



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ANGELA HITOMI KIMURA

**CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE *ESCHERICHIA COLI*
PATOGÊNICA PARA AVES PROVENIENTES DE UM SURTO
EM CANÁRIOS**

Londrina
2020

ANGELA HITOMI KIMURA

**CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE *ESCHERICHIA COLI*
PATOGÊNICA PARA AVES PROVENIENTES DE UM SURTO
EM CANÁRIOS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Renata Katsuko Takayama Kobayashi

Londrina
2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Kimura, Angela Hitomi .

Caracterização de *Escherichia coli* patogênica para aves provenientes de um surto em canários / Angela Hitomi Kimura. - Londrina, 2020.
35 f.

Orientador: Renata Katsuko Takayama Kobayashi.

Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2020.

Inclui bibliografia.

1. *Escherichia coli* - Tese. 2. Canário - Tese. 3. Resistência em microorganismos - Tese. 4. Virulência - Tese. I. Kobayashi, Renata Katsuko Takayama. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. III. Título.

CDU 579

ANGELA HITOMI KIMURA

**CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE *ESCHERICHIA COLI*
PATOGÊNICA PARA AVES PROVENIENTES DE UM SURTO
EM CANÁRIOS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Orientadora: Dr.^a Renata K. T. Kobayashi
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof.^a Dr.^a Ana Angelita Sampaio Baptista
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof.^a Dr.^a Claudia Yurika Tamehiro
Universidade Estadual do Norte do Paraná –
UENP - CLM

Londrina, 26 de março de 2020.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me dar o sustento em todos os momentos da minha vida e permitido a realização deste sonho.

À Prof.^a Dr.^a Renata Kobayashi, por me mostrar que tudo se alcança com paciência e persistência. Agradeço pela confiança, pela amizade e por acreditar em meu potencial.

À minha família, pelo apoio e por compartilhar a realização desta etapa de minha vida e ser meu alicerce, sempre.

Aos amigos, pelo incentivo e companherismo nos momentos de dificuldade e alegria, tornando esta jornada prazerosa.

Aos professores, amigos e colegas que auxiliaram nas diversas etapas deste trabalho e, também contribuíram para minha formação profissional e pessoal.

À todos que de alguma forma, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

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

“Só existem dois dias no ano que nada pode ser feito. Um se chama ontem e o outro se chama amanhã, portanto hoje é o dia certo para amar, acreditar, fazer e principalmente viver”.

(Dalai Lama)

KIMURA, Angela Hitomi. **Caracterização de *Escherichia coli* patogênica para aves provenientes de um surto em canários**. 2020. 36 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina; Londrina, 2020.

RESUMO

O canário (*Serinus canaria*) é um pássaro canoro, apreciado por seu canto suave e harmonioso, belas cores e temperamento dócil. Pode ser criado como animal de estimação ou para fins comerciais. Por conta disso, movimentou um mercado lucrativo de criação e venda de animais. No entanto, doenças causadas por *Escherichia coli* patogênica para aves (APEC) pode comprometer a saúde dos canários e, o tratamento antimicrobiano empírico inadequado pode contribuir para a seleção de cepas resistentes. Este estudo caracterizou 21 cepas de *E. coli* isoladas no período de janeiro e fevereiro de 2015, de um surto em canários com colibacilose, proveniente de um criador no norte do Paraná. Foram pesquisados os genes de virulência de ExPEC (*E. coli* patogênica extraintestinal), DEC (*E. coli* diarreiogênica) e os genes de resistência a quinolonas, utilizando a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR), assim como a classificação em grupos filogenéticos. Além disso, foi pesquisado o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos pelo método de disco difusão, a clonalidade genética das cepas pela técnica do Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-PCR (ERIC-PCR), a sorotipagem, o sequence type e o perfil de invasão em células de linhagem HeLa. Todas as cepas apresentaram genes de virulência característicos de ExPEC e o mesmo grupo filogenético (B1). A alta similaridade genética (95%) indica a clonalidade genética das cepas. Houve prevalência do sorotipo O117:H4 (71,4%), além do mesmo perfil de invasão em células de linhagem HeLa e o sequence type (ST224). O gene *ipaH* (71,4%) está associado a EIEC (*E. coli* enteroinvasiva), não sendo comum em ExPEC. Este é o primeiro relato de um surto clonal em canários causado por APEC, com presença do gene de virulência *ipaH*. Foram encontradas cepas multirresistentes aos antimicrobianos mais utilizados na medicina humana e veterinária e os genes de resistência a quinolonas (*qnrS*: 23,8%; *qnrB*: 9,52%). A multirresistência aos antimicrobianos demonstra a importância de se evitar o tratamento antimicrobiano empírico inadequado em canários. Uma vez que o conceito de One Health conecta a saúde animal a saúde humana e ambiental, a disseminação dos genes de resistência entre os microrganismos pode favorecer a falha terapêutica.

Palavras-chave: APEC. Canários. Colibacilose. Multirresistência.

KIMURA, Angela Hitomi. **Characterization of pathogenic *Escherichia coli* for birds from an outbreak in canaries**. 2020. 36 p. Dissertation (Microbiology Master) - State University of Londrina, Londrina, 2020.

ABSTRACT

The canary (*Serinus canaria*) is a songbird, appreciated for its soft and harmonious song, beautiful colors, and docile temperament. It can be raised as a pet or for commercial purposes. As a result, moves a lucrative business. However, diseases caused by avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) can compromise the health of canaries, and the inadequate empirical antimicrobial treatment can lead to the emergence of resistant strains. This study characterized 21 strains of *E. coli* isolated between January to February 2015, from an outbreak in canaries suffering a colibacillosis, from a breeder in northern Paraná. The virulence genes of ExPEC (extra-intestinal pathogenic *E. coli*), DEC (diarrheagenic *E. coli*) and quinolone resistance genes were investigated using the polymerase chain reaction (PCR) technique, as well as the classification in groups phylogenetic. In addition, the antimicrobial sensitivity profile was investigated using the disk diffusion method, the genetic clonality of the strains using the Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-PCR (ERIC-PCR) technique, serotyping, the sequence type and the invasion profile in cells of HeLa lineage. All strains had virulence genes characteristic of ExPEC and the same phylogenetic group (B1). The high genetic similarity (95%) indicates the genetic clonality of the strains. There was a prevalence of serotype O117:H4 (71.4%), and to the same invasion profile in cells of HeLa lineage and sequence type (ST224). The *ipaH* gene (71.4%) is associated with EIEC (enteroinvasive *E. coli*), which is not common in ExPEC. This is the first report of a clonal outbreak in canaries caused by APEC, with the presence of the *ipaH* virulence gene. Multidrug-resistant strains were found for the most used antimicrobials in human and veterinary medicine and genes of resistance to quinolones (*qnrS*: 23.8%; *qnrB*: 9.52%). Multidrug resistance to antimicrobials demonstrates the importance of avoiding inadequate empirical antimicrobial treatment in canaries. Since the concept of One Health connects animal health to human and environmental health, the spread of resistance genes among microorganisms can favor therapeutic failure.

Keywords: APEC. Canaries. Colibacillosis. Multidrug resistance.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	9
2.1	CANÁRIOS	9
2.2	ESCHERICHIA COLI	10
2.2.1	Escherichia coli Patogênica para Aves (APEC).....	11
2.3	RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA	12
3	REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	14
4	OBJETIVOS	19
4.1	OBJETIVO GERAL	19
4.1.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
5	ARTIGO CIENTÍFICO	21
6	CONCLUSÕES	35

1. INTRODUÇÃO

O canário (*Serinus canaria* (Linnaeus 1758)) é uma ave que pertence a ordem Passeriformes e membro da família Fringillidae. É um pássaro conhecido e valorizado por sua beleza de canto, cores e porte (BORSA; SANCHES; OLIVEIRA, 2013; DORRESTEIN, 2009). A criação desta ave não se limita a fins comerciais e muitas pessoas têm optado em tê-los como animais de estimação. Estudos mostram que nos Estados Unidos este pássaro ocupa a quarta posição, ficando atrás de cães, gatos e peixes (JORN et al., 2009). Com uma alta procura por estes pássaros, um mercado lucrativo de criação e venda tem se estabelecido (BOSERET et al., 2013). Entretanto, a disseminação de bactérias patogênicas pode comprometer criadouros e causar prejuízos.

Escherichia coli é um bacilo Gram-negativo, da família Enterobacteriaceae e está presente na microbiota humana, em animais e também no meio ambiente (NATARO; KAPER, 1998; STROMBERG et al., 2017). Cepas comensais são raramente associadas a doenças, entretanto, ao adquirir genes de virulência podem se tornar patogênicas, sendo classificadas em DEC (*Escherichia coli* diarreiogênica) e ExPEC (*Escherichia coli* patogênica extraintestinal) (KNÖBL et al., 2013). *Escherichia coli* patogênica para aves (APEC), um subgrupo de ExPEC, é o principal responsável por infecções extraintestinais em aves, podendo se manifestar de diferentes maneiras, tais como aerossaculite, celulite, síndrome da cabeça inchada, salpingite, septicemia (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; NAKAZATO et al., 2009).

A descoberta dos antimicrobianos revolucionou a medicina humana e permitiu a cura e o controle de doenças infecciosas causadas por microrganismos (PREMANANDH; SAMARA; MAZEN, 2016). Os antimicrobianos não se restringiram a medicina humana e são utilizados para fins profiláticos e terapêutico na medicina veterinária. Entretanto, como resposta a pressão seletiva imposta pelo uso de antimicrobianos, os microrganismos tem se tornado cada vez mais resistentes, e com frequência as falhas terapêuticas são recorrentes (PREMANANDH; SAMARA; MAZEN, 2016; PRESTINACI; PEZZOTTI; PANTOSTI, 2015).

Considerando que o conceito de Saúde Única (One Health) conecta a saúde humana com a saúde animal e o meio ambiental, o uso disseminado de antimicrobianos em animais, contribui para a propagação de genes de resistência

entre os microrganismos (MCEWEN; COLLIGNON, 2017). Portanto, o presente trabalho tem por finalidade analisar *E. coli* isolado de canários com colibacilose, proveniente de um criatório do Norte do Paraná e, dessa maneira, auxiliar para um melhor entendimento quanto ao agente etiológico desta infecção e o possível impacto na saúde humana, animal e no meio ambiente.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CANÁRIOS

A ordem Passeriformes é constituída por aproximadamente 5000 a 5700 diferentes espécies de pássaros, número que representa mais da metade das aves presentes no mundo (DORRESTEIN, 2009). A beleza do canto e de sua plumagem acaba favorecendo a captura destes pequenos animais e a criação em cativeiro (DORRESTEIN, 2009; SANTOS et al., 2008; TULLY, 2009).

O canário (*Serinus canaria*) é um dos representantes desta ordem mais conhecidos da população e é membro da família Fringillidae, originária dos Açores, da Ilha da Madeira e das Ilhas Canárias (BORSA; SANCHES; OLIVEIRA, 2013; DORRESTEIN, 2009). Este pássaro possui o canto suave e harmonioso, bela plumagem, temperamento dócil, e conseqüentemente tem atraído a atenção de criadores ao redor do mundo e, também de indivíduos interessados em adota-los como animais de estimação (BELEZA et al., 2019; DORRESTEIN, 2009).

Desde o ano de 1400 tem ocorrido a domesticação do canário e, os relatos na literatura indicam que a popularidade deste pássaro como animal de companhia tem se mantido em alta (BOSERET et al., 2013; DORRESTEIN, 2009; SANTOS et al., 2008). Nos Estados Unidos, os canários ocupam a quarta colocação, após cães, gatos e peixes (JORN et al., 2009). Diante disso, a alta demanda movimentou um lucrativo mercado de venda e criação desses pássaros. Na Bélgica, um único canário macho ou fêmea podem ser vendidos por aproximadamente 30 euros e a 20 euros, respectivamente (BOSERET et al., 2013). Além disso, canários que possuem características desejáveis (canto, cores e porte) são apresentados em concursos de competição nacionais e internacionais, fato que pode impactar no seu preço de venda e também de seus filhotes (BOSERET et al., 2013; DORRESTEIN, 2009).

Da mesma maneira que o ser humano, os canários podem ser acometidos por doenças causadas por microrganismos. Fatores como alimentação, estresse e alojamento influenciam a saúde das aves (DORRESTEIN, 2009). Portanto, é importante que os tutores adotem medidas preventivas ao manipular os

pássaros, para evitar a contaminação e a disseminação de microrganismos patogênicos (BOSERET et al., 2013; JORN et al., 2009).

2.2 *ESCHERICHIA COLI*

Escherichia coli é um bacilo Gram-negativo, da família Enterobacteriaceae e está presente na microbiota humana, em animais e também no meio ambiente (NATARO; KAPER, 1998; STROMBERG et al., 2017). Foi descrito por Theodor Von Escherich (1857–1911) em 1885 como agente não patogênico e associado a microbiota de crianças saudáveis (KNÖBL et al., 2013). Este microrganismo, facultativo anaeróbico, coloniza o trato intestinal de animais de sangue quente, sendo abundantemente encontrado neste local por ter sucesso ao competir com outros microrganismos (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; STROMBERG et al., 2017).

Na maior parte das vezes, cepas comensais de *E. coli* são raramente associadas a doenças, exceto em situações específicas, como no comprometimento da barreira do trato gastrointestinal ou em indivíduos imunocomprometidos (NATARO; KAPER, 1998). Embora essas cepas sejam inofensivas, genes de virulência podem ser adquiridos e transferidos entre diferentes bactérias, criando novas combinações e aumentando a variabilidade de genes que favorece a adaptação a novos nichos e a capacidade de causar um amplo espectro de doenças em humanos e animais (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

Cepas de *E. coli* patogênica estão associadas com infecções do trato urinário, sepse e meningite e, também em infecções entéricas (CLEMENTS et al., 2012; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). Entretanto, as doenças causadas por este microrganismo não se restringem ao ser humano e, outros animais também podem ser acometidos (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; PUÑO-SARMIENTO et al., 2013).

2.2.1 *Escherichia Coli* Patogênica Para Aves (APEC)

E. coli patogênica para aves é a principal causa de doenças respiratórias e sistêmicas em aves, sendo que situações de estresse, má alimentação ou manejo inadequado, podem favorecer a colonização intestinal por este microrganismo (BORGES et al., 2017; KNÖBL et al., 2008; STROMBERG et al.,

2017). Dessa forma, a colibacilose aviária causada por APEC, pode se manifestar de diferentes maneira, tais como aerossaculite, celulite, síndrome da cabeça inchada, salpingite, septicemia (KNÖBL et al., 2013; NAKAZATO et al., 2009).

A patogenicidade esta correlacionada com genes que expressam fatores de virulência, entre elas adesinas, toxinas, sistemas de captação de ferro e resistência ao soro do hospedeiro (NAKAZATO et al., 2009; PICARD et al., 1999). Apesar de não haver um consenso quanto ao marcador genético ideal para APEC, Johnson et al. (2008), atribuíram a presença de cinco genes (*iutA*, *hlyF*, *iss*, *iroN*, *ompT*) como preditores mínimos de virulência para aves. O gene *iss* tem sido associado como marcador de virulência ao ser encontrado com maior prevalência em cepas isoladas de aves doentes (ABREU et al., 2010; LIMA-FILHO et al., 2013).

A sorotipagem é um método tradicional para identificar *E. coli*, utilizando anticorpos contra antígenos de superfície (antígeno somático O, antígeno flagelar H e antígenos capsulares K). O antígeno O constitui a parte mais externa do lipossacarídeo (LPS) presente em bactérias Gram negativas e por isso, é utilizada em estudos epidemiológicos de cepas patogênicas (FRATAMICO et al., 2016; IGUCHI et al., 2015). Os casos de colibacilose em aves de produção são relacionados aos sorotipos O1, O4, O6, O11, O36 e O100, sendo prevalente no território brasileiro os sorotipos O2, O21, O50, O78, O88, O119 e O152 (CAMARGO; SUFFREDINI, 2015; KNÖBL et al., 2013).

A classificação em grupos filogenéticos proposto por Clermont et al. (2013) agrupa as cepas de *E. coli* em diferentes grupos (A, B1, B2, C, D, E, F), baseado na presença ou não dos genes *chuA*, *yjaA*, *TspE4.C2* e *arpA*. Diferentes trabalhos relacionam cepas altamente virulentas de ExPEC isolado de humanos com os grupos filogenéticos B2 e D, e as cepas comensais aos grupos A e B1. Entretanto, o mesmo não ocorre para APEC, a qual há uma predominância das cepas patogênicas nos grupos filogenéticos A e D, e em menor extensão no grupo B2 (CLERMONT et al., 2013; EWERS et al., 2007; LOGUE et al., 2017; STROMBERG et al., 2017). Uma vez que os grupos filogenéticos A e B1 são considerados comensais, as cepas podem apresentar uma inesperada patogenicidade, fato que ainda não é muito bem esclarecido (LEMAÎTRE et al., 2013).

2.3 RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA

Os antimicrobianos revolucionaram a medicina e o tratamento das doenças causadas por microrganismos, reduzindo a mortalidade associada a infecções bacterianas (COSTA; SILVA JUNIOR, 2017; RICHARDSON, 2017). Embora a resistência microbiana seja um processo evolutivo natural frente a pressão seletiva, o uso disseminado e prolongado de antimicrobianos pode comprometer sua eficácia, pois cepas naturalmente (ou intrinsecamente) resistentes tem maiores chances de sobreviver e se multiplicar. O tratamento antimicrobiano inadequado (dosagens sub-terapêuticas, baixa adesão ao tratamento, escolhas equivocadas) também contribui para o aumento da incidência de bactérias resistentes (PREMANANDH; SAMARA; MAZEN, 2016; PRESTINACI; PEZZOTTI; PANTOSTI, 2015).

Além do seu papel na clínica humana, os antimicrobianos empregados de forma empírica no tratamento de aves, como o canário, favorece a seleção de linhagens de microrganismos resistentes (DIREN SIGIRCI et al., 2020; GIACOPELLO et al., 2015). Uma vez que a transferência horizontal de genes por plasmídeo conjugado confere resistência aos antimicrobianos, o contato do homem com cepas resistentes oriundas de aves facilitaria a disseminação destes genes tanto no ambiente quanto entre humanos e animais (BARROS et al., 2012; DIREN SIGIRCI et al., 2020; RICHARDSON, 2017).

Os microrganismos podem apresentar diferentes perfis de resistência. De acordo com Magiorakos et al. (2012), estes perfis são classificados em três categorias: (a) multirresistente (MDR) se for resistente a três ou mais classes de antimicrobianos; (b) extensamente resistentes (XDR) se apresentar resistência a todos os antimicrobianos de todas classes, exceto duas classes quaisquer; (c) pan-resistentes (PDR) possuem resistência a todos antimicrobianos de todas as classes disponíveis.

Diante disso, um dos grandes desafios da medicina atual é o combate a crescente resistência dos microrganismos aos antimicrobianos disponíveis (PRESTINACI; PEZZOTTI; PANTOSTI, 2015). Cada vez mais a resistência aos antimicrobianos é vista como uma ameaça global, pois o desenvolvimento de novos fármacos não progride na mesma velocidade (PREMANANDH; SAMARA; MAZEN, 2016). De acordo com O'Neill (2014), é

estimado que a resistência antimicrobiana poderá causar a morte 10 milhões de pessoas em 2050. Este número é superior ao se comparar com outras causas, como o câncer (8.2 milhões) e o diabetes (1.5 milhões). Dessa maneira, medidas como limpeza e sanitização de ambientes, uso do medicamento adequado em doses corretas para o microrganismo alvo, podem minimizar o desenvolvimento e disseminação da resistência aos antimicrobianos (AYUKEKBONG; NTEMGWA; ATABE, 2017; PREMANANDH; SAMARA; MAZEN, 2016).

A inter-relação entre humanos e animais deve ser entendido como Rudolf Virchow (1821-1902) afirmou ao dizer que, entre a saúde humana e animal não há linhas divisórias (KAHN; KAPLAN; STEELE, 2007). O conceito de Saúde Única não é novo e define que a saúde humana esta interligada com a saúde animal e o meio ambiente (MCEWEN; COLLIGNON, 2017). Organizações mundiais, como o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) tem empregado esforços para promover este conceito e trabalhado com diversos profissionais, como médicos, veterinários, ecologistas, entre outros, a fim de monitorar e controlar doenças que ameaçam a saúde pública (DHAMA et al., 2013; KAHN; KAPLAN; STEELE, 2007). Portanto, ao considerar a indissociabilidade da saúde humana, animal e ambiental, as doenças que acometem as aves também podem impactar a saúde humana.

3. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ABREU, D. L. *et al.* Perfil de sensibilidade antimicrobiana e detecção do gene ISS pela reação em cadeia da polimerase na tipificação de *Escherichia coli* patogênica em codornas de corte sob inspeção sanitária. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, [S. l.], v. 30, n. 5, p. 406–410, 2010. DOI: 10.1590/S0100-736X2010000500006. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2010000500006. Acesso em: 2 fev. 2020.

AYUKEKBONG, J. A.; NTEMGWA, M.; ATABE, A. N. The threat of antimicrobial resistance in developing countries: Causes and control strategies. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, Great Britain, v. 6, n. 1, p. 1–8, 2017. DOI: 10.1186/s13756-017-0208-x. Disponível em: <https://aricjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13756-017-0208-x>. Acesso em: 4 fev. 2020.

BARROS, M. R. *et al.* Resistência antimicrobiana e perfil plasmidial de *Escherichia coli* isolada de frangos de corte e poedeiras comerciais no Estado de Pernambuco. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 32, n. 5, p. 405–410, 2012. DOI: 10.1590/S0100-736X2012000500008. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/pvb/v32n5/a08v32n5.pdf>. Acesso em: 4 fev. 2020.

BELEZA, A. J. F. *et al.* Detection of enterobacteriaceae, antimicrobial susceptibility, and virulence genes of *Escherichia coli* in canaries (*Serinus canaria*) in northeastern Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, [S. l.], v. 39, n. 3, p. 201–208, 2019. DOI: 10.1590/1678-5150-PVB-5829. Acesso em: 10 fev. 2020.

BORGES, C. A. *et al.* Multidrug-resistant pathogenic *Escherichia coli* isolated from wild birds in a veterinary hospital. **Avian Pathology**, United Kingdom, v. 46, n. 1, p. 76–83, 2017. DOI: 10.1080/03079457.2016.1209298. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/03079457.2016.1209298>. Acesso em: 25 jan. 2020.

BORSA, A.; SANCHES, O. C.; OLIVEIRA, G. R. Septicemia resulting from bumblefoot in color canaries (*Serinus canarius*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, [S. l.], v. 65, n. 3, p. 768–772, 2013. DOI: 10.1590/S0102-09352013000300024. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352013000300024&lng=en&nrm=iso&tlng=pt. Acesso em: 10 fev. 2020.

BOSERET, G. *et al.* Zoonoses in pet birds: Review and perspectives. **Veterinary Research**, [S. l.], v. 44, n. 1, p. 2–17, 2013. DOI: 10.1186/1297-9716-44-36. Disponível em: <https://veterinaryresearch.biomedcentral.com/articles/10.1186/1297-9716-44-36>. Acesso em: 8 fev. 2020.

CAMARGO, L. R. P., SUFFREDINI, I. B. Impacto causado por *Escherichia coli* na produção de animais de corte no Brasil : revisão de literatura. **Journal of the Health Sciences Institute**, São Paulo, v. 33, n. 2, p. 193–197, 2015. DOI: ISSN: 0104-1894. Disponível em: https://www.unip.br/presencial/comunicacao/publicacoes/ics/edicoes/2015/02_abr-jun/V33_n2_2015_p193a197.pdf. Acesso em: 4 fev. 2020.

CLEMENTS, A. *et al.* Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. **Gut Microbes**, Austin, USA, v. 3, n. 2, p. 71–87, 2012. DOI: 10.4161/gmic.19182. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.4161/gmic.19182>. Acesso em: 5 fev. 2020.

CLERMONT, O. *et al.* The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: Improvement of specificity and detection of new phylo-groups. **Environmental Microbiology Reports**, [S. l.], v. 5, n. 1, p. 58–65, 2013. DOI: 10.1111/1758-2229.12019. Disponível em: <https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/1758-2229.12019>. Acesso em: 3 fev. 2020.

COSTA, A. L. P.; SILVA JUNIOR, A. C. S. Resistência bacteriana aos antibióticos e Saúde Pública: uma breve revisão de literatura. **Estação Científica (UNIFAP)**, Macapá, v. 7, n. 2, p. 45, 2017. DOI: 10.18468/estcien.2017v7n2.p45-57. Disponível em: <https://periodicos.unifap.br/index.php/estacao/article/view/2555/andersonv7n2.pdf>. Acesso em: 2 fev. 2020.

DHAMA, K. *et al.* One world, one health-veterinary perspectives. **Advances in Animal and Veterinary Sciences**, Lahore, Pakistan, v. 1, n. 1, p. 5–13, 2013. Disponível em: https://nexusacademicpublishers.com/table_contents_detail/4/22/html. Acesso em: 5 fev. 2020.

DIREN SIGIRCI, B. *et al.* Antimicrobial resistance profiles of *Escherichia coli* isolated from companion birds. **Journal of King Saud University - Science**, Saudi Arabia, v. 32, n. 1, p. 1069–1073, 2020. DOI: 10.1016/j.jksus.2019.09.014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2019.09.014>. Acesso em: 7 fev. 2020.

DORRESTEIN, G. M. Passerines. *In*: TULLY, T. N., DORRESTEIN, G. M., JONES, A. K. (org.). **Handbook of Avian Medicine**. 2. ed. Philadelphia, Pennsylvania : Elsevier, 2009. p. 169–208.

EWERS, C. *et al.* Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: How closely related are they? **International Journal of Medical Microbiology**, Stuttgart, v. 297, n. 3, p. 163–176, 2007. DOI: 10.1016/j.ijmm.2007.01.003. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1438422107000173?via%3Di> hub. Acesso em: 20 jan. 2020.

FRATAMICO, P. M. *et al.* Advances in molecular serotyping and subtyping of *Escherichia coli*. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, Switzerland, v. 7, n. MAY, p. 1–8, 2016. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00644. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2016.00644/full>. Acesso em: 27 jan. 2020.

GIACOPELLO, C. *et al.* Antibiotic-resistance patterns of gram-negative bacterial isolates from breeder canaries (*Serinus canaria domestica*) with clinical disease. **Journal of Exotic Pet Medicine**, [S. l.], v. 24, n. 1, p. 84–91, 2015. DOI: 10.1053/j.jepm.2014.12.009. Disponível em:

<http://dx.doi.org/10.1053/j.jepm.2014.12.009>. Acesso em: 3 fev. 2020.

IGUCHI, A. *et al.* *Escherichia coli* O-genotyping PCR: A comprehensive and practical platform for molecular O serogrouping. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 53, n. 8, p. 2427–2432, 2015. DOI: 10.1128/JCM.00321-15. Disponível em: <https://jcm.asm.org/content/53/8/2427.long>. Acesso em: 3 fev. 2020.

JOHNSON, T. J. *et al.* Identification of minimal predictors of avian pathogenic *Escherichia coli* virulence for use as a rapid diagnostic tool. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 46, n. 12, p. 3987–3996, 2008. DOI: 10.1128/JCM.00816-08. Disponível em: <https://jcm.asm.org/content/jcm/46/12/3987.full.pdf>. Acesso em: 27 jan. 2020.

JORN, K. S. *et al.* Polly can make you sick: Pet bird-associated diseases. **Cleveland Clinic Journal of Medicine**, Philadelphia, v. 76, n. 4, p. 235–243, 2009. DOI: 10.3949/ccjm.76a.08018. Disponível em: <https://mayoclinic.pure.elsevier.com/en/publications/polly-can-make-you-sick-pet-bird-associated-diseases>. Acesso em: 8 fev. 2020.

KAHN, L. H.; KAPLAN, B.; STEELE, J. H. Confronting zoonoses through closer collaboration between medicine and veterinary medicine (as 'one medicine'). **Veterinaria italiana**, Teramo, Italy, v. 43, n. 1, p. 5–19, 2007. Disponível em: http://www.izs.it/vet_italiana/2007/43_1/5.htm. Acesso em: 27 jan. 2020.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, [S. l.], v. 2, n. 2, p. 123–140, 2004. DOI: 10.1038/nrmicro818. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrmicro818/>. Acesso em: 26 jan. 2020.

KNÖBL, T. *et al.* A similaridade genética de *Escherichia coli* patogênica para as aves (APEC) com estirpes humanas e a resistência antimicrobiana justificam a preocupação sanitária em relação aos produtos de origem aviária? **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, [S. l.], v. 11, n. 2, p. 24–33, 2013. Acesso em: 26 jan. 2020.

KNÖBL, T. *et al.* Caracterização molecular dos fatores de virulência de estirpes de *Escherichia coli* isoladas de papagaios com colibacilose aviária. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, [S. l.], v. 45, n. SUPPL., p. 54–60, 2008. DOI: 10.11606/s1413-95962008000700007. Disponível em: <http://www.revistas.usp.br/bjvras/article/view/26729>. Acesso em: 26 jan. 2020.

LEMAÎTRE, C. *et al.* A conserved virulence plasmidic region contributes to the virulence of the multiresistant *Escherichia coli* meningitis strain S286 belonging to phylogenetic group C. **PLoS ONE**, United States of America, v. 8, n. 9, p. 1–10, 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0074423. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0074423>. Acesso em: 26 jan. 2020.

LIMA-FILHO, J. V. *et al.* Zoonotic potential of multidrug-resistant extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* obtained from healthy poultry carcasses in Salvador, Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, [S. l.], v. 17, n. 1, p. 54–61, 2013.

DOI: 10.1016/j.bjid.2012.09.004. Disponível em:
http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1413-86702013000100009&lng=pt&nrm=iso. Acesso em: 26 jan. 2020.

LOGUE, C. M. *et al.* Comparative analysis of phylogenetic assignment of human and avian ExPEC and fecal commensal *Escherichia coli* using the (previous and revised) clermont phylogenetic typing methods and its impact on avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) classification. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, Switzerland, v. 8, n. FEB, 2017. DOI: 10.3389/fmicb.2017.00283. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2017.00283/full>. Acesso em: 26 jan. 2020.

MAGIORAKOS, A. P. *et al.* Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical Microbiology and Infection**, [S. l.], v. 18, n. 3, p. 268–281, 2012. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x. Disponível em: [https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X\(14\)61632-3/fulltext](https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X(14)61632-3/fulltext). Acesso em: 25 jan. 2020.

MCEWEN, S. A.; COLLIGNON, P. J. Antimicrobial Resistance: A One Health Colloquium. **Microbiology Spectrum**, United States of America, v. 6, n. 2, p. 1–26, 2017. DOI: 10.1128/microbiolspec.ARBA-0009-2017.Correspondence. Disponível em: www.chathamhouse.org. Acesso em: 15 mar. 2020.

NAKAZATO, G. *et al.* Virulence factors of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 29, n. 7, p. 479–486, 2009. DOI: 10.1590/s0100-736x2009000700001. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2009000700001. Acesso em: 24 jan. 2020.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, United States of America, v. 11, n. 1, p. 142–201, 1998. DOI: 10.1128/cmr.11.1.142. Disponível em: <https://cmr.asm.org/content/11/1/142>. Acesso em: 24 jan. 2020.

NEILL, J. O'. Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations **The Review on Antimicrobial Resistance Chaired**. United Kingdom: HM Government. Dez.2014.

PICARD, B. *et al.* The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection. **Infection and Immunity**, United States of America, v. 67, n. 2, p. 546–553, 1999. DOI: 10.1128/iai.67.2.546-553.1999. Disponível em: <https://iai.asm.org/content/67/2/546>. Acesso em: 23 jan. 2020.

PREMANANDH, J.; SAMARA, B. S.; MAZEN, A. N. Race against antimicrobial resistance requires coordinated action – an overview. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, Switzerland, v. 6, n. February, p. 1–6, 2016. DOI: 10.3389/fmicb.2015.01536. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2015.01536/full>. Acesso em: 6 fev. 2020.

PRESTINACI, F.; PEZZOTTI, P.; PANTOSTI, A. Antimicrobial resistance: A global multifaceted phenomenon. **Pathogens and Global Health**, United Kingdom, v. 109, n. 7, p. 309–318, 2015. DOI: 10.1179/2047773215Y.0000000030. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1179/2047773215Y.0000000030>. Acesso em: 7 fev. 2020.

PUÑO-SARMIENTO, J. *et al.* Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from dogs and cats in Brazil. **Veterinary Microbiology**, [S. l.], v. 166, n. 3–4, p. 676–680, 2013. DOI: 10.1016/j.vetmic.2013.07.007. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113513003696?via%3Dihub>. Acesso em: 6 mar. 2020.

RICHARDSON, L. A. Understanding and overcoming antibiotic resistance. **PLoS Biology**, United States of America, v. 15, n. 8, p. 1–5, 2017. DOI: 10.1371/journal.pbio.2003775. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosbiology/article?id=10.1371/journal.pbio.2003775>. Acesso em: 7 fev. 2020.

SANTOS, G. G. C. *et al.* Doenças de aves selvagens diagnosticadas na Universidade Federal do Paraná (2003-2007). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 28, n. 11, p. 565–570, 2008. DOI: 10.1590/S0100-736X2008001100005.

STROMBERG, Z. R. *et al.* Evaluation of *Escherichia coli* isolates from healthy chickens to determine their potential risk to poultry and human health. **PLoS ONE**, United States of America, v. 12, n. 7, p. 1–18, 2017. DOI: 10.1371/journal.pone.0180599. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0180599>. Acesso em: 7 fev. 2020.

TULLY, T. N. Birds. In: MITCHELL, M. A., TULLY, T. N. (org.). **Manual of Exotic Pet Practice**. St Louis, Missouri: Saunders, 2009. p. 250–298.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar cepas de *E. coli* isoladas de canários de um criadouro do Norte do Paraná.

4.1.2 Objetivos Específicos

- a) Pesquisar os genes de virulência e resistência característicos de APEC e DEC e classificá-los filogeneticamente.
- b) Analisar o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos utilizados na clínica veterinária e humana.
- c) Analisar a variabilidade genética de *E. coli* isolada de canários por meio da técnica do ERIC-PCR (enterobacterial repetitive intergenic consensus polymerase chain reaction).
- d) Analisar as cepas de *E. coli* por meio da técnica do MLST (multilocus sequence typing) e comparar o ST (sequence typing) resultante com os dados presente na literatura quanto a relação epidemiológica e o perfil de patogenicidade.
- e) Determinar o sorotipo das cepas de *E. coli* isoladas de canários e o perfil de invasão em células da linhagem HeLa.

5. ARTIGO CIENTÍFICO

Characterization of multidrug-resistant avian pathogenic *Escherichia coli*: an outbreak in canaries

Angela Hitomi Kimura^a, Vanessa Lumi Koga^a, Benito Guimarães de Brito^b, Kelly Cristina Taglieri de Brito^b, Gerson Nakazato^a, Renata Katsuko Takayama Kobayashi^a *

^a Department of Microbiology, Laboratory of Basic and Applied Bacteriology, State University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil

^b Laboratory of Avian Health, Institute of Veterinary Research Desidério Finamor, Eldorado do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil

***Corresponding author**

kobayashirt@uel.br

Phone: +55 (43) 3371-4396

ABSTRACT

The canary (*Serinus canaria*) is a songbird, appreciated for its beautiful song, colors and docile temperament, and drives a lucrative business. However, diseases caused by avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) compromises the health of birds and the inadequate empirical antimicrobial treatment can lead to the emergence of resistant strains. Our study characterizes 21 strains of *E. coli* isolated from canaries suffering from a colibacillosis outbreak in northern Paraná. APEC and diarrheagenic *E. coli* (DEC) virulence genes were screened by polymerase chain reaction (PCR). All strains were positive for *hlyF*, *iss* and *ompT* genes, which are characteristic of APEC. The *iroN* gene was found in 95.2% of strains, and none had the *iutA* gene. The *ipaH* gene, characteristic of enteroinvasive *E. coli* (EIEC), was found in 71.4% of strains, all belonging to the phylogenetic group B1. High genetic similarity, above 95%, was found using enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR (ERIC-PCR). The isolates belonged to serotypes O117:H4 (71.4%) and O1:H20 (23.8%). This is the first report of a clonal colibacillosis outbreak in canaries caused by APEC. All strains were resistant to ampicillin, nalidixic acid, ciprofloxacin, enrofloxacin, norfloxacin and tetracycline. In addition, resistance has been found in other antimicrobials: cefazolin (71.4%), chloramphenicol (90.5%), gentamicin (61.9%) and trimethoprim-sulfamethoxazole (76.2%). The high rate of multidrug-resistance in our study shows the importance of avoiding the inadequate empirical antimicrobial treatment. We suggest that further studies be conducted that contribute to the understanding of colibacillosis in canaries, since the health of animals is linked to human and environmental health, as defined by the concept of One Health.

Keywords: avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC), antimicrobial resistance, colibacillosis, serotyping.

1. Introduction

The canary (*Serinus canaria*) is a songbird in the Fringillidae family, known for its docile temperament (Beleza et al., 2019). This bird can be kept as a pet used in singing competitions, and canaries are highly valued for their beautiful song and appearance, which includes a variety of colors (Boseret et al., 2013). In addition, the popularity of this bird as a pet is increasing. In the United States, canaries are the fourth most popular pet, after dogs, cats, and fish (Jorn et al., 2009). Thus, canary breeding has become a lucrative business (Boseret et al., 2013; Di Francesco et al., 2018).

Escherichia coli is a commensal bacterium, however it can become pathogenic and cause disease in humans and other animals, including birds (Beleza et al., 2019). Colibacillosis is caused by avian pathogenic *E. coli* (APEC), and has the potential to compromise the health of birds. This disease can manifest in different ways, and symptoms may include prostration, conjunctivitis, airsacculitis, cellulitis, swollen head syndrome, peritonitis, salpingitis, osteomyelitis, and septicemia (Nakazato et al., 2009; Knöbl et al., 2013).

Inadequate antimicrobial empirical treatment in animals can lead to the emergence of resistant strains and, consequently, to therapeutic failure (Knöbl et al., 2013; Premanandh et al., 2016; Ayukebong et al., 2017). There are currently few studies on the genetic profile and susceptibility of *E. coli* isolated from canaries to antimicrobials. Therefore, the objective of the present study was to characterize *E. coli* isolated from canaries with colibacillosis. In this way, we hope our results will contribute to a better understanding of the etiological agent causing colibacillosis, and inform measures to prevent the spread of antimicrobial resistance, since, according to the concept of One Health, multidrug-resistant bacteria affect not only veterinary medicine, but also the environment and human medicine.

2. Material and methods

2.1. Bacterial strains and DNA isolation

From January to February 2015, 21 samples were collected from a canary breeder in northern Paraná, Brazil, and each sample was collected from a different bird. These samples were collected directly from yellowish caseous exudate caseous

with sterile cotton swab (ABSORVE®), during the necropsy of the birds. According to the local veterinarian, all canaries had the same clinical symptom (facial edema) (Fig. 1), and there were no other significant macroscopic lesions.

The samples were submitted for the diagnosis of aspergillosis, pasteurellosis, staphylococcosis, and infectious coryza by conventional microbiological methods. For the diagnosis of chlamydiosis and mycoplasmosis, molecular tests such as PCR were performed. For the diagnosis of metapneumovirus, real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed, according to the recommendations of the American Association of Avian Pathologists (AAAP, 2016).

The strains were stored in stock culture agar at room temperature, for subsequent extraction of bacterial DNA. For this, each strain was inoculated in 1.5 ml of nutrient broth (Difco™) and kept under agitation for 24 h at 37 °C. These strains were cultured on MacConkey agar (Difco™) plates and incubated for 24 h. After that, colonies were suspended in a microtube with 200 µL of sterile water and that was boiled for 10 min at 100 °C. Finally, samples were centrifuged at 10.000 x g for 5 min, and the supernatant containing DNA was stored at -20 °C until use for PCR experiments.

Fig. 1 - Canary (*Serinus canaria*) with swelling on the face and in the periorbital area. Image provided by Dr. Benito Guimarães de Brito.



2.2. Antimicrobial susceptibility testing

Antimicrobial susceptibility was determined by disk diffusion method, according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2018, 2020) guidelines. The following antibiotics were used: ciprofloxacin, enrofloxacin (5 µg); ampicillin, norfloxacin, gentamicin (10 µg); cefazolin; nalidixic acid, cefotaxime, ceftazidime, tetracycline, chloramphenicol (30 µg); amoxicillin - clavulanic acid (30 µg); trimethoprim-sulfamethoxazole (1.25/23.75 µg) (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hants, UK). The *E. coli* ATCC 25922 strain was used as a negative control.

2.3. Polymerase chain reaction (PCR)

In this study, genes that encode the most prevalent virulence factors in DEC (*eeaeA*, *ehxA*, *stx1*, *stx2*, *elt*, *ipaH*) and APEC (*hlyF*, *iss*, *ompT*, *iroN*, *iutA*) were detected as described by Paton and Paton (1998), Aranda et al. (2007) and Johnson et al. (2008). In addition, we also evaluated the *papG* (fimbria P), *ibeA* (invasion of brain endothelium), *fyuA* (yersiniabactin receptor), *traT* (increased serum survival), *fimH* (mannose-specific adhesin subunit of type 1 fimbriae), *hlyA* (hemolysin A), *cnf1* (cytotoxic necrotizing factor 1) genes, which are also virulence factor genes. These genes were analyzed according to the methods describe by Johnson and Stell, (2000). Analyses of the *papC* (fimbria P) and *cnf2* (cytotoxic necrotizing factor 2) genes were performed as described by Le Bouguenec et al. (1992) and Blanco et al. (1996), respectively. In additional, the isolates were classified into phylogenetic groups (A, B1, B2, C, D, E and F) based on the presence or absence of genes *chuA*, *yjaA*, *arpA* and DNA fragment TspE4.C2, as described by Clermont et al. (2013).

The PCR reaction contained 1.25 U of Taq DNA polymerase (Invitrogen) in 1X PCR buffer (Invitrogen), 0.2 mM of each dNTP, 2.5 mM of MgCl₂ and 1 µM of each primer. PCR products were stained with GelRed[®] (Biotium) and subjected to electrophoresis on 2% agarose gel. A 1 kb Plus DNA ladder (Invitrogen) was used as the molecular marker. After electrophoresis, the DNA bands were visualized on a UV transilluminator, and the images captured using an Image Capture System (LPixImageHE, Loccus Biotecnologia).

2.4. Plasmid-mediated quinolone resistance genes (PMQR)

Qualitative PCR assays were used to assess the presence of PMQR genes (*qnrA*, *qnrB*, *qnrS*) as described by Cattoir et al. (2007). Other additional PMQR determinants, *qnrD*, *aac(6')-Ib-cr*, *qepA*, *oqxA* and *oqxB*, were performed as described by Park et al. (2006); Cattoir et al. (2008); Cavaco et al. (2009) and Chen et al. (2012). PCR analysis was performed as described in the previous section.

2.5. Enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC- PCR)

The clonality of the strains was investigated using the method described by Versalovic et al. (1991), with some modifications. DNA was extracted using a PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen). Amplification was performed in a thermocycler with initial denaturation at 95 °C for 7 min, followed by 35 cycles at 94 °C for 1 min, 52 °C for 1 min, 65 °C for 8 min, and a final extension step at 65 °C for 16 min. PCR analysis was performed as previously described. These images were analyzed with BioNumerics software version 7.6 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium). The dendrogram was generated based on the Dice similarity coefficient with a 2% position tolerance and the unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA).

2.6. Multilocus Sequence Typing (MLST)

MLST was performed according to the Achtman's scheme (http://enterobase.warwick.ac.uk/species/ecoli/allele_st_search). The characterization of bacterial species was based on the sequencing of fragments of internal sequences from seven housekeeping genes (*adk*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA* e *recA*). For sequencing, the amplicons were purified with a column-based kit (Pure Link Quick PCR Purification Kit, Invitrogen, Germany). The purified product was sequenced using Sanger methodology in the Soil Biotechnology Laboratory from the Brazilian Agricultural Research Corporation (Embrapa). The sequence type (ST) allele was assigned using Achtman's scheme (http://enterobase.warwick.ac.uk/species/ecoli/allele_st_search).

2.7. Serotyping

E. coli strains were serotyped in an agglutination assay using rabbit antisera (SERUNAM, registered trademark in Mexico) against 188 somatics (O) antigens and

53 flagellar (H) antigens, according to the method described by Ørskov and Ørskov, 1984, with some modifications.

2.8. Invasion of HeLa cells

Considering the high genetic similarity between the ERIC types and the presence of the *ipaH* gene (C65, C67) and the sensitivity to antimicrobials cefazolin (C8, C65), gentamicin (C8, C65, C67), trimethoprim-sulfamethoxazole (C8) and amoxicillin-acid clavulanic (C8, C65, C67), three isolates (C8, C65, C67) were selected of invasion assay in HeLa cells, as previously described by Chue-Gonçalves et al. (2018). Duncan's multiple range test was performed using R version 3.6.0. Differences were considered statistically significant when $p < 0.05$ (confidence level of 95%, $\alpha = 0.05$).

3. Results

3.1. Identification of the etiologic agent of the infection

A canary breeder in northern Paraná had a disease outbreak involving 21 canaries. To identify the causative agent, a differential diagnosis was established by conventional microbiological methods and PCR. The results were negative for aspergillosis, infectious coryza, chlamydiosis, pasteurellosis, staphylococcosis, mycoplasmosis, and pneumovirus. *E. coli* was detected after the analyses, and it was concluded that the canaries had colibacillosis.

3.2. Antimicrobial sensitivity

All *E. coli* strains were resistant to quinolones and fluoroquinolones (ciprofloxacin, enrofloxacin, norfloxacin and nalidixic acid), ampicillin and tetracycline (Table 1). The first-generation cephalosporin (cefazolin) showed an expressive resistance profile (71.4%). Some strains were resistant to chloramphenicol (90.5%), trimethoprim-sulfamethoxazole (76.2%), gentamicin (61.9%) and amoxicillin/clavulanic acid (4.8%) (Table 1). However, all strains were sensitive the second generation (cefoxitin) and third generation cephalosporins (cefotaxime, ceftazidime). Therefore, the isolates were not producers of extended-spectrum β -lactamase (ESBL).

3.3. Virulence factors, phylogenetic classification and resistance factor genes

In this study, all *E. coli* strains were positive for the virulence factors genes *ompT*, *iss*, *hlyF*, *traT*, *fimH* and 95% of the isolates were positive for the *iroN* gene (Table 1). Also, other virulence factor genes were detected as follows: 15 of 21 (71.4%) were as having the *ipaH* (Table 1), and none of isolates had the *iutA*, *eaeA*, *ehxA*, *stx1*, *stx2*, *elt*, *papC*, *papG*, *ibeA*, *fyuA*, *hlyA*, *cnf1*, *cnf2* genes. The PMQR determinants were only positive for *qnrS* gene in only five isolates (23.8%), and two isolates were positive for the *qnrB* gene (9.52%) (Table 1). None of isolates were positive for the *qepA*, *oqxA*, *oqxB* and *aac(6')Ib* genes. In addition, all isolates belonged to phylogenetic group B1 (Fig. 2).

Table 1 – Antimicrobial resistance and genetic profile of *Escherichia coli* isolate (n=21) isolated from canaries between January and February 2015.

Isolates	Genetic profile	Antimicrobial resistance profile
C8	<i>iroN/ompT/hlyF/iss/traT/fimH</i>	AMP, NAL, CIP, NOR, ENR, TET, CHL
C11	<i>iroN/ompT/hlyF/iss/ipaH/traT/fimH</i>	AMP, NAL, CIP, NOR, ENR, TET, CFZ, CHL, GEN, STX
C17	<i>iroN/ompT/hlyF/iss/ipaH/traT/fimH</i>	AMP, NAL, CIP, NOR, ENR, TET, CFZ, CHL, GEN, STX
C18	<i>iroN/ompT/hlyF/iss/ipaH/traT/fimH/</i> <i>qnrS</i>	AMP, NAL, CIP, NOR, ENR, TET, CFZ, CHL, GEN, STX
C19	<i>iroN/ompT/hlyF/iss/ipaH/traT/fimH/</i> <i>qnrS</i>	AMP, NAL, CIP, NOR, ENR, TET, CFZ, CHL, GEN, STX
C62	<i>iroN/ompT/hlyF/iss/traT/fimH</i>	AMP, NAL, CIP, NOR, ENR, TET, CFZ, CHL
C63	<i>iroN/ompT/hlyF/iss/traT/fimH</i>	AMP, NAL, CIP, NOR, ENR, TET, CFZ
C64	<i>iroN/ompT/hlyF/iss/traT/fimH</i>	AMP, NAL, CIP, NOR, ENR, TET, CFZ, CHL
C65	<i>iroN/ompT/hlyF/iss/ipaH/traT/fimH</i>	AMP, NAL, CIP, NOR, ENR, TET, CHL, STX
C66	<i>iroN/ompT/hlyF/iss/ipaH/traT/fimH</i>	AMP, NAL, CIP, NOR, ENR, TET, CHL, STX
C67	<i>iroN/ompT/hlyF/iss/ipaH/traT/fimH</i>	AMP, NAL, CIP, NOR, ENR, TET, CFZ, CHL, STX
C68	<i>iroN/ompT/hlyF/iss/ipaH/traT/fimH/</i> <i>qnrB</i>	AMP, NAL, CIP, NOR, ENR, TET, CFZ, CHL, GEN, STX
C69	<i>iroN/ompT/hlyF/iss/traT/fimH</i>	AMP, NAL, CIP, NOR, ENR, TET, CFZ
C70	<i>iroN/ompT/hlyF/iss/ipaH/traT/fimH/</i> <i>qnrS</i>	AMP, NAL, CIP, NOR, ENR, TET, CHL, GEN, STX
C71	<i>iroN/ompT/hlyF/iss/ipaH/traT/fimH</i>	AMP, NAL, CIP, NOR, ENR, TET, CHL, GEN, STX
C72	<i>iroN/ompT/hlyF/iss/ipaH/traT/fimH</i>	AMP, NAL, CIP, NOR, ENR, TET, CFZ, CHL, GEN, STX
C73	<i>iroN/ompT/hlyF/iss/ipaH/traT/fimH/</i> <i>qnrS</i>	AMP, NAL, CIP, NOR, ENR, TET, CFZ, CHL, GEN, STX
C74	<i>iroN/ompT/hlyF/iss/ipaH/traT/fimH</i>	AMP, NAL, CIP, NOR, ENR, TET, CHL, GEN, STX
C75	<i>ompT/hlyF/iss/ipaH/traT/fimH/qnrS/</i> <i>qnrB</i>	AMP, NAL, CIP, NOR, ENR, TET, AMC, CFZ, CHL, GEN, STX
C76	<i>iroN/ompT/hlyF/iss/ipaH/traT/fimH</i>	AMP, NAL, CIP, NOR, ENR, TET, CFZ, CHL, GEN, STX
C77	<i>iroN/ompT/hlyF/iss/traT/fimH</i>	AMP, NAL, CIP, NOR, ENR, TET, CFZ, CHL, GEN, STX

Abbreviations: AMC, amoxicillin-clavulanic acid; TET, tetracycline; NAL, nalidixic acid; GEN, gentamicin; CHL, chloramphenicol; SXT, trimethoprim-sulfamethoxazole; AMP, ampicillin; CIP, ciprofloxacin; ENR, enrofloxacin; NOR, norfloxacin; CFZ, cefazolin

3.4. ERIC- PCR, serotyping, and MLST

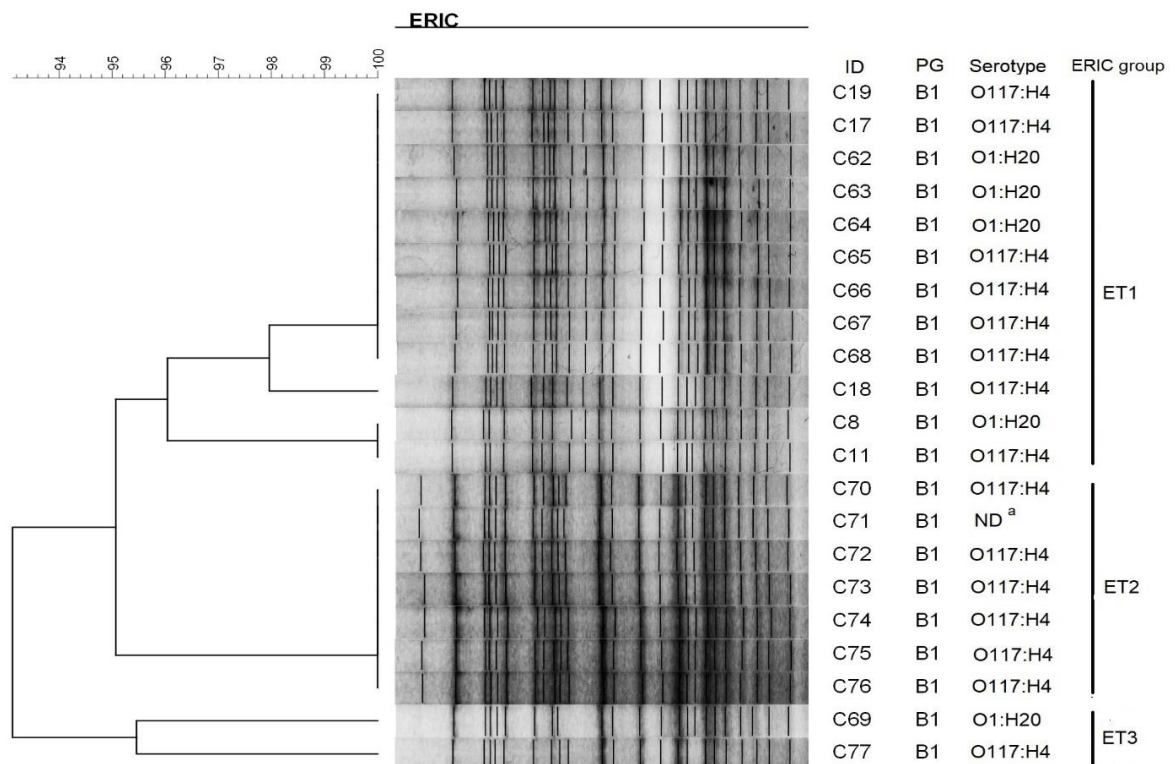
The genotyping profiles of *E. coli* according to ERIC-PCR fingerprinting are show in Fig. 2. Our strains were classified into three ERIC-types and the high degree of

genetic similarity among isolates was above 95% (Fig. 2). The isolates had two different serotypes (O117:H4 and O1:H20), with most isolates having serotype O117:H4 (71.4%), and five isolates having serotype O1:H20 (23.8%) (Fig. 2). The serotype of one (4,8%) isolate could not be determined among the surveyed serotypes. In addition, the ST of two isolates of different ERIC types, C8 (O1:H20) and C74 (O117:H4), was the same (ST224).

3.5. Invasion of HeLa cells

The strains chosen (C8, C65, C67) for the invasion test of HeLa cells belonged to different serotypes (C8: O1:H20; C65, C67: O117:H4), but presented the same invasion profile. Based on Duncan's multiple range test, the strains were considered "moderately invasive".

Fig. 2 – Dendrogram obtained by ERIC-PCR of *Escherichia coli* (n=21) isolated from canaries. Each strain is identified with ID, the phylogenetic group (PG) and serotype. The strains were grouped into three ERIC types (ET1, ET2, ET3), with 95% of genetic similarity between the clusters.



^a ND: not determined

4. Discussion and conclusions

E. coli was the etiologic agent of an outbreak involving 21 canaries with facial edema from a canary breeder in northern Paraná. The *E. coli* strains were isolated from the lesions of each bird, and it was concluded that the canaries had colibacillosis.

According to data from ERIC-PCR, which showed a genetic similarity rate above 95% in ERIC-types (ET1, ET2 and ET3), we can infer that the *E. coli* strains were clonal. This may explain the homogeneity found between the results of serotyping and the phylogenetic group (Fig. 2). Our results show that all strains belonged to phylogenetic group B1, which is consistent with previous studies that associated APEC to the phylogenetic groups A, B1, and D (Johnson et al., 2008; Lemaître et al., 2013).

Despite the lack of consensus in the scientific literature on which are the ideal genetic markers for APEC, Johnson et al. (2008) associated the presence of five genes carried by plasmids (*iutA*, *hlyF*, *iss*, *iroN* e *ompT*) with highly pathogenic strains, and the presence of three of them in strains isolated from a characteristic colibacillosis lesion is considered APEC. In our study, all strains had putative hemolysin (*hlyF*), serum resistance (*iss*) and outer membrane protein (*ompT*) genes. The salmoquelin (*iroN*) gene was present in 95% of the strains, and despite the high prevalence of the aerobactin siderophore system in ExPEC (Koga et al., 2015), none of the strains had the *iutA* gene. Therefore, the strains in this study can be characterized as APEC, as they had four or more virulence genes. To the best of our knowledge, this is the first report of a clonal outbreak in canaries caused by APEC.

Interestingly, in our study, there was a high prevalence of another virulence gene (*ipaH*) in 71.4% of strains. This gene is present in enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC) and is not common in APEC (Gomes et al., 2016; Michelacci et al., 2016). However, Mohamed et al. (2018) detected *ipaH* gene in isolates from broilers that suffering from colibacillosis. The high incidence of this virulence gene in our study, and the fact that some strains were positive for the invasion assay of HeLa cells, indicate that the *ipaH* gene was being expressed. However, further studies are needed to confirm this.

Considering that the strains were clonal, two strains (C8 and C74) belonging to two different ERIC types (ET1 and ET2) were chosen to determine the ST. Both had

the same ST (ST224), however, one strain (C8) had serotype O1:H20 and the other (C74) had serotype O117:H4. This sequence type 224 was also reported by Aizawa et al. (2014), who isolated *E. coli* producing CTX-M-8 resistant to fluoroquinolone from buffalo. The same ST was found in *E. coli* producing CTX-M-15 isolated from the feces of commercial (Silva et al., 2016). Previous studies reported that is common for *E. coli* to produce extended-spectrum β -lactamases (ESBL) and AmpC (Mellata, 2013; Gao et al., 2015; Koga et al., 2015, 2019). However, all the *E. coli* strains in this study were non-ESBL-producing, as evidenced by their sensitivity to second and third generation cephalosporins.

In this study, all strains of *E. coli* were resistant to tetracycline, ampicillin and the class of quinolones and fluoroquinolones, and because of their resistance to three or more classes of antibiotics, they were classified as multidrug-resistant (Magiorakos et al., 2012). Other studies have reported the presence of multidrug-resistant bacteria in birds (Johnson et al., 2012; Laarem et al., 2017), and some of these antibiotic are drugs used to treat various infectious diseases in humans, such as β -lactams, fluoroquinolones, aminoglycosides and sulfamethoxazole/trimethoprim (Rodrigues et al., 2013). This is concerning, because the canary breeder reported using medications such as tetracyclines, sulfonamides, enrofloxacin, and gentamicin, without the knowledge of the etiologic agent. Thus, we emphasize the importance of avoiding the inadequate empirical antimicrobial treatment in canaries, which can lead to the emergence of multidrug-resistant strains (Premanandh et al., 2016; Ayukekbong et al., 2017).

Although the *E. coli* strains showed high resistance to quinolones and fluoroquinolones, plasmid-mediated quinolone resistance genes were not found to a large extent. Only 23.8% (*qnrS*) and 9.52% (*qnrB*) were positive for these genes. Morgan-Linnell et al. (2009) reported that chromosomal mutations in the genes that encode gyrase (*gyrA* and *gyrB*) and topoisomerase IV (*parC* and *parE*), increased fluoroquinolone minimal inhibitory concentrations (MIC). We believe that chromosomal mutations in quinolone resistance genes, which have not been investigated, may be involved in the high rate of resistance to this class of drug.

The results of this study indicate that inadequate empirical antimicrobial treatment can lead to multidrug resistance to currently available drugs. In addition, *E. coli* can express virulence genes for DEC, even though it is not common to find in these in

APEC. Therefore, we emphasize the importance of adequate antimicrobial treatment and recommend constant monitoring of the use of antimicrobials in canaries. We also recommend further studies be conducted to increase our understanding of colibacillosis in canaries, since the health of animals is interconnected with human and environmental health, as defined by the concept of One Health.

Funding

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this article.

Acknowledgements

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001. This work was supported in part by the National Council for Scientific and Technological Development – CNPq (433656/2018-2). We thank Renan A. Ribeiro for his excellent technical assistance.

References

- AAAP, 2016. American Association of Avian Pathologists. A laboratory manual for the isolation, identification and characterization of avian pathogens. 6 ed. OmnisPress, Inc.: Wisconsin - USA. 400p.
- Aizawa, J., Neuwirt, N., Barbato, L., Neves, P.R., Leigue, L., Padilha, J., de Castro, A.F.P., Gregory, L., Lincopan, N., 2014. Identification of fluoroquinolone-resistant extended-spectrum β -lactamase (CTX-M-8)-producing *Escherichia coli* ST224, ST2179 and ST2308 in buffalo (*Bubalus bubalis*). J. Antimicrob. Chemother. 69, 2866–2869. doi:10.1093/jac/dku218
- Aranda, K.R.S., Fabbricotti, S.H., Fagundes-Neto, U., Scaletsky, I.C.A., 2007. Single multiplex assay to identify simultaneously enteropathogenic, enteroaggregative, enterotoxigenic, enteroinvasive and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains in Brazilian children. FEMS Microbiol. Lett. 267, 145–150. doi:10.1111/j.1574-6968.2006.00580.x
- Ayukekbong, J.A., Ntemgwa, M., Atabe, A.N., 2017. The threat of antimicrobial resistance in developing countries: Causes and control strategies. Antimicrob. Resist. Infect. Control 6, 1–8. doi:10.1186/s13756-017-0208-x

- Beleza, A.J.F., Maciel, W.C., Carreira, A.S., Bezerra, W.G.A., Carmo, C.C., Havt, A., Gaio, F.C., Teixeira, R.S.C., 2019. Detection of enterobacteriaceae, antimicrobial susceptibility, and virulence genes of *Escherichia coli* in canaries (*Serinus canaria*) in northeastern Brazil. *Pesqui. Vet. Bras.* 39, 201–208. doi:10.1590/1678-5150-PVB-5829
- Blanco, M., Blanco, J.E., Blanco, J., Alonso, M.P., Balsalobre, C., Mouriño, M., Madrid, C., Juárez, A., 1996. Polymerase chain reaction for detection in *Escherichia coli* strains producing cytotoxic necrotizing factor type 1 and type 2 (CNF1 and CNF2). *J. Microbiol. Methods* 26, 95–101. doi:10.1016/0167-7012(96)00900-1
- Boseret, G., Losson, B., Mainil, J.G., Thiry, E., Saegerman, C., 2013. Zoonoses in pet birds: Review and perspectives. *Vet. Res.* 44. doi:10.1186/1297-9716-44-36
- Cattoir, V., Poirel, L., Nordmann, P., 2008. Plasmid-mediated quinolone resistance pump QepA2 in an *Escherichia coli* isolate from France. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52, 3801–3804. doi:10.1128/AAC.00638-08
- Cattoir, V., Poirel, L., Rotimi, V., Soussy, C.J., Nordmann, P., 2007. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance *qnr* genes in ESBL-producing enterobacterial isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* 60, 394–397. doi:10.1093/jac/dkm204
- Cavaco, L.M., Hasman, H., Xia, S., Aarestrup, F.M., 2009. *qnrD*, a novel gene conferring transferable quinolone resistance in *Salmonella enterica* serovar Kentucky and Bovismorbificans strains of human origin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 603–608. doi:10.1128/AAC.00997-08
- Chen, X., Zhang, W., Pan, W., Yin, J., Pan, Z., Gao, S., Jiao, X., 2012. Prevalence of *qnr*, *aac(6′)-Ib-cr*, *qepA*, and *oqxAB* in *Escherichia coli* isolates from humans, animals, and the environment. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 3423–3427. doi:10.1128/AAC.06191-11
- Chue-Gonçalves, M., Custódio, C.C., Pelayo, J.S., Nakazato, G., Kobayashi, R.K.T., 2018. New approach for detection of *Escherichia coli* invasion to HeLa cells. *J. Microbiol. Methods* 152, 31–35. doi:10.1016/j.mimet.2018.07.011
- Clermont, O., Christenson, J.K., Denamur, E., Gordon, D.M., 2013. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: Improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environ. Microbiol. Rep.* 5, 58–65. doi:10.1111/1758-2229.12019
- CLSI, 2020. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 30th ed.; CLSI Supplement M100, Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne, PA, USA.
- CLSI, 2018. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; 4th ed.; CLSI supplement VET08, Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne, PA, USA.
- Di Francesco, C.E., Todisco, G., Montani, A., Profeta, F., Di Provido, A., Foschi, G., Persiani, T., Marsilio, F., 2018. Reproductive disorders in domestic canaries (*Serinus canarius domesticus*): A retrospective study on bacterial isolates and their antimicrobial resistance in Italy from 2009 to 2012. *Vet. Ital.* 54, 169–174. doi:10.12834/VetIt.955.4952.2
- Gao, L., Hu, J., Zhang, X., Wei, L., Li, S., Miao, Z., Chai, T., 2015. Application of swine manure on agricultural fields contributes to extended- spectrum β -lactamase producing *Escherichia coli* spread in Tai’an, China. *Front. Microbiol.* 6. doi:10.3389/fmicb.2015.00313
- Gomes, T.A.T., Elias, W.P., Scaletsky, I.C.A., Guth, B.E.C., Rodrigues, J.F., Piazza, R.M.F., Ferreira, L.C.S., Martinez, M.B., 2016. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Brazilian J. Microbiol.* 47, 3–30. doi:10.1016/j.bjm.2016.10.015
- Johnson, J.R., Stell, A.L., 2000. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. *J. Infect. Dis.* 181, 261–272. doi:10.1086/315217
- Johnson, T.J., Logue, C.M., Johnson, J.R., Kuskowski, M.A., Sherwood, J.S., Barnes, H.J., Debroy, C., Wannemuehler, Y.M., Obata-Yasuoka, M., Spanjaard, L., Nolan, L.K., 2012. Associations between multidrug resistance, plasmid content, and virulence potential among extraintestinal pathogenic and commensal *Escherichia coli* from humans and

- poultry. *Foodborne Pathog. Dis.* 9, 37–46. doi:10.1089/fpd.2011.0961
- Johnson, T.J., Wannemuehler, Y., Doetkott, C., Johnson, S.J., Rosenberger, S.C., Nolan, L.K., 2008. Identification of minimal predictors of avian pathogenic *Escherichia coli* virulence for use as a rapid diagnostic tool. *J. Clin. Microbiol.* 46, 3987–3996. doi:10.1128/JCM.00816-08
- Knöbl, T., Cunha, M.P.V., Menão, M.C., Ferreira, A.J.P., 2013. A similaridade genética de *Escherichia coli* patogênica para as aves (APEC) com estirpes humanas e a resistência antimicrobiana justificam a preocupação sanitária em relação aos produtos de origem aviária? *Rev. Educ. Contin. em Med. Veterinária e Zootec. do CRMV-SP* 11, 24–33.
- Koga, V.L., Maluta, R.P., Da Silveira, W.D., Ribeiro, R.A., Hungria, M., Vespero, E.C., Nakazato, G., Kobayashi, R.K.T., 2019. Characterization of CMY-2-type beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolated from chicken carcasses and human infection in a city of South Brazil. *BMC Microbiol.* 19, 1–9. doi:10.1186/s12866-019-1550-3
- Koga, V.L., Rodrigues, G.R., Scandorieiro, S., Vespero, E.C., Oba, A., De Brito, B.G., De Brito, K.C.T., Nakazato, G., Kobayashi, R.K.T., 2015. Evaluation of the antibiotic resistance and virulence of *Escherichia coli* strains isolated from chicken carcasses in 2007 and 2013 from Paraná, Brazil. *Foodborne Pathog. Dis.* 12, 479–485. doi:10.1089/fpd.2014.1888
- Laarem, M., Barguigua, A., Nayme, K., Akila, A., Zerouali, K., El Mdaghri, N., Timinouni, M., 2017. Occurrence of plasmid-mediated quinolone resistance and virulence genes in avian *Escherichia coli* isolates from Algeria. *J. Infect. Dev. Ctries.* 11, 143–151. doi:10.3855/jidc.8643
- Le Bouguenec C., Archambaud M., Labigne A., 1992. Rapid and specific detection of the *pap*, *afa*, and *sfa* adhesin-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 30, 1189-1193.
- Lemaître, C., Mahjoub-Messai, F., Dupont, D., Caro, V., Diancourt, L., Bingen, E., Bidet, P., Bonacorsi, S., 2013. A conserved virulence plasmidic region contributes to the virulence of the multiresistant *Escherichia coli* meningitis strain S286 belonging to phylogenetic group C. *PLoS One* 8, 1–10. doi:10.1371/journal.pone.0074423
- Magiorakos, A.P., Srinivasan, A., Carey, R.B., Carmeli, Y., Falagas, M.E., Giske, C.G., Harbarth, S., Hindler, J.F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D.L., Rice, L.B., Stelling, J., Struelens, M.J., Vatopoulos, A., Weber, J.T., Monnet, D.L., 2012. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin. Microbiol. Infect.* 18, 268–281. doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x
- Mellata, M., 2013. Human and avian extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: infections, zoonotic risks, and antibiotic resistance trends. *Foodborne Pathog. Dis.* 10, 916–932. doi:10.1089/fpd.2013.1533
- Michelacci, V., Prosseda, G., Maugliani, A., Tozzoli, R., Sanchez, S., Herrera-León, S., Dallman, T., Jenkins, C., Caprioli, A., Morabito, S., 2016. Characterization of an emergent clone of enteroinvasive *Escherichia coli* circulating in Europe. *Clin. Microbiol. Infect.* 22, 287.e11-287.e19. doi:10.1016/j.cmi.2015.10.025
- Mohamed, L., Ge, Z., Yuehua, L., Yubin, G., Rachid, K., Mustapha, O., Junwei, W., Karine, O., 2018. Virulence traits of avian pathogenic (APEC) and fecal (AFEC) *E. coli* isolated from broiler chickens in Algeria. *Trop. Anim. Health Prod.* 50, 547–553. doi:10.1007/s11250-017-1467-5
- Morgan-Linnell, S.K., Boyd, L.B., Steffen, D., Zechiedrich, L., 2009. Mechanisms accounting for fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* clinical isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 235–241. doi:10.1128/AAC.00665-08
- Nakazato, G., Campos, T.A. de, Stehling, E.G., Brocchi, M., Silveira, W.D. da, 2009. Virulence factors of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Pesqui. Veterinária Bras.* 29, 479–486. doi:10.1590/s0100-736x2009000700001
- Ørskov, F., Ørskov, I., 1984. 2 Serotyping of *Escherichia coli*. *Methods Microbiol.* 14, 43–112. doi:10.1016/S0580-9517(08)70447-1

- Park, C.H., Robicsek, A., Jacoby, G.A., Sahm, D., Hooper, D.C., 2006. Prevalence in the United States of *aac(6)-Ib-cr* encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 3953–3955. doi:10.1128/AAC.00915-06
- Paton, A.W., Paton, J.C., 1998. Detection and characterization of shiga toxinogenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, enterohemorrhagic *E. coli hlyA*, *rfb(O111)*, and *rfb(O157)*. *J. Clin. Microbiol.* 36, 598–602. doi:10.1128/jcm.36.2.598-602.1998
- Premanandh, J., Samara, B.S., Mazen, A.N., 2016. Race against antimicrobial resistance requires coordinated action – an overview. *Front. Microbiol.* 6, 1–6. doi:10.3389/fmicb.2015.01536
- Rodrigues, C. E. F. B., Ferreira, C. A. P., Sarmiento, A. C. A., Queiroz, M. de L. de, Rodrigues, M. A. G., Oliveira, R.L.F. de, 2013. Perfil epidemiológico das infecções urinárias diagnosticadas em pacientes atendidos no Laboratório Escola da Universidade Potiguar, Natal, RN. *NewsLab* 119, 108–116.
- Silva, K.C., Moreno, M., Cabrera, C., Spira, B., Cerdeira, L., Lincopan, N., Moreno, A.M., 2016. First characterization of CTX-M-15-producing *Escherichia coli* strains belonging to Sequence Type (ST) 410, ST224, and ST1284 from commercial swine in South America. *Antimicrob Agents Chemother* 60, 2505–2508. doi:10.1128/AAC.02788-15.
- Silva, M.M., Sellera, F.P., Fernandes, M.R., Moura, Q., Garino, F., Azevedo, S.S., Lincopan, N., 2018. Genomic features of a highly virulent, ceftiofur-resistant, CTX-M-8-producing *Escherichia coli* ST224 causing fatal infection in a domestic cat. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 15, 252–253. doi:10.1016/j.jgar.2018.10.023
- Versalovic, J., Koeuth, T., Lupski, R., 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.* 19, 6823–6831. doi:10.1093/nar/19.24.6823

6. CONCLUSÕES

- Amostras isoladas diretamente de lesões de canários com colibacilose, apresentaram genes de virulência associados com APEC, entretanto essas cepas podem abrigar genes de virulência comumente encontrados em DEC.
- Cepas de *E. coli* isolada de canários proveniente de um surto pode apresentar alta semelhança genômica e resultados semelhantes em ensaios diferentes (ST, perfil filogenético e invasão em células de linhagem HeLa), no entanto, pertencerem a sorogrupos distintos.
- *E. coli* isolada de canários pode apresentar perfil de resistência aos antimicrobianos da classe das quinolonas e fluoroquinolonas, porém os genes de resistência podem não ser mediados por plasmídeos.