



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

MARCELA CRISTINA GONÇALVES CARVALHO CUNHA

**GENES DE RESISTÊNCIA E VIRULÊNCIA EM AMOSTRAS
DE *ESCHERICHIA COLI* ISOLADAS DE CARÇAÇAS DE
FRANGO CRIADO DE FORMA CAIPIRA**

Londrina
2017

MARCELA CRISTINA GONÇALVES CARVALHO CUNHA

**GENES DE RESISTÊNCIA E VIRULÊNCIA EM AMOSTRAS
DE *ESCHERICHIA COLI* ISOLADAS DE CARÇAÇAS DE
FRANGO CRIADO DE FORMA CAIPIRA**

Dissertação apresentada ao curso Pós-graduação - Mestrado Profissional em Clínicas Veterinárias da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Gerson Nakazato

Londrina
2017

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

Cunha, Marcela Cristina Gonçalves Carvalho.

Genes de resistência e virulência em amostras de *Escherichia coli* isoladas de carcaças de frango criado de forma caipira / Marcela Cristina Gonçalves Carvalho Cunha. - Londrina, 2017.
19 f.

Orientador: Gerson Nakazato.

Dissertação (Mestrado Profissional em Clínicas Veterinárias) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Clínicas Veterinárias, 2017.

Inclui bibliografia.

1. Frango de corte - Tese. 2. Carne - Carcaça - Tese. 3. Salmonela - Tese. 4. *Escherichia coli* - Tese. I. Nakazato, Gerson. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Clínicas Veterinárias. III. Título.

MARCELA CRISTINA GONÇALVES CARVALHO CUNHA

**GENES DE RESISTÊNCIA E VIRULÊNCIA EM AMOSTRAS DE
ESCHERICHIA COLI ISOLADAS DE CARÇAÇAS DE FRANGO
CRIADO DE FORMA CAIPIRA**

Dissertação apresentada ao curso Pós-graduação - Mestrado Profissional em Clínicas Veterinárias da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dra. Renata Katsuko Takayama
Kobayashi
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Marcelo de Souza Zanutto
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 30 de março de 2017.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por eu ter chegado até aqui, por ter me concedido força, persistência e superação.

Aos animais.

A CAPES, pela existência dessa modalidade de Mestrado Profissional, permitindo o aperfeiçoamento pessoal e profissional.

Aos professores do mestrado profissional em clínicas veterinárias e aos colegas que me ajudaram partilhando experiências e conhecimentos, fundamentais para que este trabalho fosse realizado.

Ao coordenador do mestrado Prof. Dr. Marcelo Zanutto por sanar as nossas dúvidas e nos encaminhar para a realização deste.

Aos que tiveram todo o cuidado comigo durante o período de gestação que passei durante o mestrado.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Gerson Nakazato, pela paciência e perseverança para que esse trabalho fosse realizado juntamente com a professora Dra. Renata Kobayashi, por terem cedido o laboratório de microbiologia e repassarem seus conhecimentos.

À professora Ana Maria Bridi do Departamento de Zootecnia, coordenadora do projeto de extensão “Assistência técnica em produção e sanidade animal em assentamentos rurais”, por permitir a coleta das amostras.

Ao doutorando Luís Eduardo de Souza Gazal, pela paciência, educação e por ter abraçado comigo este trabalho, pelos conhecimentos transmitidos contribuindo para a minha formação, juntamente com os demais pós-graduandos do NIP 3, sempre solícitos e atenciosos.

À família do Assentamento Iraci Salete juntamente com alunos e professores envolvidos no projeto que me receberam para a realização da coleta das amostras.

Ao meu esposo Gilberto Junior pela paciência na minha ausência para realização deste mestrado, pelo incentivo e apoio, inclusive financeiro.

Aos meus filhos Miguel e Manuela, que na inocência de crianças, não compreenderam a minha ausência, cansaço e indisposição para atendê-los.

Aos meus pais, irmão, tias e avós que me auxiliaram com minhas crianças para que esse mestrado pudesse ser realizado.

Em especial à minha mãe Marcia que abraçou esse mestrado comigo.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

“O que prevemos raramente ocorre; o que menos esperamos geralmente acontece”.

(Benjamin Disraeli)

CUNHA, Marcela Cristina Gonçalves Carvalho. **Genes de resistência e virulência em amostras de *Escherichia coli* isoladas de carcaças de frango criado de forma caipira**. 2017. 19 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Clínicas Veterinárias) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

RESUMO

A produção de frango é uma das atividades que mais se destacam no agronegócio brasileiro. O uso de antimicrobianos em diversas fases do ciclo produtivo representa uma preocupação em relação à resistência bacteriana aos antimicrobianos, assim recomenda-se o monitoramento da resistência de determinadas bactérias como *Salmonella enterica* e *Escherichia coli*. Desse modo, o objetivo desse estudo foi detectar genes de virulência e resistência em isolados de *E. coli* e *S. enterica* de cinco carcaças de frango produzidas por uma granja localizada em um assentamento da região de Londrina-PR. O isolamento foi realizado com meios de cultura seletivos com tetraciclina, cefotaxima e ciprofloxacina, e a identificação foi feita pelo perfil bioquímico. Os genes de virulência de *E. coli* patogênica para aves (APEC), detecção genética do grupo Cefotaximase (CTX-M) e classificação filogenética foram realizadas pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Neste estudo foram isoladas 24 colônias de *E. coli* resistentes a um dos antimicrobianos testados e nenhuma de *S. enterica*. Dentre estes isolados, cinco produziram a enzima beta-lactamase de espectro estendido (ESBL), sendo três do grupo CTX-M (dois para CTX-M1 e um para CTX-M2). Uma das amostras produtoras de ESBL apresentou resistência a nove antimicrobianos. O perfil dos genes de virulência e os grupos filogenéticos demonstraram a alta diversidade dessas cepas multirresistentes. A técnica molecular (PCR) se mostrou eficiente na caracterização de *E. coli* multirresistentes, produtora de ESBL, com informações importantes para a epidemiologia de APEC.

Palavras-chave: ESBL. CTX-M. Grupo Filogenético. PCR.

CUNHA, Marcela Cristina Gonçalves Carvalho. **Resistance and virulence genes in *Escherichia coli* samples isolated from chicken carcasses.** 2017. 19 p. Dissertation (Professional Master's degree in Veterinary Clinics) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

ABSTRACT

The production of chicken is one of the activities that stand out most in the Brazilian agribusiness. The use of antimicrobials in several stages of production represents a concern with regard to bacterial resistance to antimicrobials, and is recommended monitoring of the resistance certain bacteria such as *Salmonella enterica* and *Escherichia coli*. The aim of this study was to investigate the antimicrobial resistance and resistance and virulence genes from *E. coli* and *S. enterica* isolated of chickens carcasses produced in the settlement, located in the region of Londrina, Brazil. Bacterial isolation was performed by means of selective culture medium added antimicrobials (tetracycline, cefotaxime and ciprofloxacin), and identification by the biochemical series. The virulence genes of avian pathogenic *E. coli* (APEC), CTX-M group and Clermont phylogenetic classification were performed by Polymerase Chain Reaction technique (PCR). In this study, 24 colonies of *E. coli* were resistant to one of the antimicrobials tested and none of *S. enterica* was isolated. Among these isolates, five were phenotypically Extended Spectrum Beta-Lactamase enzyme (ESBL) producer. Three ESBL producer strains showed CTX-M group genes (two for CTX-M1 and one for CTX-M2). One ESBL producer strain isolate exhibited resistance to nine antimicrobials. The profiles of virulence genes and phylogenetic groups demonstrated the high diversity of these multiresistant strains. The molecular technique (PCR) was efficient in the detection of *E. coli* producing ESBL multiresistant, as important information for the epidemiology of APEC.

Key words: ESBL. CTX-M. Phylogenetic Group. PCR.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sequências de oligonucleotídeos e tamanhos dos fragmentos amplificados (pb) dos genes de virulência de APEC (Johnson et al., 2008).....	7
Tabela 2 – Sequências de oligonucleotídeos e tamanhos dos fragmentos amplificados (pb) dos genes de resistência do grupo CTX-M (Woodfort et al., 2006).....	8
Tabela 3 – Contagem de coliformes totais através da técnica de <i>pour plate</i>	9
Tabela 4 – Características fenotípicas e genotípicas das cepas de <i>E. coli</i> isoladas das carcaças de frango	10

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	4
2	MATERIAL E MÉTODOS	5
2.1	Amostragem	5
2.2	Isolamento de <i>E. coli</i> multirresistentes	5
2.3	Pesquisa de <i>Salmonella</i> sp	5
2.4	Contagem de coliformes	6
2.5	Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos	6
2.6	Fatores de virulência, genes de resistência e grupo filogenético	7
2.7	Análise estatística	8
3	RESULTADOS	8
3.1	Isolamento e contagem de coliformes totais	8
3.2	Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos e produção de ESBL	9
3.3	Perfil de virulência, grupos CTX-M e grupo filogenético	9
4	DISCUSSÃO	11
5	CONCLUSÃO	14
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	15

Genes de resistência e virulência em amostras de *Escherichia coli* isoladas de carcaças de frango criado de forma caipira

**Marcela Cristina Gonçalves Carvalho^{1,2}, Luís Eduardo de Souza Gazal¹,
Vanessa Lumi Koga¹, Marcelly Chue Gonçalves¹, Renata Katsuko Takayama
Kobayashi¹, Gerson Nakazato^{1,2*}**

**1- Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas,
Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil.**

**2- Programa de Pós-Graduação em Mestrado Profissional em Clínicas
Veterinárias, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de
Londrina, Londrina, Paraná, Brasil.**

***Autor correspondente:** Gerson Nakazato, Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Campus Universitário, CEP 86055-990, Londrina, PR, Brasil, telefone: +55(43) 3371-4396, fax: +55 (43) 3371-4788, CP 6001, e-mail: gnakazato@uel.br.

RESUMO

A produção de frango é uma das atividades que mais se destacam no agronegócio brasileiro. O uso de antimicrobianos em diversas fases do ciclo produtivo representa uma preocupação em relação à resistência bacteriana aos antimicrobianos, assim recomenda-se o monitoramento da resistência de determinadas bactérias como *Salmonella enterica* e *Escherichia coli*. Desse modo, o objetivo desse estudo foi detectar genes de virulência e resistência em isolados de *E. coli* e *S. enterica* de cinco carcaças de frango produzidas por uma granja localizada em um assentamento da região de Londrina-PR. O isolamento foi realizado com meios de cultura seletivos com tetraciclina, cefotaxima e ciprofloxacina, e a identificação foi feita pelo perfil bioquímico. Os genes de virulência de *E. coli* patogênica para aves (APEC), detecção genética do grupo Cefotaximase (CTX-M) e classificação filogenética foram realizadas pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Neste estudo foram isoladas 24 colônias de *E. coli* resistentes a um dos antimicrobianos testados e nenhuma de *S. enterica*. Dentre estes isolados, cinco produziram a enzima beta-lactamase de espectro estendido (ESBL), sendo três do grupo CTX-M (dois para CTX-M1 e um para CTX-M2). Uma das amostras produtoras de ESBL apresentou resistência a nove antimicrobianos. O perfil dos genes de virulência e os grupos filogenéticos demonstraram a alta diversidade dessas cepas multirresistentes. A técnica molecular (PCR) se mostrou eficiente na caracterização de *E. coli* multirresistentes, produtora de ESBL, com informações importantes para a epidemiologia de APEC.

Palavras chaves: ESBL, CTX-M, Grupo Filogenético, PCR.

ABSTRACT

The production of chicken is one of the activities that stand out most in the Brazilian agribusiness. The use of antimicrobials in several stages of production represents a concern with regard to bacterial resistance to antimicrobials, and is recommended monitoring of the resistance certain bacteria such as *Salmonella enterica* and *Escherichia coli*. The aim of this study was to investigate the antimicrobial resistance and resistance and virulence genes from *E. coli* and *S. enterica* isolated of chickens carcasses produced in the settlement, located in the region of Londrina, Brazil. Bacterial isolation was performed by means of selective culture medium added antimicrobials (tetracycline, cefotaxime and ciprofloxacin), and identification by the biochemical series. The virulence genes of avian pathogenic *E. coli* (APEC), CTX-M group and Clermont phylogenetic classification were performed by Polymerase Chain Reaction technique (PCR). In this study, 24 colonies of *E. coli* were resistant to one of the antimicrobials tested and none of *S. enterica* was isolated. Among these isolates, five were phenotypically Extended Spectrum Beta-Lactamase enzyme (ESBL) producer. Three ESBL producer strains showed CTX-M group genes (two for CTX-M1 and one for CTX-M2). One ESBL producer strain isolate exhibited resistance to nine antimicrobials. The profiles of virulence genes and phylogenetic groups demonstrated the high diversity of these multiresistant strains. The molecular technique (PCR) was efficient in the detection of *E. coli* producing ESBL multiresistant, as important information for the epidemiology of APEC.

Keywords: ESBL, CTX-M, Phylogenetic Group, PCR.

1. INTRODUÇÃO

A produção animal é uma das atividades que mais se destacam no agronegócio brasileiro (Regitano e Leal, 2010). O Brasil é atualmente o segundo maior produtor de carne de frango e o maior exportador do mundo (UBABEF, 2016).

Nos animais de produção, em diversas fases do ciclo produtivo, são utilizados antimicrobianos com fins terapêuticos, profiláticos e como promotores de crescimento (ABEF, 2006). Em contrapartida, a saúde pública preocupa-se pelo fato desse uso acarretar perigos à saúde do homem, como toxicidade, alergia e principalmente pela seleção de cepas resistentes aos antimicrobianos (McMullin, 2004). Esta pode ser transferida por mecanismos diversos, tanto entre microrganismos de uma mesma população, como de populações diferentes. Essa transferência pode ser de uma microbiota animal para humana e vice-versa (Nijsten et al., 1993).

Escherichia coli é uma bactéria anaeróbia facultativa que habita o trato intestinal de homens e outros animais (Bonten et al., 1990). Essa bactéria está presente na microbiota de aves saudáveis, devendo se diferenciar amostras patogênicas das não patogênicas (Bettelheim, 1997; Nakazato et al., 2009). Cepas de *E. coli* patogênicas aviária são denominadas APEC (DHO-MOULIN, M. & FAIRBROTHER, J. M., 1999). Essas são responsáveis por doenças extraintestinais, conhecidas como colibacilose. (Barnes et al., 2003; Gross, 1994; Gyles, 1993). A colibacilose é uma das doenças mais importantes na avicultura industrial, causando prejuízos econômicos com quadros clínicos de pneumonia, aerossaculite, pericardite, onfalite, salpingite, septicemia entre outros (Ferreira e Knöbl, 2000).

O presente estudo objetiva detectar *E. coli* multirresistente na avicultura não industrial por meio de um método de detecção molecular, identificando genes de virulência e resistência destes isolados, que podem contribuir para futuros estudos epidemiológicos de colibacilose aviária.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostragem

As amostras bacterianas foram isoladas de cinco carcaças de frangos produzidas no assentamento rural localizado na região Norte do Paraná, Brasil, no período de novembro de 2016. O sistema de produção é considerado semi-caipira, pois as aves são adquiridas de um sistema industrial convencional com aproximadamente 10 dias de vida e posteriormente são manejadas na propriedade onde o sistema de criação é caipira. O produto final é comercializado em feiras de produtores. Para fins de processamento das técnicas microbiológicas e moleculares, foi realizado a rinsagem das carcaças, utilizando água peptonada tamponada (volume de 10% do peso de cada carcaça). O caldo obtido da rinsagem foi utilizado para procedimentos de isolamento e identificação de *E. coli* e *Salmonella* sp.

2.2 Isolamento de *E. coli* multirresistente

Um volume de 100 µl de cada rinsagem foi semeado, utilizando alça de Drigalsky, em três placas de ágar MacConkey (Difco, USA) suplementadas com antimicrobianos. Em cada uma das placas foi adicionado uma classe de antimicrobiano diferente. Os antimicrobianos utilizados foram Tetraciclina (30 µg/ml), Cefotaxima (40 µg/ml), e Ciprofloxacina (30 µg/ml). As placas semeadas foram incubadas a 37°C por 24 horas. Após crescimento, cinco colônias típicas de *E. coli* foram coletadas de cada placa com crescimento e então reisoladas para posterior identificação bioquímica utilizando os meios EPM, MILi e Citrato de Simmons (Toledo et al., 1982a, 1982b; Ewing, 1986).

2.3 Pesquisa de *Salmonella* sp.

A pesquisa para *Salmonella* sp. foi realizada a partir do caldo da rinsagem dos frangos. As amostras foram inicialmente enriquecidas, onde foram transferidos 100 µl para 10 ml do caldo Rappaport (RP) (Difco, USA) e 1 ml para para 10 ml do caldo Tetratonato (TT) (Difco, USA), e incubadas a 37°C e 42°C por 24 horas. Após

o enriquecimento, uma alçada de cada tubo (RP e TT) foi semeada nos seguintes meios: Ágar *Salmonella-Shigella* (SS) (Difco, USA), Ágar Desoxicolato-Lisina-Xilose (XLD) (Difco, USA), Ágar Verde Brilhante (AVB) (Difco, USA) e Ágar Hektoen (HE) (Difco, USA). As placas foram incubadas a 37° por 24 horas. As colônias suspeitas foram identificadas através do perfil bioquímico utilizando os meios EPM, MILi e Citrato de Simmons (Toledo et al., 1982a, 1982b; Ewing, 1986).

2.4 Contagem de coliformes totais

A avaliação de coliformes totais foi realizada através de diluição seriada (10^{-1} a 10^{-7}) do conteúdo das rinsagens de cada uma das carcaças e plaqueamento pela técnica de *pour plate* em Ágar Violeta Vermelho Neutro Bile (VRB) (Difco, USA) suplementado com lactose. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. Após crescimento foi realizado a contagem das colônias. O número de UFC foi estipulado da contagem das placas que continham entre 15 e 150 colônias.

2.5 Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos

As cepas de *E. coli* obtidas das placas de ágar MacConkey (Difco, USA) suplementadas com antimicrobianos foram submetidas ao teste de susceptibilidade aos antimicrobianos por meio da técnica de disco difusão, de acordo com os padrões estipulados pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2015). Os antimicrobianos utilizados foram: Amoxicilina com Ácido Clavulânico (30 µg), Cefepime (30 µg), Cefotaxima (30 µg), Ceftazidima (30 µg), Aztreonam (30 µg), Ácido Nalidíxico (30 µg), Sulfazotrim (25 µg), Ciprofloxacina (5 µg), Gentamicina (10 µg), Tetraciclina (30 µg), Enrofloxacina (5 µg), Nitrofurantoína (300 µg), Cefazolina (30 µg), Norfloxacina (10 µg), Cloranfenicol (30 µg). Todos os antimicrobianos utilizados foram da marca Oxoid (USA). Como controle de qualidade do teste foi utilizado a cepa de *E. coli* ATCC 25922.

Além do teste de disco difusão, as cepas foram submetidas ao teste para a detecção de ESBL, através dos métodos de duplo disco difusão e de disco combinado, seguindo as recomendações do CLSI (CLSI, 2015).

2.6 Fatores de virulência, genes de resistência e grupo filogenético

A pesquisa de genes de resistência e virulência, e grupo filogenético dos isolados foram realizados pelo método de PCR. O DNA dos isolados foi preparado utilizando o método de lise por fervura e armazenado a - 20°C até seu uso nos ensaios de PCR.

Para a pesquisa dos genes de virulência, *iroN*, *iutA*, *hlyF*, *ompT* e *iss* (Tabela 1), foi realizado um *multiplex-PCR* (*pentaplex*) como preditor mínimo de cepas de APEC, segundo Johnson e colaboradores (2008).

Tabela 1. Sequências de oligonucleotídeos e tamanhos dos fragmentos amplificados (pb) dos genes de virulência de APEC (Johnson et al., 2008).

Gene	Fator de virulência	Sequência de oligonucleotídeos (5'→3')	Tamanho do fragmento (pb)
<i>iroN</i>	Salmoquelina receptor	AATCCGGCAAAGAGACGAACCGCCT GTTCCGGGCAACCCCTGCTTTGACTTT	553
<i>iutA</i>	Aerobactina receptor	GGCTGGACATCATGGGAACTGG CGTCGGGAACGGGTAGAATCG	302
<i>ompT</i>	Proteína de membrana externa	TCATCCCGGAAGCCTCCCTCACTACTAT TAGCGTTTGCTGCACTGGCTTCTGATAC	496
<i>iss</i>	Resistência sérica	CAGCAACCCGAACCACTTGATG AGCATTGCCAGAGCGGCAGAA	323
<i>hlyF</i>	Hemolisina	GGCCACAGTCGTTTAGGGTGCTTACC GGCGGTTTAGGCATTCCGATACTCAG	450

Os isolados foram classificados filogeneticamente utilizando o método descrito por Clermont e colaboradores (2013). Este método se baseia na busca de três genes (*chuA*, *yjaA* e *arpA*) e um fragmento de DNA (*TspE4.C2*) no qual os classifica em um dos sete grupos (A, B1, B2, C, D, E e F).

Os isolados confirmados para a produção de ESBL nos testes fenotípicos de duplo disco difusão e disco combinado foram submetidos a PCR para a pesquisa dos grupos CTX-M (Tabela 2). O método consiste em um *multiplex-PCR* (*pentaplex*) descrito por Woodfort e colaboradores (2006).

Tabela 2. Sequências de oligonucleotídeos e tamanhos dos fragmentos amplificados (pb) dos genes de resistência do grupo CTX-M (Woodfort et al., 2006).

Gene	Sequência de Oligonucleotídeos (5'→3')	Tamanho do fragmento (bp)
CTX-M1	5' AAA AAT CAC TGC GCC AGT TC 5' AGC TTA TTC ATC GCC ACG TT	415
CTX-M2	5' CGACGCTACCCCTGCTATT 5' CCAGCGTCAGAT TTT TCA GG	552
CTX-M9	5' CAA AGA GAG TGC AAC GGA TG 5' ATT GGA AAG CGT TCA TCA CC	205
CTX-M8	5' TCG CGT TAA GCG GAT GAT GC 5' AAC CCA CGA TGT GGG TAG C	666
CTX-M25	5' GCA CGA TGA CAT TCG GG 5' AAC CCA CGA TGT GGG TAG C	327

2.7 Análise estatística

Para esse estudo realizou-se análise estatística descritiva, calculando-se as frequências absolutas e relativas (Sampaio, 1998).

3. RESULTADOS

3.1 Isolamento e contagem de coliformes totais

Nas amostras semeadas em ágar MacConkey suplementadas com antimicrobianos, foram isoladas 24 cepas de *E. coli*. Desses isolados, 22 cepas foram isoladas de ágar MacConkey com Tetraciclina, representando 91,66%, enquanto que apenas duas cepas (M-14 e M-15) foram isoladas de ágar MacConkey com Cefotaxima, representando 8,33%. Não houve crescimento bacteriano nas placas de ágar MacConkey com Ciprofloxacina. Nenhuma cepa de *Salmonella* sp. foi isolada das carcaças.

Quanto aos resultados de contagem de coliformes totais, o número de unidades formadoras de colônias (UFC) estava acima dos limites permitidos pela

ANVISA (10^4 UFC/g) (ANVISA, 2001) em todas as carcaças processadas, conforme descrito na tabela 3.

Tabela 3. Contagem de coliformes totais através da técnica de *pour plate*.

Carcaça	Contagem de Coliformes Totais (UFC/g)
1	$3,1 \times 10^5$
2	$1,25 \times 10^6$
3	$1,36 \times 10^5$
4	$1,9 \times 10^5$
5	$1,44 \times 10^6$

3.2 Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos e produção de ESBL

Todas as amostras de *E. coli* foram resistentes a pelo menos um antimicrobiano. Quatorze cepas foram resistentes a dois antimicrobianos (58,33%) e 11 foram resistentes a três (45,83%). A cepa de *E. coli* M-16 foi resistente a nove dos 15 antimicrobianos testados. Nove cepas (37,50%) foram resistentes a três classes de antimicrobianos diferentes sendo classificadas como multirresistentes. Cinco cepas (20,80%) apresentaram distorção de halo no teste de duplo disco difusão. Todas as cinco foram confirmadas como produtoras de ESBL pelo teste de disco combinado (Tabela 4).

3.3 Perfil de virulência, grupos CTX-M e grupo filogenético

Do total de 24 cepas, oito (30,00%) apresentaram ao menos um fator de virulência. As cepas M-6 e M-20 foram positivas apenas para o gene *hlyF*. Entretanto, as cepas M-2, M-3 e M-4 apresentaram quatro genes (*iroN*, *ompT*, *hlyF* e *iutA*) dos cinco genes do *pentaplex* para APEC (Tabela 4).

Três (12,50%) das cinco cepas que foram positivas para a produção de ESBL são do grupo CTX-M, sendo as cepas M-14 e M-15 do grupo CTX-M1 e a cepa M-23 do grupo CTX-M2 (Tabela 4).

Pela classificação filogenética constatamos diferentes grupos. A maioria das cepas foi classificada nos grupos: E/Clado I (29,10%) e A (25,00%). Cinco cepas estão classificadas entre o grupo A ou C. Três cepas pertencem ao grupo B1 (12,50%) e três cepas (12,50%) não estão classificadas em nenhum grupo descrito por Clermont. Entre essas três cepas sem classificação duas (M-14 e M-15) apresentam fatores de virulência e são produtoras de ESBL (Tabela 4).

Tabela 4. Características fenotípicas e genotípicas das cepas de *E. coli* isoladas das carcaças de frango.

Isolado bacteriano	Ave	Perfil de sensibilidade	Produção de ESBL	CTX-M	Genes de virulência	Grupo filogenético
M-1	1	TET	-	-	-	E ou Clado I
M-2	1	TET	-	-	<i>hlyF, iutA, iroN, ompT</i>	B1
M-3	1	TET	-	-	<i>hlyF, iutA, iroN, ompT</i>	B1
M-4	1	TET	-	-	<i>hlyF, iutA, iroN, ompT</i>	B1
M-5	1	TET	-	-	-	E ou Clado I
M-6	2	TET	-	-	<i>hlyF</i>	E ou Clado I
M-7	2	TET	-	-	-	E ou Clado I
M-8	2	SUT – TET	-	-	-	A ou C
M-9	2	TET	-	-	-	E ou Clado I
M-10	2	TET	-	-	-	E ou Clado I
M-11	3	TET – ENR	-	-	-	A
M-12	3	SUT – TET	-	-	-	A
M-13	3	TET	-	-	<i>iroN, ompT, hlyF</i>	Desconhecido
M-14	3	CFP - CTX - CAZ - ATM - SUT - CFZ	Sim	CTX-M1	<i>ompT, hlyF</i>	Desconhecido
M-15	3	CFP - CTX - CAZ - ATM - CFZ	Sim	CTX-M1	<i>ompT, hlyF</i>	Desconhecido
M-16*	4	CTX - ATM - NAL - SUT - GEN - TET - ENR - NIT - CFZ	Sim	-	-	A ou C
M-17*	4	NAL - SUT - TET - ENR	-	-	-	A ou C
M-18*	4	CFP - CTX - ATM - NAL - SUT - GEN - TET - CFZ	Sim	-	-	E ou Clado I
M-19*	4	NAL - SUT - TET - ENR	-	-	-	A ou C
M-20*	5	NAL - GEN - TET	-	-	<i>hlyF</i>	A ou C
M-21*	5	NAL - GEN - TET	-	-	-	A
M-22*	5	NAL - GEN - TET	-	-	-	A
M-23*	5	CAZ - ATM - NAL - SUT - GEN - TET	Sim	CTX-M2	-	A
M-24*	5	NAL - GEN - TET	-	-	-	A

(-): Negativo.

ATM: Aztreonam; CAZ: Ceftazidima; CFP: Cefepime; CFZ: Cefazolina; CTX: Cefotaxima; ENR: Enrofloxacin; GEN: Gentamicina; NAL: Ácido Nalidíxico; NIT: Nitrofurantoina; SUT: Sulfazotrim; TET: Tetraciclina.

hlyF - Putative avian hemolysin; *iutA* - Aerobactin siderophore receptor gene; *iroN* - Salmochelin siderophore receptor gene; *ompT* - Episomal outer membrane protease gene; *iss* - Episomal increased serum survival gene.

* Cepa multirresistente.

4. DISCUSSÃO

O uso de antimicrobianos no setor aviário tem sido uma prática comum, tanto no tratamento, profilaxia e como promotores de crescimento. Porém, a falta de controle na aplicação desses compostos pode favorecer o aumento do número de microrganismos multirresistentes aos antimicrobianos, e até representar um risco para a saúde pública.

Nosso grupo de pesquisa tem encontrado cepas de *E. coli* produtoras de ESBL em diferentes granjas aviárias da região Sul do Brasil (Koga et al., 2015a e 2015b). Nesse estudo, apesar do baixo número de amostras estudadas, cinco isolados (20,80%) apresentaram distorção no teste de disco combinado, característica fenotípica de amostras produtoras de ESBL. Das cinco amostras, três apresentaram ESBL do grupo CTX-M, sendo duas cepas CTX-M1 e uma CTX-M2. Os grupos CTX-M1 e CTX-M2 têm sido frequentemente isolados em amostras de carcaça de frango criados de forma convencional no Brasil (Ferreira et al. 2016; Koga et al., 2015b). O grupo CTX-M2 tem sido também encontrado em amostras de *E. coli* isoladas de perus comercializados (Da Silva et al., 2017) e de amostras clínicas de *Salmonella* sp. (Fernandes et. al., 2016). Em alguns lugares do mundo, o grupo CTX-M1 é o prevalente em amostras clínicas hospitalares (Robin et al., 2017; Sangare et al., 2017).

Dentre as amostras isoladas, nove (37,50%) apresentaram resistência a três ou mais classes de antimicrobianos, sendo caracterizados como multirresistentes. Esse número de cepas multirresistentes é bastante relevante, e corrobora com o crescente aumento de cepas de *E. coli* produtoras de ESBL no Brasil (Koga et al., 2015a e 2015b), assim como outros países. Na Romênia a porcentagem de bactérias multirresistentes foi de 23,00%, já na Argélia foi acima de 80,00% (Laarem et al., 2017; Dan et al., 2015).

Além disso, observamos que estas cinco cepas produtoras de ESBL apresentaram diferentes perfis de sensibilidade aos antimicrobianos, sendo a cepa M-16 resistente a nove antimicrobianos, sugerindo uma diversidade genética entre as cepas. Vale ressaltar que 22 (91,60%) isolados são resistentes a tetraciclina, e apenas dois isolados não apresentaram essa resistência, porém com produção de ESBL. Esse resultado sugere o uso da tetraciclina de forma direta ou indireta na avicultura da região.

Utilizando a técnica de PCR, verificamos que o perfil dos genes de virulência de APEC (*pentaplex* de Johnson) e a classificação filogenética de Clermont, também demonstraram essa diversidade nessas cepas, assim como em outros isolados de *E. coli* não produtores de ESBL, sugerindo o uso da técnica para tal finalidade.

A pesquisa dos genes de virulência de APEC mostrou que a maioria das cepas estudadas (87,50%) não apresentavam características genéticas de amostras patogênicas aviárias, uma vez que amostras de APEC têm sido caracterizadas pela presença de três ou mais genes de virulência (Solás-Ginès et al., 2015; de Oliveira et al., 2015; Johnson et al., 2008), demonstrando a necessidade de multifatores de virulência para a patogênese bem sucedida. Porém três amostras apresentaram quatro genes dos cinco analisados, estas cepas, apesar de não terem sido isoladas

de aves com lesões típicas de APEC, podem atuar como reservatório destes genes, apresentando inclusive, risco zoonótico, uma vez que estes genes são plasmidiais, e também têm sido encontrados em amostras de *E. coli* causando meningites e infecções do trato urinário em humanos (Cyoia et al., 2015; Lemaitre et al., 2013).

A presença de genes de resistência e virulência (incluindo plasmidiais) desperta uma grande preocupação, pois esses genes poderiam ser transferidos para outras bactérias da mesma espécie e até gêneros diferentes, incluindo as cepas humanas. Não esperávamos encontrar amostras multirresistentes, muito menos produtoras de ESBL em isolados de frangos criados de maneira semi-caipira, pois Koga e colaboradores (2015b) encontraram baixos índices de resistência aos antimicrobianos e nenhuma ESBL em amostras coletadas de frangos caipiras. Estes dados indicam que o uso de antimicrobianos ou o contato com animais tratados com antimicrobianos, ainda que no início da produção seja suficiente para seleção e colonização das cepas multirresistentes.

O teste fenotípico (antibiograma) determina o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos e identifica cepas multirresistentes, porém para algumas informações como a diversidade, variantes de cepas e fatores de virulência, fazem-se necessário os testes genotípicos, como a PCR (método rápido e eficaz), nos quais a presença de determinados genes são importantes para a epidemiologia da *E. coli* em aves. Neste estudo, a metodologia empregada forneceu resultados interessantes nos aspectos de resistência bacteriana aos antimicrobianos.

5. CONCLUSÃO

O uso de placas com meios de cultura suplementados com antimicrobianos e a técnica molecular (PCR) se mostraram eficientes no isolamento de *E. coli* multirresistentes (produtora de ESBL). E a presença de dois tipos de genes CTX-M, diferentes fatores de virulência e diferentes classes filogenéticas demonstram a diversidade de cepas multirresistentes de *E. coli* na granja aviária semi-caipira.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agência Nacional de Vigilância Sanitária ANVISA. RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. publicado: D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 10 de janeiro de 2001.
- Associação Brasileira de Produtores e Exportadores de Frangos (ABEF), 2006. Disponível em www.abef.com.br, acesso em: 11 de agosto de 2007.
- Barnes, H. J., Vaillancourt, J. P., Gross, W. B., 2003. Colibacillosis, in: **Diseases of poultry**, 12, 691-732.
- Bauer, A. W., Kirby, W. M., Sherris, J. C., Turck, M., 1966. Antibiotics susceptibility testing by a standardized single disk method. **Am. J. Clin. Pathol.** 45, 493-496.
- Bettelheim, K. A., 1997. *Escherichia coli* in the normal flora of humans and animals. In: Sussman, M. *Escherichia coli* mechanisms of virulence, **Cambridge University:Cambridge**, 85–109.
- Bonten, M., Stobberingh, E., Houben, A., 1990. High prevalence of antibiotic resistant *Escherichia coli* in faecal samples of students in the south-east of the Netherland. **J. Antimicrob. Chemother.**, 26, 585-592.
- 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. Microb. Reports**, 5(1), 58-65.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2015. Performance Standards for antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-fifth Informational Supplement. Approved Standard, **CLSI Document M1000-S25**, Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), Wayne, Pa, USA.

- Cyoia P. S., Rodrigues G. R., Nishio E. K., Medeiros L. P., Koga V. L., Pereira A. P. D., Vespero E. C., Houle S., Dozois C. M., Nakazato G., Kobayashi R. K. T., 2015. Presence of virulence genes and pathogenicity islands in extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolates from Brazil. **J. Infect. Dev Ctries.**, 9(10), 1068 – 1075.
- Da Silva, K. C., Cunha, M. P. V., Cerdeira, L., de Oliveira, M. G. X., de Oliveira, M. C. V., Gomes, C. R., Lincopan, N., Knöbl, T., Moreno, A. M., 2017. High-virulence CMY-2-and CTX-M-2-producing avian pathogenic *Escherichia coli* strains isolated from commercial turkeys. **Diagnost. Microb. and Infect. Dis.**, 87(1), 64-67.
- Dan, S. D., Tabaran, A., Mihaiu, L., & Mihaiu, M., 2015. Antibiotic susceptibility and prevalence of foodborne pathogens in poultry meat in Romania. **J. Infect. Develop. Countr.**, 9(1), 035-041.
- De Oliveira, A. L., Rocha, D. A., Finkler, F., de Moraes, L. B., Barbieri, N. L., Pavanelo, Winkler, C., Grassotti, T. T., de Brito, K. C., de Brito, B. G., Horn, F., 2015. Prevalence of ColV plasmid-linked genes and in vivo pathogenicity of avian strains of *Escherichia coli*. **Food. Pathog. Dis.**, 12(8), 679-685.
- DHO-MOULIN, M. & FAIRBROTHER, J. M. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Veterinary Research*, vol.30: pag. 299-316, 1999.
- Ewing, W. H., 1986. *Edwards and Ewing's Identification of Enterobacteriaceae*. **Elsevier Science Publishing Company**, New York.
- Fernandes, S. A., Camargo, C. H., Francisco, G. R., Bueno, M. F. C., Garcia, D. O., Doi, Y., Tiba Casas, M. R., 2016. Prevalence of Extended-Spectrum β -Lactamases CTX-M-8 and CTX-M-2-Producing *Salmonella* Serotypes from Clinical and Nonhuman Isolates in Brazil. **Microb. Drug Resist.** doi: 10.1089/mdr.2016.0085.

- Ferreira, A. J. P., Knöbl, T., 2000. Colibacilose Aviária, in: Berchieri Junior, A., Macari, M. **Doenças das aves**. Campinas: Facta, 197-207.
- Ferreira, J. C., Penha Filho, R. A. C., Andrade, L. N., Junior, A. B., Darini, A. L. C., 2016. Evaluation and characterization of plasmids carrying CTX-M genes in a non-clonal population of multidrug-resistant Enterobacteriaceae isolated from poultry in Brazil. **Diagnost. Microb. Infect. Dis.**, 85(4), 444-448.
- Gross W. G., 1994. Diseases due to *Escherichia coli* in poultry, in: **Escherichia coli in Domestic Animals and Humans**, 237–259, Wallingford, UK.
- Gyles, C. L., 1993. *Escherichia coli*, in: **Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals**, 164–187.
- Johnson, T. J., Wannemuehler, Y., Doetkott, C., Johnson, S. J., Rosenberger S.C., Nolan, I. K., 2008. Identification of minimal predictors of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) virulence for use as a rapid diagnostic tool. **J. Clin. Microbiol.**, 46(12), 3987-3996.
- 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., 2015. Evaluation of the antibiotic resistance and virulence of *Escherichia coli* strains isolated from chicken carcasses in 2007 and 2013 from Paraná, Brazil. **Food. Pathog. Dis.**, 12(6), 479-485.
- Koga, V. L., Scandorieiro, S., Vespero, E. C., Oba, A., de Brito, B. G., de Brito, K. C., Nakazato, G., Kobayashi, R. K., 2015. Comparison of antibiotic resistance and virulence factors among *Escherichia coli* isolated from conventional and free-range poultry. **Biomed. Res. Intern.** 2015, 618752.
- 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. Develop. Countr.**, 11(02), 143-151.

- La Ragione, R. M., Woodward, M. J., 2002. Virulence factors of *Escherichia coli* serotypes associated with avian colisepticaemia. **Res. Vet. Sci**, 73, 27–35.
- 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(9), e74423.
- McMullin, P., 2004. Produção Avícola sem Antibióticos: Riscos Potenciais de Contaminação e Detecção de Resíduos. **Poult. Healt. Serv.**, 219- 226.
- Nakazato G., Campos T. A., Stehling E. G., Brocchi M., Silveira W. D., 2009. Virulence factors of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). **Pesq. Vet. Bras.** 29(7), 479-486.
- Nijsten, R., London, N., Van Den Bogaard, A., Stobberingh, E., 1993. Antibiotic resistance of Enterobacteriaceae isolated from the faecal flora of fattening pigs. **Vet. Quart.**, 15(4), 152-157.
- Regitano, J. B., Leal, R. M. P., 2010. Comportamento e impacto ambiental de antibióticos usados na produção animal brasileira. **Rev. Bras. Ciên. do Solo**, 34(3), 601-16.
- Robin, F., Beyrouthy, R., Bonacorsi, S., Aissa, N., Bret, L., Brieu, Cattoir, V., Chapuis, A., Chardon, H., Degand, N., Doucet-Populaire, F., Dubois, V., Fortineau, N., Grillon, A., Lanotte, P., Leyssene, D., Patry, I., Podglajen, I., Recule, C., Ros, A., Colomb-Cotinat, M., Ponties, V., Ploy, M. C., Bonnet, R., 2016. ESBL-producing Enterobacteriaceae in France: inventory assessed by a multicentric study. **Antimicrob. Agent. Chemother.**, doi: 10.1128/AAC.01911-16.
- Sampaio, I. B. M., 1998. **Estatística Aplicada a Experimentação Animal**, UFMG, Belo Horizonte. 221.

- Sangare, S. A., Rondinaud, E., Maataoui, N., Maiga, A. I., Guindo, I., Maiga, A., Camara, N., Dicko, O. A., Dao, S., Diallo, S., Bougoudogo, F., Andremont, A., Maiga, I. I., Armand-Lefevre, L., 2017. Very high prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in bacteriemic patients hospitalized in teaching hospitals in Bamako, Mali. **PloS One**, 12(2), e0172652.
- Solà-Ginés, M., Cameron-Veas, K., Badiola, I., Dolz, R., Majó, N., Dahbi, 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.
- Toledo, M. R. F., Fontes, C. F., Trabulsi, L. R., 1982a. EPM – a modification of Rugai and Araujo medium for simultaneous test of gas production from glucose, H₂S, urease and tryptophan deaminase. **Rev. Microbiol.** 13, 309–315.
- Toledo, M. R. F., Fontes, C. F., Trabulsi, L. R., 1982b. MILi – a medium for detection of motility, indole, and lysine decarboxylase. **Rev. Microbiol.** 13, 230–235.
- UBABEF, 2016. Produção Brasileira de Carne de Frango por Produto em 2015. **Relatório Anual.**
- Woodford, N., Fagan, E. J., Ellington, M. J., 2006. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding CTX-M extended-spectrum β -lactamases. **J. Antimicrob. Chemother.**, 57(1), 154-155.