão característica [10, 19]. Estes animais geralmente manifestam sinais de hipertermia, letargia, depressão, apatia e perda de reação aos estímulos externos [1, 3]. Em galinhas poedeiras a morte aguda sem a evidenciação de sinais clínicos ou redução na produção e qualidade de ovos é a manifestação mais comum [6]. APEC possuem uma ampla variedade de fatores e genes de virulência, responsáveis pelo sucesso da infecção através da promoção da sobrevivência, proliferação e perpetuação da bactéria no organismo do hospedeiro [4, 16].

Estudos referentes à detecção de genes associados à virulência preditores de APEC são escassos em Moçambique e a grande variabilidade antigênica da *E. coli*, faz da colibacilose uma das doenças mais diagnosticadas em granjas avícolas moçambicanas [13].

O objetivo deste estudo foi pesquisar a ocorrência de genes associados à virulência preditores de APEC provenientes de frangos de corte de Moçambique e de galinhas poedeiras do Brasil, com colibacilose sistêmica bem como avaliar a resistência antimicrobiana nos isolados derivados das galinhas poedeiras.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### *Amostras*

Quinze amostras de órgãos de frangos de corte com idade entre três e 35 dias provenientes de cinco granjas localizadas na cidade e província de Maputo, Moçambique e cinco amostras de DNA de galinhas poedeiras com 25 semanas de idade oriundas de uma granja de postura localizada na região metropolitana de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil, com diagnóstico de colibacilose sistêmica, foram submetidas à análise molecular para a pesquisa de cinco genes de virulência. Adicionalmente, onze isolados de intestinos, fezes e baço das galinhas poedeiras da granja brasileira foram submetidos ao teste de susceptibilidade a antimicrobianos.

#### *Teste de susceptibilidade antimicrobiana*

Onze isolados provenientes de galinhas foram submetidos ao teste de susceptibilidade antimicrobiana pelo método de disco-difusão e classificadas como sensíveis, intermediárias ou resistentes [25]. Os seguintes antimicrobianos foram utilizados: ácido nalidíxico, amoxicilina-ácido clavulânico, ampicilina, cefazolina, cefotaxima, cefoxitina, ceftazidima, ciprofloxacina, cloranfenicol, doxicilina, enrofloxacina, florfenicol, gentamicina, neomicina, nitrofurantoína, norfloxacina, sulfametoxazol-trimetoprim, sulfonamidas e tetraciclina. A cepa de *E. coli* ATCC 25922 foi utilizada como controle do teste .

As amostras que apresentaram resistência a pelo menos uma droga em três ou mais classes de antimicrobianos foram consideradas multirresistentes [25].

#### *Detecção de ESBL*

Para detecção de ESBL foi realizado o teste de sinergismo de disco duplo baseada na inibição da atividade da enzima na presença do ácido clavulânico [11]. Discos contendo cefalosporinas (cefotaxima e ceftazidima) foram aplicados à placa na distância de 20 mm de um disco contendo o ácido clavulânico (amoxicilina+ácido clavulânico). O resultado foi considerado positivo quando as zonas de inibição de crescimento entre qualquer um discos de cefalosporinas são aumentadas na direção do disco que contém o ácido clavulânico.

### *Extração do DNA*

A extração do DNA foi realizada com kit comercial (Qiagen QIAamp DNA Mini Kit, USA), seguindo as recomendações do fabricante. Para a tal, aproximadamente 25 g de tecido fígado, baço, rim, intestino e coração de cada animal foi homogeneizado e diluído com 180 µl de solução buffer ATL e submetido à digestão com 20 µl de proteinase K (1400 rpm a 56°C). Após 40 minutos, adicionou-se 200 µl de buffer AL e 200 µl de etanol (96%). O preparado foi transferido para um tubo *DNeasy Mini spin column* acoplado a um tubo coletor de 2ml, centrifugado a 8000 rpm por 1 minuto e adicionado a um novo tubo coletor para adição de 500 µl de buffer AW1. Após a centrifugação a 8000 rpm por um minuto, nova troca do tubo coletor foi realizada, com adição de 500 µl de buffer AW2 e centrifugação a 1400 rpm por 3 minutos, novamente com o descarte do tubo. O DNA foi eluído pela adição de 200 µl de buffer AE, incubação a temperatura ambiente por 1 minuto e centrifugação por 1 minuto a 8000 rpm. A relação de amostras está disposta na Tabela 1.

### *Deteção dos genes de virulência*

A detecção dos principais genes de virulência relacionados com a patogenicidade de APEC (*iss*, *ompT*, *hlyF*, *iroN* e *iutA*) foi feita através da reação em cadeia da polimerase (PCR) multiplex de acordo com metodologia descrita [12].

A amplificação dos genes foi realizada de acordo com a seguinte reação: 1,25 U de Taq DNA polimerase (Life Technologies, Rockville, MD) em 1 × tampão de PCR (Life Technologies, Rockville, MD), 0,2 mM cada dNTP, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub> e 1 µM cada primer. As reações foram realizadas usando uma máquina mastercycler EP (Eppendorf) nos seguintes parâmetros de ciclagem: 94°C durante 2 minutos; 25 ciclos de 94°C por 30 segundos, 63°C por 30 segundos, 68°C por 3 minutos e um ciclo final de 72°C por 10 minutos.

Todas as amostras foram submetidas à eletroforese em gel horizontal de agarose 2%, e os tamanhos dos amplicons foram determinados por comparação com o marcador de DNA

Hi-Lo, obtido de Minnesota Molecular Inc. (MN). Cepas conhecidas por possuir ou não os genes de interesse foram examinadas em cada procedimento de amplificação. Para validação, um isolado foi considerado como contendo o gene de interesse e se produziu o amplicon de tamanho esperado.

## RESULTADOS

Das amostras analisadas, 80% (12/15) das amostras de frangos de corte e 60% (3/5) das amostras de galinhas poedeiras apresentaram positividade para pelo menos um gene de virulência. Em frangos de corte, os genes detectados foram distribuídos da seguinte maneira: dois genes de virulência [20% (2/5)] (*iss* e *ompT*) em cinco amostras e positividade para quatro genes [80% (4/5)] (*ompT*, *hlyF*, *iroN* e *iutA*) foi observada em uma amostra. Os cinco genes de virulência (*iss*, *ompT*, *hlyF*, *iroN* e *iutA*) foram detectados em seis amostras. Enquanto em galinhas todas (3) amostras foram positivas para quatro genes [80% (4/5)] (*iss*, *ompT*, *hlyF* e *iutA*).

Os isolados demonstraram resistência variável aos antimicrobianos avaliados. A apresentação esquemática da resistência e sensibilidade antimicrobiana estão apresentadas nas Figuras 1 e 2 respectivamente.

A resistência antimicrobiana ao ácido nalidíxico foi verificada em 81,8% (9/11), à associação amoxicilina + ácido clavulânico foi observada em 72,7% (8/11), para doxiciclina e tetraciclina em 63,6% (7/11), para a ceftazida foi em 54,5% (6/11). Ao analisar a resistência das bactérias às diferentes classes de drogas antimicrobianas, verificou-se que 81,8% (9/11) das amostras apresentaram característica de multirresistentes a três ou mais classes de drogas.

A produção fenotípica de ESBL foi detectada em 18,12% (2/11) das amostras isoladas das galinhas.

## DISCUSSÃO

Os fatores de virulência associados à patogenicidade da *E. coli* ainda não estão completamente elucidados, fato que estimulou o aumento de estudos relacionados com foco nesta área nos últimos anos [9]. Cepas patogênicas geralmente apresentam particularidades genéticas associadas à habilidade da bactéria em causar doença nos seus hospedeiros [3]. Em Moçambique, dados referentes à caracterização molecular da *E. coli* são escassos, o que faz deste estudo um ponto de partida para estudos posteriores.

A detecção dos genes no presente estudo foi variável tanto em frangos como em galinhas, contudo foi similar aos resultados de outros estudos [4, 9, 24]. Os cinco genes de virulência detectados nos isolados de Moçambique apresentaram frequência variável entre eles, em que o gene mais prevalente foi o gene *iss* (12/15), seguido do gene *ompT* (11/15). Ainda, nas amostras de frangos de corte, foram detectados os genes *hlyF*, *iroN* e *iutA* na frequência de (7/15) cada. Nas amostras de galinhas do Brasil, os genes detectados foram o *iss*, *ompT*, *hlyF* e *iutA* na mesma proporção. Segundo [13], amostras isoladas de lesões de colibacilose, que apresentam dois ou mais genes podem ser consideradas potencialmente APECs, sendo estes cinco genes considerados preditores de patogenicidade, requisito que foi apresentado pelas amostras em estudo.

Os genes detectados no nosso estudo já foram evidenciados na literatura com frequência semelhante em amostras dos Estados Unidos da América, China, e Brasil, tanto em frangos de corte como em galinhas poedeiras, perus e galinhas d'angola [4, 9, 18, 24]. A frequência dos genes pode variar de acordo com a origem, número [8] e qualidade [3] das amostras, o que resulta na variação das características bacterianas. O mesmo foi observado neste estudo, em que houve detecção de dois, quatro e cinco genes de virulência. As amostras de frango de corte apresentaram uma variação considerável na frequência de detecção dos genes em relação às galinhas poedeiras, que apresentaram os mesmos genes em todos os isolados. Isto pode estar relacionado ao fato das amostras de frango de corte terem origens

diferentes. Além disso, o quadro clínico-patológico observado nesses animais era variável dependendo da procedência. Estudo feito em galinhas de angola mostrou elevada prevalência para os mesmos genes detectados no nosso estudo, com maior frequência para os genes *sitA* e *hlyF*, seguida dos genes *iss*, *iroN*, *iutA* [4]. Este achado reforça a teoria de que as aves desenvolvem a forma clínica da doença quando são infectadas por cepas patogênicas [7, 24], possuidoras de inúmeros genes que garantem a viabilidade da bactéria e conseqüentemente a instalação da doença [4, 7, 18]. Estas características fazem da colibacilose um dos maiores obstáculos para a avicultura industrial no mundo [1, 3, 13, 17].

A não detecção de pelo menos um gene em algumas amostras de frangos de corte pode estar relacionada à possível autólise das amostras, uma vez que há maior chance de contaminação da carcaça com cepas intestinais quanto maior for o tempo entre a morte do animal e o procedimento de necropsia e coleta adequada das amostras [3, 18]. Esta hipótese foi descartada neste estudo, uma vez que apenas amostras frescas foram utilizadas. Curiosamente, em cepas não patogênicas isoladas de fezes de aves saudáveis, importantes fatores e genes de virulência já foram evidenciados [17, 18, 21, 24]. Ausência de vários genes de virulência também foi observada tanto em frangos acometidos pela forma clínica da doença (27,5%) bem como em animais aparentemente saudáveis, o que ressalta a importância da pesquisa de possíveis variantes dos genes em estudo, bem como a pesquisa de outros genes existentes [7]. Ainda, a ausência dos genes em questão não descarta a possível ocorrência de outros genes não pesquisados neste estudo, responsáveis pelo sucesso da infecção e sobrevivência da bactéria no organismo hospedeiro, pois a doença depende do envolvimento de cepas patogênicas [7, 9].

O tratamento da colibacilose é feito através do uso de antimicrobianos [4, 6]. Entretanto, atualmente diversas bactérias possuem resistência perante muitos antibióticos, o que é uma ameaça à saúde pública [4, 23]. O presente estudo revelou que todos isolados

provenientes das galinhas poedeiras foram resistentes a alguns antibióticos, que coincide com achados em galinhas poedeiras [16], em pintos do dia [23], em frangos de corte [4, 26], patos e suínos [26]. Sabe-se que as principais formas de resistência aos antimicrobianos resultam do uso indiscriminado de antibióticos, subdosagens [3, 26] ou devido à dispersão de antibióticos resistentes no ambiente [3].

A maioria dos nossos isolados (10) demonstraram resistência para ácido nalidíxico, seguido de tetraciclina, doxiciclina, e ampicilina (oito isolados) e cefazolina (seis isolados). Estudo feito em galinhas mostrou resistência máxima para tetraciclina, ciprofloxacina, enrofloxacin e pefloxacin [16]. Resultados semelhantes ao do nosso estudo também foram observados na maioria dos isolados provenientes de pintos do dia, que apresentaram resistência para tetraciclina e ampicilina [23], bem como em frangos de corte [2, 4, 26], com máxima resistência também para tetraciclina, ácido nalidíxico, ampicilina e onofloxacin [26], neomicina e penicilina [2]. A alta ocorrência de *E. coli* multirresistentes observada neste trabalho, também foram relatadas por vários pesquisadores [2, 15, 16].

A produção de ESBL determina a resistência aos antibióticos da classe beta-lactâmicos, o que constitui um dos limitantes no tratamento de doenças bacterianas em animais assim como em humanos [5, 14]. No nosso estudo, houve positividade em isolados de duas galinhas, o que corrobora com os achados em amostras de aves e em humanos [14]. Dados semelhantes foram observados também em isolados de poedeiras bem como em moradias de aves silvestres [5] e em amostras provenientes de granjas avícolas [15]. A disseminação de cepas resistentes da bactéria pode ocorrer pelo contato homem-animal-ambiente e através consumo de alimentos contaminados, com impacto na saúde pública [15]. A resistência da bactéria aos antimicrobianos pode dificultar o controle da doença, sendo, portanto, importante a realização prévia de antibiograma para evitar mais custos com tentativas de tratamentos sem sucesso e, conseqüentemente, perda dos animais.

## CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos nesse estudo pode-se concluir que a detecção dos genes de virulência em cepas patogênicas da *Escherichia coli* é fundamental para a compreensão do papel destes na patogênese e patogenicidade da doença, bem como das cepas circulantes em um determinado local. Além do mais, com os dados pode-se inferir que os genes de virulência ocorrem de forma desigual nas amostras de um determinado grupo e a não detecção dos mesmos não descarta o seu envolvimento na manifestação clínica. A multirresistência da bactéria aos vários antimicrobianos dificulta o controle da doença, daí a importância da realização prévia do antibiograma.

### *Manufactured*

Qiagen QIAamp DNA Mini Kit, USA

Integrated DNA Technologies, Iowa City, IA

DNA Hi-Lo, Minnesota Molecular Inc. (MN), USA.

Eppendorf, Westbury, NY, USA

**Acknowledgements:** A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for the financial support.

**Declaration of interest.** The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content of the paper.

## REFERENCES

- 1 **Abalaka, S.E., Sani N.A., Idoko I.S., Tenuche O.Z., Oyelowo F.O., SA Ejeh S.A. & Enem S.I. 2017.** Pathological changes associated with an outbreak of colibacillosis in a commercial broiler flock. *Journal of Veterinary Science*. 15(3): 95–102.
- 2 **Akond B.A., Alam S., Hassa S.M.R. & Shirin M. 2009.** Antibiotic resistance of *Escherichia coli* isolated from poultry and poultry environment of Bangladesh. *Internet Journal of Food Safety*. 11: 19 – 23.
- 3 **Barnes H.J., Nolan L.K. & Vaillancourt J-P. 2008.** Colibacillosis. In: *Disease of Poultry 12<sup>th</sup> ed. Blackwell Publishing*. 619-716.
- 4 **Borzi M.M., Cardozo M.V., De Oliveira E.S., Pollo A.S., Guastalli E.A.L., Dos Santos L.F. & De Ávila F.A. 2018.** Characterization of avian pathogenic *Esc+herichia coli* isolated from free-range helmeted guineafowl. *Brazilian Journal of Microbiology*. 49: 107-112.
- 5 **Blaak H., Hamidjaja R. A., van Hoek A.H., de Heer L., de Roda H A.M., & Schets, F. M. 2014.** Detection of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* on flies at poultry farms. *Applied and Environmental Microbiology Journal*. 80: 239–246.
- 6 **Cavero D., Schmutz M., Phillipp H.C. & Preisinger R. 2009.** Breeding to reduce susceptibility to *Escherichia coli* in layers. *Poultry Science*. 88: 2063–2068.
- 7 **Delicato E.R., De Brito B.G., Gaziri L.C.J. & Vidotto M.C. 2003.** Virulence-associated genes in *Escherichia coli* isolates from poultry with colibacillosis. *Veterinary Microbiology*. 94: 97–103.
- 8 **Dho-Moulin M. & Fairbrother J.M. 1999.** Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Veterinary Research*. 30: 299–316.
- 9 **De Carli, S., Ikuta N., Lehmann F.K.M., Da Silveira V.P., Predebon G.M., Fonseca A.S.K. & Lunge V.R. 2015.** Virulence gene content in *Escherichia coli* isolates from poultry flocks with clinical signs of colibacillosis in Brazil. *Poultry Science*. 94: 2635–2640.

- 10 Dziva F. & Stevens M.P. 2008.** Colibacillosis in poultry: Unravelling the molecular basis of virulence of avian pathogenic *Escherichia coli* in their natural hosts. *Avian Pathology*. 37(04): 355-366, 2008.
- 11 EUCAST, European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. 2018.** Disponível em: [http://www.eucast.org/clinical\\_breakpoints/](http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/) Acesso em: 24/11/2018.
- 12 Ewers, C., Janßenb T., Kießlinga S., Philipp H-C. & Wielera L.H. 2004.** Molecular epidemiology of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from colisepticemia in poultry. *Veterinary Microbiology*. 104: 91–101.
- 13 Food and Agriculture Organization (FAO). 2013** Poultry Sector of Mozambique. FAO animal production and health livestock country. Reviews. No. 5.
- 14 Falgenhauer L., Imirzalioglu C., Oppong K., Akenten C.W., Hogan B., Krumkamp R., Poppert S., Levermann V., Schwengers O., Sarpong N., Owusu-Dabo E., May J. & Eibach D. 2019.** Detection and Characterization of ESBL-Producing *Escherichia coli* From Humans and Poultry in Ghana. *Frontiers in Microbiology*. 9: 3358.
- 15 Gazal L.E.S., Medeiros L.P., Dibo M., Nishio E.K., Koga V.L., Gonçalves B.C., Grassotti T.T., de Camargo T.C.L., Pinheiro J.J., Vespero E.C., de Brito K.C.T., de Brito B.G., Nakazato G. & Kobayashi R.K.T. 2021.** Detection of ESBL/AmpC-producing and Fosfomycin-Resistant *Escherichia coli* from different Sources in Poultry production in Southern Brazil. *Frontiers in Microbiology*. 11: e604544.
- 16 Hassan M.M., Amin K.B., Ahaduzzaman M., Alam M., Faruk M.S.A. & Uddin I. 2014.** Antimicrobial resistance pattern against *E. coli* and *Salmonella* in Layer Poultry. *Research Journal for Veterinary Practitioners*. 2 (2): 30 – 35.
- 17 Horn F., Corrêa A.M.R., Barbieri N.L., Glodde S. & Weyrauch K.D. 2012.** Infections with avian pathogenic and fecal *Escherichia coli* strains display similar lung histopathology and macrophage apoptosis. *PLoS ONE*. 7(7): e41031. doi:10.1371/journal.pone.0041031.

- 18 Johnson T.J., Wannemuehler Y., Doetkott C., Johnson S.J., Rosenberger S.C., Lisa K. & Nolan L.S. 2008.** Identification of minimal predictors of avian pathogenic *Escherichia coli* virulence for use as a rapid diagnostic tool. *Journal of Clinical Microbiology*. 46: 3987–3996.
- 19 Kabir L.S.M. 2010.** Avian Colibacillosis and Salmonellosis: A closer look at epidemiology, pathogenesis, diagnosis, control and public health concerns. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 104: 91–101.
- 20 Kim Y.B., Yoon M.Y., Ha, J.S., Seo, K.S., Noh B.E., Son S.H. & Lee Y.J. 2020.** Molecular characterization of avian pathogenic *Escherichia coli* from broiler chickens with colibacillosis. *Poultry Science*. 99: 1088–1095.
- 21 Matter L.B., Barbieri N.L., Nordhoff M., Ewers C. & Horn F. 2011.** Avian pathogenic *Escherichia coli* MT78 invades chicken fibroblasts Matter. *Veterinary Microbiology*. 148: 51–59.
- 22 Nakazato, G. De Campos T. A., Stehling E.G., Brocchi M. & Da Silveira W.D. 2009.** Virulence factors of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 29(7): 479-486.
- 23 Okorafor O.N., Anyanwu M.U., Nwafor E.O., Anosa G.N. & Udegbonam R.I. 2019.** Multidrug-resistant enterobacteria colonize commercial day-old broiler chicks in Nigeria. *Veterinary World*. 12(3): 418-423.
- 24 Rodriguez-Siek K.E., Giddings C.W., Doetkott C., Johnson T.F. & Nolan L.K. 2005.** Comparison of *Escherichia coli* isolates implicated in human urinary tract infection and avian colibacillosis. *Microbiology*. 151: 2097-2110.
- 25 Soares B.D., de Brito K.C.T., Grassotti T.T., Filho H.C.K., de Camargo T.C.L., Carvalho D., Dorneles I.C., Otutumi L.K., Cavalli L.S. & de Brito B.G. 2021.** Respiratory

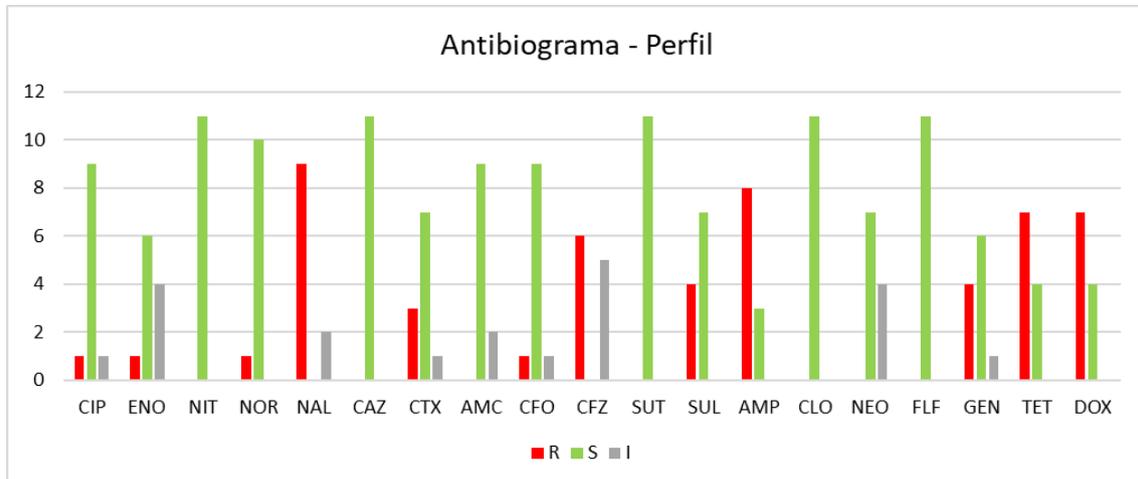
microbiota of healthy broilers can act as reservoirs for multidrug-resistant *Escherichia coli*.

*Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 79: 101700.

**26 Yassin A.K., Gong j., Kelly p., Lu G., Guardabassi L., Wei L., Han X., Qiu H., Price S., Cheng D. & Wang C. 2017.** Antimicrobial resistance in clinical *Escherichia coli* isolates from poultry and livestock, China. *Plos ONE*. 12 (9): e00185326.

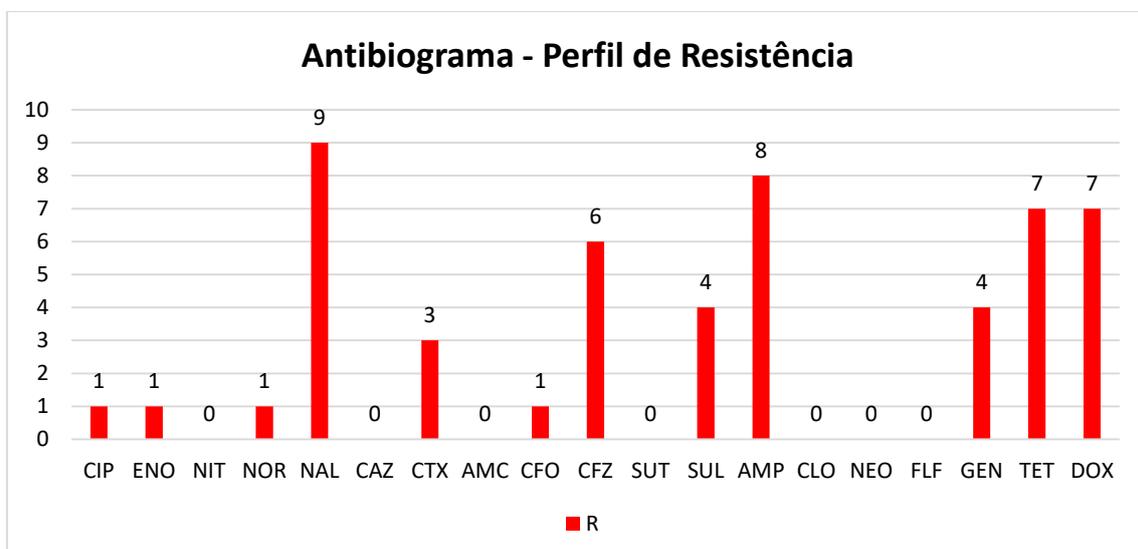
**Tabela 1.** Amostras de frangos e galinhas poedeiras submetidas a análise molecular

<b>ID amostras</b>	<b>Órgão de extração</b>	<b>Idade (dias)</b>	<b>Proveniência (granja)</b>	<b>PRC multiplex</b>
3	Fígado	19	C	Negativo
4	Pulmão e fígado	27	B	Positivo
5	Pulmão	35	D	Positivo
6	Fígado e pulmão	27	B	Positivo
7	Fígado	9	B	Positivo
8	Fígado	9	B	Negativo
9	Fígado e pulmão	27	B	Positivo
10	Pulmão	35	D	Positivo
11	Pulmão	35	D	Positivo
12	Pulmão, coração e fígado	19	C	Positivo
13	Pulmão e fígado	19	C	Negativo
14	Pulmão, fígado e coração	18	A	Positivo
15	Pulmão, fígado e baço	18	A	Positivo
16	Fígado e pulmão	18	A	Positivo
17	Fígado e coração	19	A	Positivo
18	Fígado, baço e músculo	25 semanas	Granja 1	Negativo
19	Fígado, baço, intestino e músculo	25 semanas	Granja 1	Negativo
20	Fígado, baço e músculo	25 semanas	Granja 1	Negativo
21	Coração, rim e fígado	25 semanas	Granja 1	Negativo
22	Coração, rim e fígado	25 semanas	Granja 1	Positivo

**Figura 1.** Perfil da resistência e sensibilidade dos isolados aos antimicrobianos

**Legenda:** R – resistente; S – sensível; I – intermediário.

CIP: ciprofloxacina; ENO: enrofloxacina; NIT: nitrofurantóina; NOR: norfloxacina; NAL: ácido nalidíxico; CAZ: ceftazidima; CTX: cefotaxima; AMC: amoxicilina+ácido clavulânico; CFO: cefoxitina; CFZ: cefazolina; SUT: sulfazotrim; AMP: ampicilina; CLO: cloranfenicol; NEO: neomicina; FLF: florfenicol; GEN: gentamicina; TET: tetraciclina; DOX: doxiciclina.

**Figura 2.** Representação esquemática da resistência dos isolados aos antimicrobianos

**Legenda:** R – resistente

CIP: ciprofloxacina; ENO: enrofloxacina; NIT: nitrofurantóina; NOR: norfloxacina; NAL: ácido nalidíxico; CAZ: ceftazidima; CTX: cefotaxima; AMC: amoxicilina+ácido clavulânico; CFO: cefoxitina; CFZ: cefazolina; SUT: sulfazotrim; AMP: ampicilina; CLO: cloranfenicol; NEO: neomicina; FLF: florfenicol; GEN: gentamicina; TET: tetraciclina; DOX: doxiciclina.

#### 4.CONCLUSÕES

- Através do estudo de pesquisa, notou-se que as aves em estudos foram infectadas com cepas patogênicas de *E. coli* com quadro clínico-patológico semelhante.
- Apesar das aves apresentarem proveniência, bem como manejo diferente, o padrão da doença, achados de necropsia e histológicos não apresentaram variação considerável.
- A detecção molecular dos genes de virulência nestas aves sugere que as mesmas foram infectadas por cepas potencialmente patogênicas.
- O antibiograma feito em poedeiras, resistência e multirresistência dos isolados para vários antimicrobianos.
- Para completar os dados de frangos de Moçambique é imprescindível a realização de sequenciamento, antibiograma dos isolados bem como a bioquímica dos mesmos.

## REFERÊNCIAS

- ABALAKA, S.E. *et al.* Pathological changes associated with an outbreak of colibacillosis in a commercial broiler flock. **Journal of Veterinary Science**, 15 (3): p. 95–102, 2017.
- ABBAS, M. (In) segurança alimentar e território em Moçambique: discursos políticos e práticas **Revista Nera**, v. 38: ISSN: p. 1806-6755, 2017.
- AL-ARFAJ, A.A. *et al.* Phenotypic and genotypic analysis of pathogenic *Escherichia coli* virulence genes recovered from Riyadh. **Saudi Journal of Biological Sciences**. 23: p. 713–717, 2016.
- ANYANWU, M.U. *et al.* Case report of misdiagnosis of avian colibacillosis in laying birds. **Animal Research International**. 11 (2): p. 1998 – 2003, 2014.
- ASK, B. *et al.* Genetic variation among broiler genotypes in susceptibility to colibacillosis. **Poultry Science**. 8: p. 415–421, 2006.
- BASHAHUN, G.M. & AMINA, A. Colibacillosis in calves: A review of literature. **Journal of Animal Sciences and Veterinary Medicine**. 2 (2536-7099): p. 62-71, 2017.
- BARNES, H.J. *et al.* Colibacillosis, In: Disease of Poultry 12<sup>th</sup> ed. Blackwell Publishing, p. 619-716, 2008.
- BORZI, M.M. *et al.* Characterization of avian Pathogenic *Escherichia coli* isolated from free-range helmeted guineafowl. **Brazilian Journal of Microbiology**. 49: p. 107-112, 2018.
- CARRILHO, J. *et al.* Desafios para a Segurança alimentar e nutrição em Moçambique. Disponível em <http://omrmz.org/omrweb/wp-content/uploads/livro-desafios-seguranca-alimentar-e-nutricao-em-mocambique.pdf>. Acessado aos 12 de Abril de 2017.
- Casagrande R.A., Machado G., Guerra P., Castro L.A., Spanamberg A., Silva S.C., Cardoso M.R.I. & Driemeier D. 2017. Caracterização anatomopatológica e bacteriológica em frangos de corte condenados totalmente por colibacilose sob Serviço de Inspeção Federal. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 37(9):949-957.
- Chansiripornchai N. 2009. Comparative efficacy of enrofloxacin and oxytetracycline by different administration methods in broilers after experimental infection with avian pathogenic *Escherichia coli*. **Thai Journal of Veterinary Medicine** 39(3):231-236
- CAVERO, D. *et al.* Breeding to reduce susceptibility to *Escherichia coli* in layers. **Poultry Science**. 88: p. 2063–2068, 2009.
- DZIVA, F. & STEVENS, M.P. Colibacillosis in poultry: Unravelling the molecular basis of virulence of avian pathogenic *Escherichia coli* in their natural hosts. **Avian Pathology**. 37 (04): p. 355-366, 2008.
- DE LORENZO, C. *et al.* Piglet colibacillosis diagnosis based on multiplex polymerase chain reaction and immunohistochemistry of paraffin-embedded tissues. **Journal of Veterinary Science**. 19(1), p. 27-33, 2018.

De Oliveira C.A.O., Pivoto D., Spanhol C.P. & Corte V.F.D. 2015. Developments and competitiveness of Mozambican chicken meat industry. **Revista de Administração IMED** 5(2):205-216.

DHO-MOULIN, M. & FAIRBROTHER, J. M. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). **Veterinary Research**. 30 (2-3): p. 299-316, 1999.

DEBROY, C. *et al.* Bronchopneumonia associated with extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in a horse. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. 20: p. 661–664, 2008.

DE CARLI, S. *et al.* Virulence gene content in *Escherichia coli* isolates from poultry flocks with clinical signs of colibacillosis in Brazil. **Poultry Science** 94: p. 2635–2640, 2015.

Do Amaral C.C. & Mlay G. 2012. Análise de Custos e Rentabilidade da Produção Frangos no Sul de Moçambique - Estudo de caso na granja da Faculdade de Veterinária. **Relatório preliminar de pesquisa no. 1. República de Moçambique**. p.1-17

DOU, X. *et al.* Characterization of avian pathogenic *Escherichia coli* isolated in eastern China. **Gene**, 576 (1 pt 2): p. 244–248, 2016.

Dutta P., Borah M.K., Sarmah R. & Gangil R. 2013. Isolation, histopathology and antibiogram of *Escherichia coli* from pigeons (*Columba livia*). **Veterinary World Journal** 6(2):91-94.

Dwars R.M., Matthijs M.G.R., Daemen A.J.J.M., van Eck J.H.H., Vervelde L. & Landman W.J.M. 2009. Progression of lesion in the respiratory tract of broilers after single infection with *Escherichia coli* compared to superinfection with *E. coli* after infection with infectious bronchitis virus. **Veterinary Immunology and Immunopathology Journal** 127(1/2):65-75.

Dziva F. & Stevens M.P. 2008. Colibacillosis in poultry: unravelling the molecular basis of virulence of avian pathogenic *Escherichia coli* in their natural hosts. **Avian Pathology** 37(4):355-366.

EWERS, C. *et al.* Molecular epidemiology of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from colisepticemia in poultry. **Veterinary Microbiology**. 104: 91–101, 2004.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). Poultry Sector Mozambique. FAO animal production and health livestock country. Reviews. No. 5, 2013.

FERRÃO, J. E. M. Potencialidades agropecuárias de Moçambique. Uma súmula. Atas do congresso internacional saber tropical em Moçambique: história, memória e ciência. **JBT/Jardim Botânico Tropical**, 2012.

Giovanardi D., Campagnari E., Ruffoni L.S., Pesente P., Ortali G. & Furlattini V. 2005. Avian pathogenic *Escherichia coli* transmission from broiler breeders to their progeny in an integrated poultry production chain. **Avian Pathol**. 34(4):313-318.

GUABIRABA, R. & SCHOULER, C. Avian colibacillosis: still many black holes. **FEMS Microbiology Letters**, 362: p. 1-8, 2015.

Horn F., Corre A.M.R., Barbier N.L., Glodde S., Weyrauch K.D., Kaspers B., Driemeier D., Ewers C. & Wieler L.H. 2012. Infections with avian pathogenic and fecal *Escherichia coli* strains display similar lung histopathology and macrophage apoptosis. **PLoS One** 7(7):e41031.

Hossain M.B., Chakma S., Noman A. & Van A. 2015. Prevalence of infectious and non-infectious diseases in different age groups of commercial layer chicken in Feni District, Bangladesh. **Journal of Veterinary and Medicine**, 26(1):35-38.

ISTITUTO NACIONAL DE ESTATÍSTICA (INE). Censo agro-pecuário 2009-2010: resultados preliminares – Moçambique, 2011.

KABIR, L. S. M. Avian Colibacillosis and Salmonellosis: A closer look at epidemiology, pathogenesis, diagnosis, control and public health concerns. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, 104 (2004), p. 91–101, 2010.

KHATON, R. *et al.* Colibacillosis in commercial chickens in Bangladesh. **The Bangladesh Veterinarian**. 25(1): p. 17–24, 2008.

Kim Y.B., Yoon M.Y., Jong S.H., Seo K.W., Noh E.B., Son S.H. & Lee Y.J. 2020. Molecular characterization of avian pathogenic *Escherichia coli* from broiler chickens with colibacillosis. **Poultry Science**. 99(2):1088-1095.

Markey B., Leonardo F., Archambault M., Culinane A. & Maguire D. 2013. Clinical Veterinary Microbiology. 2nd ed. Vol.2. Mosby Ltd., St Louis, p.249-254.

MINISTÉRIO DE AGRICULTURA (MA). Estratégia para o desenvolvimento do sub-setor pecuário 2010-2015. República de Moçambique, 2007.

Mbanga J. & Nyararai Y.O. 2015. Virulence gene profiles of avian pathogenic *Escherichia coli* isolated from chickens with colibacillosis in Bulawayo, Zimbabwe. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research** 82(1):e1-e8.

NAKAZATO, G. *et al.* Virulence factors of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC)1. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. 29(7): p. 479-486, 2009.

NICOLAU, Q. C. *et al.* Cadeia produtiva avícola de corte de Moçambique: caracterização e competitividade. **Revista de Ciências Agrária**, 2011.

Oliveira E.S., Cardoso M.V., Borzi M.M., Borges C.A., Guastalli E.A.L. & Ávila F.A. 2019. Highly pathogenic and multidrug resistant avian pathogenic *Escherichia Coli* in free-range chickens from Brazil. **Braz. J. Poultry Science**, 21(1):1-7.

Ozaki H., Yonehara K. & Murase T. 2018. Virulence of *Escherichia coli* isolates obtained from layer chickens with colibacillosis associated with pericarditis, perihepatitis, and salpingitis in experimentally infected chicks and mbryonated eggs. **Avian Disease**. 62(2):233-236.

Solà-Ginés M., Cameron-Veas K., Badiola I., Dolz R., Majó N., Dahbi N.G., Viso S., Mora A., Blanco J., Piedra-Carrasco N., González-López J.J. & Migura-García L. 2015. Diversity of multi-drug resistant avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) causing outbreaks of colibacillosis in broilers during 2012 in Spain. **PLoS One** 10(11):e0143191.

Srinivasan P., Balasubramaniam G.A., Murthy T.R.G.K. & Balachandran P. 2014. Pathomorphological studies of polyserositis in commercial caged layer chicken. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine** 7(Supl.1):S313-S320.

OPPEWAL, J. *et al.* Estudo Sectorial: Cadeia de Valor do Frango em Moçambique. República de Moçambique, Ministério da Economia e Finanças, 2016.

PERTTULA, L. *et al.* Epidemiology and characterization of Newcastle Disease in smallholder poultry in Mozambique. **ISSN**, p. 1652-8697, 2001.

VOUNBA, P. *et al.* Prevalence of antimicrobial resistance and potential pathogenicity, and possible spread of third generation cephalosporin resistance, in *Escherichia coli* isolated from healthy chicken farms in the region of Dakar, Senegal. **PloS One** 14 (3):p. 1-23, 2019.

Wafaa A., El-Ghany A. & Madian K. 2011. Control of experimental colisepticaemia in broiler chickens using sarafloxacin. **Life Science Journal** 8(3):318-328