

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**DETECÇÃO DE GENES DE VIRULÊNCIA E SUSCETIBILIDADE  
A ANTIMICROBIANOS DE *Escherichia coli* ISOLADAS DE  
OVOS DE PATA (*Cairina moschata*)**

Ana Maria de Souza Almeida  
Orientadora: Prof. Dra. Maria Auxiliadora Andrade

GOIÂNIA  
2014



**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

**1. Identificação do material bibliográfico:**       **Dissertação**       **Tese**

**2. Identificação da Tese ou Dissertação**

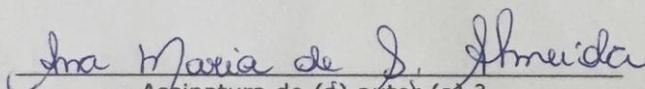
Nome completo do autor: **Ana Maria de Souza Almeida**

Título do trabalho: **DETECÇÃO DE GENES DE VIRULÊNCIA E SUSCETIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS DE *Escherichia coli* EM OVOS DE PATA (*Cairina moschata*)**

**3. Informações de acesso ao documento:**

Concorda com a liberação total do documento  SIM       NÃO<sup>1</sup>

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.

  
Assinatura do (ã) autor (a) <sup>2</sup>

Data: 11/ 10 / 2016

<sup>1</sup> Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

<sup>2</sup>A assinatura deve ser escaneada.

ANA MARIA DE SOUZA ALMEIDA

**DETECÇÃO DE GENES DE VIRULÊNCIA E SUSCETIBILIDADE  
A ANTIMICROBIANOS DE *Escherichia coli* ISOLADAS DE  
OVOS DE PATA (*Cairina moschata*)**

Dissertação apresentada para obtenção do  
grau de Mestre em Ciência Animal junto à  
Escola de Veterinária e Zootecnia da  
Universidade Federal de Goiás

**Área de Concentração:**

Sanidade Animal Higiene e Tecnologia de Alimentos

**Linha de Pesquisa:**

Etiopatogenia, epidemiologia, diagnóstico e controle das  
doenças infecciosas e parasitárias dos animais

**Orientador:**

Prof. Dra. Maria Auxiliadora Andrade – UFG

**Comitê de Orientação:**

Prof. Dr. Guido Fontgalland Coelho Linhares – UFG

Prof. Dra. Valéria de Sá Jayme – UFG

GOIÂNIA

2014

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

de Souza Almeida, Ana Maria

Detecção de genes de virulência e suscetibilidade a antimicrobianos de *Escherichia coli* isoladas de ovos de pata (*Cairina moschata*) [manuscrito] / Ana Maria de Souza Almeida. - 2014.

LV, 55 f.

Orientador: Profa. Dra. Maria Auxiliadora Andrade; co-orientadora Dra. Valéria de Sá Jayme; co-orientador Dr. Guido Fontgalland Coelho Linhares.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia (EVZ), Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Goiânia, 2014.

1. aves aquáticas. 2. resistência antimicrobiana. 3. saúde pública. 4. ovos. I. Andrade, Maria Auxiliadora, orient. II. Título.

CDU 639.09

1 ATA NÚMERO **404** DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DO  
2 PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL DA ESCOLA DE  
3 VETERINÁRIA E ZOOTECNIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS. Às  
4 **08h00min** do dia **07/08/2014**, reuniu-se na sala de defesas do Programa de Pós-  
5 Graduação em Ciência Animal a Comissão Julgadora infra nomeada para proceder ao  
6 julgamento da Defesa de Dissertação de Mestrado apresentado (a) pelo (a) Pós-  
7 Graduando (a) **ANA MARIA DE SOUZA ALMEIDA**, intitulada “**Detecção de genes**  
8 **de virulência e suscetibilidade a antimicrobianos de Escherichia coli em**  
9 **Anseriformes**”, apresentada para obtenção do **Título de Mestre em Ciência**  
10 **Animal**, junto à Área: **Sanidade, Higiene e Tecnologia de Alimentos** desta  
11 Universidade. O Presidente da Comissão Julgadora, **Profa. Dra. Maria Auxiliadora**  
12 **Andrade**, iniciando os trabalhos, concedeu, a palavra ao (a) candidato (a) **ANA**  
13 **MARIA DE SOUZA ALMEIDA** para exposição em **quarenta** minutos do seu trabalho.  
14 A seguir, o senhor Presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos  
15 Examinadores, os quais passaram a argüir o (a) candidato (a), durante o prazo  
16 máximo de **vinte** minutos, assegurando-se ao mesmo igual prazo para responder aos  
17 Senhores Examinadores. Ultimada a argüição, que se desenvolveu nos termos  
18 regimentais, a Comissão, em sessão secreta, expressou seu Julgamento,  
19 considerando o (a) candidato (a) **Aprovado (a) ou Reprovado (a)**:

## BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria Auxiliadora Andrade (Orientador)

Profa. Dra. Sílvia Minharro Barbosa - UFT

Prof. Dr. Marcos Barcellos Café

APROVADO(A)/REPROVADO(A)

*Aprovada*  
*Aprovada*  
*APROVADA*

17 Em face do resultado obtido, a Comissão Julgadora considerou o(a) candidato(a)  
18 **ANA MARIA DE SOUZA ALMEIDA**, *habilitada*. (**Habilitado (a)**  
19 **ou não Habilitado (a)**). Nada mais havendo a tratar, eu **Profa. Dra. Maria**  
20 **Auxiliadora Andrade** lavrei a presente ata que, após lida e achada conforme foi por  
21 todos assinada.

## BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria Auxiliadora Andrade

Profa. Dra. Sílvia Minharro Barbosa - UFT

Prof. Dr. Marcos Barcellos Café

## ASSINATURA

*Maria Auxiliadora Andrade*  
*Silvia Minharro Barbosa*  
*Marcos Barcellos Café*

A Banca Examinadora aprovou a seguinte alteração no título da dissertação:

*Detecção de genes de virulência e suscetibilidade*  
*de e antimicrobianos de Escherichia coli*  
*em ovos de pato (Coturnix coturnix)*

Em memória da minha avó Constancia, razão de todos  
os meus esforços.  
Dedico

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e Nossa Senhora por me guiarem durante todas as etapas da minha vida.

A minha família. Minha mãe, meu pai e meu avô pelo apoio, incentivo e por sempre se orgulharem de mim. Tudo que almejo é pensando em vocês.

Ao Artur, pela compreensão durante minha estadia em Goiânia, companheirismo e carinho. A sua família, por disponibilidade de ajuda em todos os momentos.

A minha querida orientadora, Maria Auxiliadora Andrade, por todos os ensinamentos, pela paciência e por todos os gestos de generosidade e carinho durante este período de convívio.

Aos meus co-orientadores, Guido Fontgalland Coelho Linhares e Valéria de Sá Jayme pela contribuição para realização desse trabalho.

As minhas amigas Samantha e Gisele, que foram meu braço direito e esquerdo neste trabalho. Sem vocês eu não conseguiria realizá-lo! Agradeço também todos que me ajudaram e me apoiaram; Adriana, Denizard, Bárbara, Cinthia, Jardel, Dunya, Franciele, Fernanda, Aline, Dorinha, Edileuza, Nazaré e Winder.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (PPGCA) da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás (EV/UFG) e a todos os professores que contribuíram com a minha formação.

Em especial, aos animais, seres tão iluminados e abençoados, e muitas vezes não compreendidos por nós.

## RESUMO

O pato é a espécie de aves aquáticas mais criada no Brasil, porém não existem estudos aprofundados a respeito do risco dos ovos de patas na cadeia alimentar. O objetivo deste trabalho foi delinear as principais características das criações integrando os fatores de risco associados a infecção de *Escherichia coli* em aves e humanos, investigar a presença dessa bactéria em 38 e 25 dúzias de ovos de patas procedentes de feiras livres e propriedades de subsistência no Distrito Federal e estado de Goiás, determinando seu perfil patogênico e perfil de resistência aos antimicrobianos. Cada dúzia de ovos correspondeu a três amostras: uma amostra de *pool* casca, uma de *pool* de albúmen e uma de *pool* gema, totalizando 567 amostras. Mediante as informações obtidas pelos questionários aplicados durante a visita nas propriedades de subsistência, observou-se que não existem programas de vacinação, nem fornecimento de ração balanceada para os patos, a criação geralmente é consorciada com galinhas e o contato entre os mesmos ocorria desde a incubação. Obteve-se, pela bacteriologia o isolamento e identificação de *E.coli* em 17,10% (97/567) de amostras de ovos de patas. Na PCR para detecção dos genes de virulência *papC*, *tsh* e *eae*, e de resistência o gene *iss*, das 97 amostras positivas para *E.coli*, 35 amostras possuíam genes de virulência, 31,8% (14/44) delas eram de propriedades de subsistência e 39,6% (21/53) de feiras livres. Em meio aos genes pesquisados nos isolados de *E.coli* foram positivos 15,46% (15/97) para *papC*, 21,65% para *tsh*, 17,52% para *iss*, 2,06% para *eae*. Conclui-se que existem cepas patogênicas tanto para aves quanto para humanos, circulantes em ovos de anseriformes. A investigação de resistência aos antimicrobianos aliada à pesquisa dos genes de virulência e de resistência em isolados de *E.coli* obtidos de ovos de patos é importante ferramenta para determinação de risco, tanto para sanidade avícola quanto para saúde pública, que essas aves podem exercer.

**Palavras-chave:** aves aquáticas, resistência antimicrobiana, saúde pública, ovos

## ABSTRACT

Duck is the most important species of waterfowl reared in Brazil, however, there are no studies about the risk of duck eggs in the food chain. The main objective of this study was to outline the main characteristics of waterfowl farms, integrating the risk factors associated with *E. coli* infection in birds and humans, verify the presence of *E.coli* in 38 and 25 dozen of duck eggs from markets and subsistence farms in Federal District and Goiás State, determining the pathogenic profile and the antimicrobial resistance profile. Each dozen eggs accounted for three samples: a sample *pool* of eggshell, *pool* of albumen and a *pool* of yolk, totaling samples. The information obtained by questionnaires applied during the visit to the farms revealed no vaccination program, or supply of balanced feed for ducks were employed. Duck were reared with chicken and the contact between the animals occurred since incubation. Through bacteriology, we isolated and identified *E.coli* in 17.10% (97/567) of samples of duck eggs. In PCR for the detection of the virulence genes *papC*, *tsh*, and *eae* and of the resistance gene *iss*, of 97 positives samples to *E. coli*, 35 samples were positive for virulence genes, 31.8% (14/44) came from farms and 39.6% (21/53) from markets. The search of genes in *E.coli* isolates revealed 15.4% positive to *papC*, (15/97) , 21.6% (21/97) positive to *tsh*, 17.5% (17/97) positive to *iss*, and 2% (2/97) positive to *eae* .It conclusion, there are pathogenic strains for both birds and humans, circulating in anseriformes eggs. The investigation of antimicrobial resistance combined with the research of virulence and resistance genes in *E. coli* isolates obtained from eggs of ducks is an important tool to determine the risk these birds may bring to both poultry health and of public health.

**Key-words:** waterfowl, antimicrobial resistance, public health, eggs.

## SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS .....	1
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA .....	2
2.1 Anseriformes .....	2
2.2 <i>Escherichia coli</i> .....	2
2.3 Resistência aos antimicrobianos .....	5
3.OBJETIVO GERAL .....	6
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	7
CAPÍTULO 2 - DETECÇÃO DE GENES DE VIRULÊNCIA E SUSCETIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> EM OVOS DE PATA ( <i>CAIRINAMOSCHATA</i> ) .....	10
1. INTRODUÇÃO .....	10
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	13
2.1 Local.....	13
2.2 Caracterização dos criatórios de patos .....	13
2.3 Colheita das amostras.....	13
2.4 Pesquisa de <i>Escherichia coli</i> .....	14
2.5 Suscetibilidade aos antimicrobianos .....	14
2.6 Técnica da pcr convencional .....	15
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	19
4. CONCLUSÕES .....	35
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	36
CAPÍTULO 3 - CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	46

## CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS

### 1. INTRODUÇÃO

Os criatórios industriais de aves aquáticas no Brasil são raros, pois para a população nacional, carne e ovos dessas espécies ainda são considerados iguaria restrita a determinadas classes sociais ou costumes regionais. Entretanto, as criações de subsistência são comuns no País e o comércio de aves vivas, ovos e carne ocorre principalmente entre os pequenos produtores, casas comerciais e feiras livres. Aspectos sanitários, exigências nutricionais e padrões fisiológicos de patos domésticos ainda são escassos, para tanto são necessárias diferentes linhas de pesquisa a fim de elucidar tais características.

Anseriformes são subestimados em relação ao risco de transmissão de cepas patogênicas de *Escherichia coli* (*E.coli*) para humanos e animais. Porém, já foi comprovado que este patógeno pode ser veiculado por alimentos e água (EWERS et al., 2009; MA et al., 2012).

As infecções por *E.coli* são comuns na medicina veterinária, podendo causar enfermidades em diferentes espécies além de quadros anatomopatológicos diversificados. Esta bactéria promove lesões tão distintas porque possui diferentes classificações perante seus sorogrupos e mecanismos de virulência.

Anteriormente, esta bactéria era considerada apenas comensal, porém ao longo dos anos estudos comprovaram que existem cepas patogênicas, como a O157:H7, associada a quadros severos de enterite hemorrágicas.

Como não existem muitos estudos a respeito dos possíveis patógenos que essas aves podem albergar e a maioria de seus produtos ainda não é inspecionada por órgãos oficiais, a necessidade de maiores pesquisas a este respeito se faz presente. Desta maneira, o objetivo desse estudo é analisar a frequência de *E.coli* isolada de ovos de patas e identificar seu perfil patogênico.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Anseriformes

Anseriforme é uma ordem composta por aproximadamente 151 espécies de aves aquáticas, destacam-se os patos (*Cairina moschata*), os gansos (*Anser anser*), os marrecos (*Anas platyrhynchos domesticus*) e os cisnes (*Cygnus olor*) (FIGUEROLA & GREEN, 2006). Santa Catarina é, atualmente, o maior polo industrial de produção e abate de patos, marrecos e gansos, constituindo 66,24% da produção brasileira, seguido por São Paulo com 28,28% e Minas Gerais com 2,29%. Em 2013, 99% da carne de patos, marrecos e demais aves relacionadas a esta ordem foram exportadas *in natura*, apenas 1% dos produtos era industrializado, e a maioria teve o Oriente Médio como destino. Nesse mesmo ano foram produzidas mais de 2,5 toneladas de carne de aves aquáticas, sendo 12,93% de patos e 0,97% de gansos (UBABEF, 2014). Demonstrado assim, a importância das aves aquáticas na avicultura brasileira.

Embora não existam tantos relatos de doenças de anseriformes, estes podem ser afetados por diferentes microrganismos, resultando em doenças inaparentes ou clínicas. Pesquisas são importantes, principalmente considerando-se os aspectos epidemiológicos, pois algumas enfermidades presentes em anseriformes apresentam alto risco de transmissão para galinhas, tornando-se uma das maiores preocupações atuais na saúde avícola.

O conhecimento dos médicos veterinários a respeito de doenças de anseriformes ainda é restrito. São necessários maiores estudos sobre este assunto, já que, produtos oriundos dessa ordem são comumente comercializados como, carne e ovos.

### 2.2 *Escherichia coli*

*Escherichia coli* é uma bactéria Gram negativa da família *Enterobacteriaceae*, não esporulada, anaeróbica facultativa, fermentativa, em sua maioria móveis (flagelo peretriqueos) e pertence a microbiota entérica de

mamíferos e aves. Crescem em temperaturas de 18 a 44°C sendo 37°C é a temperatura ideal (FERREIRA & KNÖBL, 2009).

Essa bactéria também é caracterizada por suas propriedades bioquímicas; positiva para reação para indol, lisina, motilidade e reação de vermelho metila; negativa para testes para urease e hidrogênio e utilização de citrato. Além disso, algumas cepas podem produzir H<sub>2</sub>S (OLIVEIRA et al., 2004; QUINN et al., 2005).

A produção de gás e ácido ocorre posteriormente à fermentação de manitol, glicose, sorbitol, ramanose, maltose, manose, xilose, arabiose e glicerol. A grande maioria das estirpes é capaz de fermentar lactose, embora algumas a fermentem tardiamente (ANDREATTI FILHO, 2007).

Em meios de nutrientes sólidos as unidades formadoras de colônias (UFC) apresentam cerca de 1 a 3mm de diâmetro tanto com aspecto rugoso quanto liso, no entanto podem existir colônias intermediárias e mucóides. Colônias rugosas têm aspecto grosseiro e contornos irregulares, já as colônias lisas são convexas, brilhantes e com bordos regulares (FERREIRA & KNÖBL, 2009).

Grande parte de *E.coli* são comensais, não apresentam qualquer gene de virulência (CHERNAKI-LEFFER et al., 2002). Contudo, alguns estudos descrevem que mesmo cepas de *E.coli* comensais podem conter um ou mais genes de virulência com potencial de causar doenças em animais imunossuprimidos (KARIYAWASAM et al., 2006).

Com base nos mecanismos de virulência específicos das cepas patogênicas, *E.coli* pode ser classificada em patotipos. São eles; enteropatogênica (EPEC), enterotoxigênica (ETEC), enteroinvasora (EIEC), enterohemorrágica (EHEC), enteroagregativa (EaggEC), uropatogênica (UPEC), de meningite neonatal (NMEC); enteropatogênica para coelhos (REDEC) e patogênica para aves (APEC) (FERREIRA & KNÖBL, 2009).

A cadeia de produção aviária é alvo de debate e preocupação atual, fundamentados na possível semelhança genética entre estirpes de APEC, NMEC e UPEC. Mesmo que essa hipótese necessite comprovação científica, esta pode tornar a colibacilose aviária uma nova barreira sanitária entre as nações (CUNHA et al., 2013).

APEC é considerado uma das principais causadores de morbidade e mortalidade de aves, além de contribuir com perdas econômicas na indústria avícola (KNÖBL et al., 2004). Pode determinar diversos quadros anatomopatológicos, com destaque para pericardites, hepatites, endocardites, doenças respiratórias (LYNNE et al., 2012) e doenças reprodutivas (ANDREATTI FILHO, 2007).

Com novas pesquisas a respeito dos inúmeros genes de virulência presentes na APEC, não se pode mais considera-lá como um patógeno simplesmente oportunista, uma vez que algumas cepas podem causar a doença em animais sadios. Como é o caso das estirpes relacionadas à síndrome da cabeça inchada, que são extremamente patogênicas e possuem características mais agressivas, incluindo elevada letalidade, presença de ampla combinação de genes de virulência e capacidade de se aderir aos diferentes tipos celulares (MATURANA et al., 2011).

Além da diferenciação de patogenicidade e agressividade MATURANA et al. (2011) distinguem as cepas de acordo com a doença causada por elas. Os autores citam a existência de pelo menos dois subgrupos dentro do patotipo APEC, classificados conforme seus fatores de virulência e as doenças desenvolvidas por elas. Um deles é composto, principalmente, por estirpes que determinam a síndrome da cabeça inchada e outro composto especialmente por estirpes que causam onfalite. Além disso, a diversidade existente entre estirpes que ocasionam variados quadros clínicos, está relacionada ao número de genes de virulência e suas características fenotípicas como aderência e letalidade. Estirpes que causam septicemia já foram identificadas em enfermidades distintas em aves, e a aparente diversidade de cepas que facilitam o acesso da bactéria a corrente sanguínea pode repletir na falta de identificação de um conjunto específico de genes de virulência.

A estrutura da APEC é composta de seguimentos antigênicos que permitem a diferenciação sorológica e identificação de antígenos somáticos O, flagelares H, fimbrial F e capsular K (FERREIRA & KNÖBL, 2009). O antígeno somático O corresponde ao lipopolissacarídeo (LPS), elemento termo-resistente que se projeta da membrana externa para o ambiente extracelular. O lipídeo A (endotoxina), componente do LPS, é liberado durante a multiplicação

ou após a morte da bactéria, atuando na ativação de macrófagos e de mediadores da inflamação (FERREIRA & KNÖBL, 2009).

A adesão ao trato respiratório pela APEC, também é mediado por fimbrias, com destaque para fimbria tipo 1, fimbria P (*pap*) e *curli*. A adesina regulada pela temperatura (*tsh*) está relacionada aos estágios iniciais da infecção. O antígeno K e o gene de resistência ao soro (*iss*) tornam estas estirpes mais resistentes ao efeito bactericida do soro, e o sistema de aquisição de ferro (aerobactina) possibilita a permanência e infecção do hospedeiro (HIRSH, 2003; GYLES & FAIRBROTHER, 2010).

Todas as espécies aviárias são suscetíveis a colibacilose, caracterizada por causar lesões extraintestinais, porém a doença clínica é mais frequente em frangos, perus e patos. As aves aquáticas, geralmente apresentam a forma septicêmica da doença, com formação de exsudato caseoso no peritônio, sacos aéreos e região perihepática, hepatomegalia e esplénomegalia. Patos e gansos jovens são os mais acometidos e os surtos estão geralmente relacionados a criações sem manejo adequado ou por lagoas com água contaminada (BARNES et al., 2008).

### 2.3 Resistência aos antimicrobianos

Apesar de patos, gansos, cisnes e marrecos serem menos submetidos à antibioticoterapias do que galinhas, alguns estudos têm apontado cepas de *E.coli* resistentes a diversos antimicrobianos, como os beta-lactâmicos, tetraciclina e sulfonamidas, evidenciando a importância dessas aves como reservatórios de estirpes com potencial zoonótico e capazes de causar doenças extra-intestinais (EWERS et al., 2009). Tal resistência também já foi detectada em espécies de aves aquáticas selvagens como gaivotas (DOLEJSKA et al., 2007), marrecos selvagens (LITERAK et al., 2010) e gansos selvagens (ONNO, et al., 2009).

Um dos principais mecanismos de resistência aos antimicrobianos é a expressão dos genes de virulência beta-lactamase de espectro estendido (*ESBL*) e beta-lactamases tipo *AmpC* (MA et al., 2012). Estes genes proporcionam o rápido desenvolvimento de resistência das enterobactérias às cefalosporinas de largo espectro por hidrólise do anel beta-lactâmico destes

antimicrobianos. Em 2006, o Programa de Vigilância à Resistência Antimicrobiana Holandês isolou 153 *E.coli* obtidas de amostras cecais de frangos saudáveis em diferentes abatedouros na Holanda, em que 80% das amostras resistentes a cefotaxima carregavam o gene *ESBL* e 17% carregavam o gene *AmpC* (DIERIKX et al., 2010).

Animais e seus produtos destinados à alimentação humana, infectados e contaminados por *E.coli* produtoras de *ESBL*, podem ocasionar resistência antimicrobiana em quem os consomem. Além de alimentos, a água de lagos e lagoas contaminadas podem veicular esses patógenos. Da mesma forma é preocupante a detecção de genes *ESBL* em cepas comensais de *E.coli* isoladas de anseriformes, que também servem como veículo para propagação de bactérias resistentes, já que os animais que as albergam estão aparentemente saudáveis (MA et al., 2012).

### 3.Objetivo geral

Delinear as principais características das criações e investigar a presença de *Escherichia coli* em ovos de patas (*Cairina moschata*) procedentes de feiras livres e propriedades de subsistência no Distrito Federal e estado de Goiás, determinando seu perfil patogênico e perfil de resistência aos antimicrobianos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANDREATTI FILHO, L. R. **Saúde aviária e doenças**. São Paulo: Roca, 2007. vol. 10, p. 112-117.
2. BARNES, H. J.; NOLAN, L. K.; VAILLANCOURT, J. Colibacillosis. In: SAIF, Y. M.; FADLY, A. M.; GLISSON, J. R.; MCDUGALD, L. R.; NOLAN, L. K.; SWAYNE, D. E. **Diseases of Poultry**. Iowa: Iowa State University Press, 2008. cap.18, p.691-738.
3. CHERNAKI-LEFFER, A.M.; BIESDORF, S.M.; ALMEIDA, L.M.; LEFFER, E.V.B; VIGNE, F. Isolamento de enterobactérias em Alphitobiusdiaperinuse na cama de aviários no oeste do estado do Paraná. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, v.4, n.3,p. 243-247,2002.
4. CUNHA, M. P. V.; MANÃO, M. C.; FERREIRA, A. J. P.; KNÖBL, T. A similaridade genética de escherichia coli patogênica para aves (APEC) com estirpes humanas e a resistência antimicrobiana justificam a preocupação sanitária em relação aos produtos de origem aviária? **Saúde Pública Veterinária**, São Paulo, v.11, n.2, p.24-33, 2013.
5. DIERIKX, C.; ESSEN-ZANDBERGEN, A. V.; VELDMAN, K.; SMITH, H.; MEVIUS, D. Detection of extended spectrum beta-lactamase producing Salmonella enterica and Escherichia coli isolates from poultry. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.145, n.1, p.273-278, 2010.
6. DOLEJSKA, M.; CIZEKAND, A; LITERAK, I. High prevalence of antimicrobial-resistant genes and integrons in *Escherichia coli* isolates from black-headed gulls in the Czech Republic. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.103, n.1, p.11–19, 2007.
7. EWERS, C.; GUENTHER, S.; WIELER, L. H.; SCHIERACK, P. Mallard ducks – a waterfowl species with high risk of distributing Escherichia coli pathogenic for humans. **Environmental Microbiology Reports** [on line], Switzerland,v.1, n.6, p.510-517, 2009. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1758-2229.2009.00058.x/abstract;jsessionid=4B8F6B67BDB9DDBF6955A9D8DD053CF5.f04t02>. Acesso: 10 jan. 14.
8. FERREIRA, A. J. P.; KNÖBL, T. Enfermidades bacterianas. In:JÚNIOR BERCHIERI, A.; SILVA, NEPOMUCENO, E.; DI FÁBIO, J.; SESTI, L.; ZUANAZE, M. A. F. **Doenças das aves**. Campinas: Facta, 2009. cap.4, p. 457-474.
9. FIGUEROLA, J.; GREEN, A. J. A comparative study of egg mass and clutch size in the Anseriformes. **Journal Ornithology**, Sevilla, n. 147, p. 57-68, 2006.
10. GYLES, C. L.; FAIRBROTHER, J. M. Escherichia coli. In: GYLES, G. L.; PRESCOTT, J. F.; SONGER, G.; THOEN, C. O. **Pathogenesis of**

**bacterial infections in animals.** 4d. Iowa: Blackwell Publishing, 2010. cap. 15, p. 266-308.

11. HIRSH, D. D. Escherichia coli. In: \_\_\_\_\_. **Microbiologia Veterinária**. 2 ed. Rio de Janeiro: Granabara Koogan SA, 2003. cap. 9, p. 63-69.
12. KARIYAWASAM, S.; JOHNSON, T. J.; DEBROY, C.; NOLAN, L. K. Occurrence of pathogenicity island IAPEC-O1 genes among Escherichia coli implicated in avian colibacillosis. **Avian diseases**, Kennet Square, v.50, p.405-410, 2006.
13. KNÖBL, T.; GOMES, T. A. T.; VIEIRA, M. A. M.; BOTTINO, J. A.; FERREIRA, A. J. P. F. Detection of pap, sfa, afa and fim adhesin-encoding operons in avian pathogenic Escherichia coli. **International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine**, Washington, v.2, n.2, p. 135-141, 2004.
14. LYNNE, A. M.; KARIYAWASAM, S.; WANNEMUEHLER, Y.; JOHNSON, T. J.; JOHNSON, S. J.; SINHA, A. S.; LYNNE, D. K.; MOON, H. W.; JORDAN, D. M.; LOGUE, G. M.; FOLEY, S. L.; NOLAN, L. K. Recombinant lss as a Potential Vaccine for Avian Colibacillosis. **Avian Diseases**, Kennet Square, v.56, n.1, p.192-199, 2012.
15. LITERAK I., DOLEJSKA M., JANOSZOWSKA D., HRUSAKOVA J., MEISSNER W., RZYSKA H., BZOMA S., CIZEK A. Antibiotic-resistant Escherichia coli bacteria, including strains with genes encoding the extended-spectrum beta-lactamase and QnrS, in waterbirds on the Baltic Sea Coast of Poland. **Applied Environmental Microbiology**. Washington v.76, n.10, p.8126–8134, 2010.
16. MA, J. LIU, J.; LV, L.; ZONG, Z.; SUN, Y.; ZHENG, H.; CHEN, Z.; ZENG, Z. Characterization of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase genes found among Escherichia coli isolates from duck and environmental samples obtained on a duck farm. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.78, n.10, p.3668, 2012.
17. MATURANA, V. G.; PACE, F.; CARLOS, C.; PIRES, M. M.; CAMPOS, T. A.; NAKAZATO, G.; STHELING, E. G.; LOGUE, C. M.; NOLAN, L. K.; SILVEIRA, W. D. Subpathotypes of avian pathogenic Escherichia coli (APEC) exist as defined by their syndromes and virulence traits. **Open Microbiology Journal**, Sharjah, v.5, n.55, p. 55-64, 2011.
18. OLIVEIRA, W. F.; CARDOSO, W. M.; MARQUES, L. R.; SALLES, R. P.; C.; AGUIAR FILHO, J.B.; TEIXEIRA, R. S. C.; ROMÃO, R. S. C.; LIMA, A. C. P. Utilização de diferentes meios de cultura para isolamento de enterobactérias em amostras fecais de frango de corte procedentes de exportação industriais do Estado do Ceará, Brasil. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, Lisboa, v.99, n.552, p.211-214, 2004.

19. ONNO, T.; HAN, D.; JANG, J.; LEE, S.; KO, G.; KO, G.; CHOI, H. Y.; KIM, J. H.; SADOWSKY, M. J.; HUR, H. Absence of *Escherichia coli* phylogenetic group B2 strains in humans and domesticated animals from Jeonnam Province, Republic of Korea. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.75, n.17, p.5659-5666, 2009.
20. QUINN, P.J.; MARKEY, B.K.; CARTER, M.E.; DONNELLY, W.J.; LEONARD, F.C. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. 1<sup>a</sup> ed. Porto Alegre: editora Artmed 512p, 2005.
21. SILVEIRA, W. D.; FERREIRA, A.; BROCCHI, M.; HOLLANDA, L. M.; CASTRO, A. F. P.; YAMADA, A. T.; LANCELLOTTI, M. Biological characteristics and pathogenicity of avian *Escherichia coli* strains. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.85, n.1, p.47-53, 2002.
22. STATHOPOULUS, C.; PROVENCE, D. L.; CURTISS, R. Characterization of the avian pathogenic *Escherichia coli* hemagglutininTsh, a member of the immunoglobulin A protease-type family of autotransporters. **Infection and Immunity**, Washington, v. 67, n.1, p. 772-781, 1999.
23. UNIÃO BRASILEIRA DE AVICULTURA E ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE EXPORTADORES DE FRANGOS DE CORTE (**UBABEF**). Relatório Anual 2013. Disponível em: <<http://www.abef.com.br/ubabef/exibenoticiaubabef>> Acesso em: 15 de abril de 2014.

## **CAPÍTULO 2 - DETECÇÃO DE GENES DE VIRULÊNCIA E SUSCETIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS DE *Escherichia coli* EM OVOS DE PATA (*Cairina moschata*)**

### **1. INTRODUÇÃO**

O aumento do comércio e do consumo de produtos avícolas em todo o mundo torna a qualidade e a segurança desse tipo de alimento uma questão relevante na saúde pública (ASLAM et al., 2014). A criação de aves aquáticas tem aumentado ao longo dos anos em amplitude global, possivelmente em decorrência da elevação do consumo de carne e ovos de patos (CONOVER et al. 1997). Entretanto, estudos sobre a prevalência de patógenos nessas aves ainda são escassos (SILVA et al., 2014).

Na garantia de qualidade dos produtos de origem animal, dentre muitos fatores imprescindíveis estão a sanidade e a biossegurança durante a criação. No caso dos anseriformes, o ambiente que essas aves habitam também é fator determinante, inclusive para qualidade dos ovos (XU et al., 2014), já que muitas lagoas ou lagos no Brasil possuem água contaminada, promovendo veiculação de patógenos. Além disso, já foi comprovado que a ingestão de ovos de patas que têm acesso a águas contaminadas por mercúrio, bifenilpoliclorado (CHENG et al., 2013) e clordecona (JONDREVILLE et al., 2014) pode intoxicar quem os consome.

A APEC pode causar lesões extraintestinais graves em aves, promovendo prejuízos para avicultura. Esse patotipo está associado a diversos quadros clínicos e isto é possível pelos diferentes arranjos de fatores de virulência que podem estar presentes em cada cepa. Dentre os principais fatores de virulência que caracterizam a APEC estão a fímbria P (*papC*), aerobactina (*iucD*), a proteína repressora de ferro (*irp2*), hemaglutinina termossensível (*tsh*), proteína “vacuolating” autotransportadora (*vat*), toxina enteroagregativa (*astA*), proteína de aumento de resistência ao soro (*iss*) e a colicina V (EWERS et al., 2005).

O gene de virulência *pap* ou fímbria P facilita a adesão da bactéria em diferentes tecidos do hospedeiro (ROCHA et al., 2002; KNÖBL et al., 2004) e pode causar resposta inflamatória grave, auxiliando na ultrapassagem de barreiras dos tecidos e bacteremia (SZEMLAKO et al. (2013). Cada variante do

gene *pap* (*papA*, *papC*, *papE*, *papF*, etc) é responsável por codificar diferentes subunidades das fímbrias. Dentre as variantes do gene *pap* destaca-se o *papC* por sua maior detecção em APEC do que nos demais patótipos (KARIYAWASAM & NOLAN, 2011).

O fator de virulência *tsh*, codificado no plasmídeo ColV (DOZOIS et al., 2000) é responsável pela síntese de proteínas termo-sensíveis com capacidade hemaglutinante (GYLES & FAIRBROTHER, 2010) que auxiliam nos estágios iniciais de infecções em aves (NGELEKA et al., 2002; ROCHA et al., 2002;). As proteínas codificadas por este gene, são denominadas como termo-sensíveis, porque seu desempenho é influenciado pela temperatura e elas são mais funcionais em baixas do que em altas temperaturas (STATHOPOULOS, 1998).

O gene de resistência *iss*, promove o aumento da resistência aos efeitos líticos do soro, possibilitando maior taxa de sobrevivência do agente no hospedeiro. Este gene também é comumente identificado em isolados APEC (EWERS et al., 2007).

Ilhas de patogenicidade (IP) são ilhas genômicas, que codificam um ou mais genes de virulência, e parte ou todo arsenal molecular para que esses genes possam atingir sua célula alvo (VIEIRA, 2009). A IP *locus* para esfacelamento de enterócitos (LEE) é uma das mais estudadas e determinam lesões do tipo adesão e esfacelamento de enterócitos (A/E)(GIRARD, 2005), presente principalmente nos patótipos EHEC (JORIS et al., 2013), EPEC e STEC(GYLES & FAIRBROTHER, 2010).

O gene *eae*, localizado na IP LEE (GIRARD, 2005), é um dos mecanismos de virulência que caracterizam as cepas de *E.coli* diarreiogênicas (PERSSON, et al., 2007) como EHEC, EPEC e STEC. Estes dois últimos patótipos também são comumente associados como agentes etiológicos de diarreias graves em humanos nos países em desenvolvimento (COSTA et al., 2010), entretanto a cepa O157:H7 está relacionada ao patótipo EHEC .

Segundo ISHII et al. (2007), o patótipo EPEC têm adquirido maior importância entre os patótipos diarreiogênicos, pois além da presença frequente do gene *eae*, já foi isolado em diferentes espécies animais e também no meio ambiente, sugerindo menor exigência para infectar o hospedeiro. Este gene de virulência, capaz de causar lesões irreversíveis nos enterócitos

(GIRARD, 2005), também foi identificado no patotipo STEC originários de patos (WANG et al., 2010).

Cepas de *E.coli* multirresistentes a antimicrobianos, isoladas de diferentes animais também têm sido usualmente relatadas. Fato que pode estar atribuído à presença genes de resistência como o gene *iss* (YANG et al., 2004; LIMA-FILHO et al, 2013) e o gene *crf* detectado em *E.coli* isoladas de patos (WANG et al., 2012).

A atividade hemolítica também infere um maior potencial virulento *E.coli*. Estudos recentes mostram que cepas hemolíticas podem albergar um ou mais tipos de hemolisinas (LORENZ et al., 2013) que podem inclusive serem detectadas em *E. coli* envolvidas em infecções entéricas e urinárias do homem (BRITO, 2000).

A pesquisa de APEC em anseriformes, bem como seus mecanismos de virulência e suscetibilidade aos antimicrobianos se faz necessária, posto que essas aves são criadas, basicamente, junto com galinhas. Todavia, enquanto estudos sobre carne e ovos de frangos e sua associação com agentes patogênicos de origem alimentar são amplamente disponíveis, esses são raros em relação aos perigos implicados por patos na cadeia alimentar.

Assim, o presente estudo visa caracterizar as propriedades de subsistência criadoras de patos, determinar a frequência de APEC em ovos de patas, detectar seus fatores de virulência e perfil de suscetibilidade antimicrobiano, bem como pontuar os riscos potenciais para a saúde humana.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Local

As análises bacteriológicas foram conduzidas e realizadas nos Laboratórios de Bacteriologia e Biologia molecular do Departamento de Medicina Veterinária da Escola de Veterinária e Zootecnia (EVZ) da Universidade Federal de Goiás.

### 2.2 Caracterização dos criatórios de patos

Para o delineamento do perfil das propriedades de subsistência criadoras de patos, foram aplicados questionários com informações que alimentaram o banco de dados, tais como: finalidade da criação, espécie de aves criadas, número de patos, tipo de abrigo, origem da água utilizada para criação, tipo de alimentação, origem das aves, tipo de incubação, programa de vacinação e destino das aves mortas.

### 2.3 Colheita das amostras

Foram utilizadas 38 dúzias (456 ovos) obtidas de diferentes feiras livres e 25 dúzias (300 ovos) originárias dos criatórios de subsistência. De cada dúzia foram obtidas três amostras, compostas por um *pool* de quatro ovos de patas, totalizando 567 amostras.

A qualidade externa dos ovos foi avaliada, de acordo com a presença de sujidades e rachaduras na casca. Logo após, foram separadas assepticamente a casca, a gema e a clara para investigação do agente conforme seus componentes. Para análise foram necessárias amostras com 25g de cada um desses componentes. Posteriormente, foi adicionada água peptonada a 0,1%, obtendo a diluição de  $10^0$ , à 37°C, durante 18-24 horas.

## 2.4 Pesquisa de *Escherichia coli*

### Bacteriologia convencional

Inicialmente as amostras foram fracionadas em aproximadamente 1mL, inoculadas em caldo de BHI à 37° C, durante 18-24 horas, e posteriormente plaqueadas em ágar MacConkey.

Foram selecionadas três a cinco unidades formadoras de colônias e repicadas em tubos contendo ágar tríplice açúcar ferro (TSI), incubadas a 37°C, durante 24 horas (BRASIL, 2003). A identificação de *Escherichia coli* por testes bioquímicos fenotípicos, caracterizou-se por testes de motilidade, produção de indol, hidrólise de urease, H<sub>2</sub>S, malonato, reação vermelho metila, reação no citrato de Simmons, glucose e lactose.

Os isolados foram submetidos ao teste de hemólise, realizado em ágar sangue contendo 5% de sangue de ovelha desfibrilado. Após semeadas, as placas foram incubadas a 37°C por 18 a 24 horas (BRASIL, 2003) para avaliação de presença ou ausência de hemólise.

Posteriormente, os isolados foram inoculados e armazenados em ágar simples inclinado e estocados em temperatura de refrigeração (4°C) para extração do DNA.

## 2.5 Suscetibilidade aos antimicrobianos

Os isolados de *E.coli* foram submetidos a teste de sensibilidade aos antimicrobianos (NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS - NCCL, 2002).

Mediante uso de agulha de níquel-cromo, três a cinco colônias compatíveis com a bactéria foram transferidas e incubadas em 5mL de caldo Casoy até atingir a turvação de 0,5 na escala MacFarland. Por meio de suabe umedecido no caldo, realizou-se esfregaço na superfície do meio ágar Mueller-Hinton, até obter uma camada uniforme e homogênea. Para permitir a propagação do inóculo no caldo, após 15min, os discos antimicrobianos foram colocados sobre a superfície inoculada, mantendo-se uma distância de 3cm

entre eles. Posteriormente, as placas foram incubadas, em posição invertida, na temperatura de 37° C, durante 18 horas.

A leitura dos halos de inibição realizou-se com auxílio de régua e interpretada conforme as medidas fornecidas pelo fabricante, obtendo-se as porcentagens de resistência, sensibilidade intermediária e sensibilidade dos isolados de *Escherichia coli*.

Os antimicrobianos submetidos a testes de sensibilidade foram: ampicilina (10µg), amoxicilina (3mcg), ceftiofur (30µg), doxaciclina (30mcg), enrofloxacina (5µg), neomicina (30µg), sulfametazole (30µg), sulfonamida (300µg), tetraciclina (30µg), cotrimoxazol (10mcg) e cloranfericol (30µg).

## 2.6 Técnica da PCR convencional

### Extração do DNA genômico das amostras

Para o procedimento de extração, as amostras foram previamente incubadas em caldo BHI por 24h em temperatura de 37° C para enriquecimento bacteriano. Para extração, inicialmente foi colhido 1mL da suspensão da cultura bacteriana e submetida a centrifugação de 13.200 RPM por cinco minutos. Após o descarte do sobrenadante e os precipitados foram ressuspensos em 800µL de água MiliQ. Posterior a homogeneização, as amostras foram submetidas a uma nova centrifugação, nas mesmas condições citadas anteriormente. O sobrenadante foi descartado e 80µL de água MiliQ foram adicionadas. Logo após, as amostras foram submetidas à temperatura de 96°C durante dez minutos. O sobrenadante obtido desse processo foi removido e mantido congelado em tubos de polipropileno à -20°C para teste de PCR (SILVA et al., 2011).

Para as reações dos diferentes genes de virulência foram empregados pares de oligonucleotídeos para *papC*, *tsh* (EWERS et al., 2005) e *eae* (YU et al., 1992) e o gene de resistência *iss* (Quadro1).

QUADRO 1 - Sequência de *primers*, número de pares de bases amplificadas e condições utilizadas na PCR.

Gene	Sequência de primer 5'-3'	Número de pares de bases	Autores
<i>papC</i>	5'-TGATATCACGCAGTCAGTAGC-3' 5'-CCGGCCATATTCACATAA-3'	205pb	RODRIGUEZ -SIEK et al. (2005)
<i>Iss</i>	5'-ATC ACA TAG GAT TCT GCC G-3' 5'-CAG CGG AGT ATA GAT GCC A-3'	309pb	EWERS et al.(2005)
<i>Tsh</i>	5'-ACT ATT CTC TGC AGG AAG TC-3' 5'-CTT CCG ATG TTC TGA ACG T-3'	829pb	EWERS et al.(2005)
<i>Eae</i>	5'-AAACAGGTGAAACTGTTGCC-3' 5'-CTCTGCAGATTAACCTCTGC-3'	454pb	YU et al. (1992)

A PCR inicia-se pela desnaturação, que separa a cadeia dupla de DNA através de temperaturas elevadas (<90°C). Em seguida, na hibridização, ocorre a replicação da sequência desejada (40-60°C). A extensão do DNA, que sempre é iniciada no extremo 3' do *primer*, cria dupla fita a partir de cada fita simples (GRUNENWALD, 2003). Cada reação foi efetuada no termociclador Mastercycler Personal Eppendorf®, com protocolos descritos pelos autores de cada par de *primers* e estão ilustrados nas Tabelas 1 a 3.

TABELA 1 - Componentes utilizados na realização da PCR convencional para amplificação do gene *papC*.

Componentes	Volume
Água ultra pura ( <i>Dnase/Rnase-Free Distilled Water – Invitrogen</i> )	16,25µL
Tampão 10X ( <i>PCRbuffer10xInvitrogen</i> )	2,5 µL
Mg Cl <sub>2</sub> <i>Invitrogen</i> (50mM)	2,0 µL
dNTP <i>Amersham Biosciences</i> (10mM)	1,0 µL
<i>Primerforward</i>	0,5 µL
<i>Primer reverse</i>	0,5 µL
Taq polimerase ( <i>Invitrogen</i> )	0,25 µL

DNA	2,0 µL
TOTAL	25,0 µL

Fonte: adaptado de RODRIGUEZ-SIEK et al.(2005).

A amplificação gene *papC* foi adaptada adaptada de RODRIGUEZ-SIEK et al.,(2005) para um ciclo inicial (*hotstart*) de 94°C/5min, seguido de 30 ciclos repetidos de 94°C/30seg (anelamento), 58°C/30seg (extensão) e 72°C/2min (desnaturação). A programação era finalizada com 2min. à 72°C para maximizar o processo de extensão.

TABELA 2 - Componentes utilizados na realização da PCR duplex para amplificação dos genes *iss* e *tsh*.

Componentes	Volume
Água ultra pura ( <i>Dnase/Rnase-Free Distilled Water – Invitogen</i> )	16,3µL
Tampão 10X ( <i>PCRbuffer10xInvitrogen</i> )	2,5 µL
Mg Cl <sub>2</sub> <i>Invitrogen</i> (50mM)	2,0 µL
dNTP <i>AmershamBiosciences</i> (10mM)	1,0 µL
<i>Primerforward/ Primer reverse iss</i>	0,5 µL
<i>Primerforward/ Primer reverse tsh</i>	0,5 µL
Taq polimerase ( <i>Invitrogen</i> )	0,2 µL
DNA	2,0 µL
TOTAL	25,0 µL

Adaptado de Ewers et al.(2005).

Para o gene *iss* e *tsh*, após desnaturação inicial de 94°C durante 3min, a amplificação foi realizada em 25 ciclos de 94°C/30seg (desnaturação), 58°C/30seg (anelamento), 68°C/30seg (extensão) e finalizada com 72°C/10min (adaptado de EWERS et al., 2005).

TABELA 3 - Componentes utilizados na realização da PCR para amplificação do gene *eae*

Componentes	Volume
Água ultra pura ( <i>Dnase/Rnase-Free Distilled Water – Invitogen</i> )	35,75 µL
Tampão 10X ( <i>PCRbuffer10xInvitrogen</i> )	5,0 µL

Mg Cl <sub>2</sub> <i>Invitrogen</i> (50mM)	2,0 µL
dNTP <i>Amersham Biosciences</i> (10mM)	1,0 µL
<i>Primer foward</i>	0,5 µL
<i>Primer reverse</i>	0,5 µL
Taq polimerase ( <i>Invitrogen</i> )	0,25 µL
DNA	5,0 µL
<b>TOTAL</b>	<b>50,0 µL</b>

Adaptado de YU et al. (1992).

O programado utilizado no termociclador para o gene *eae* foi adaptado de YU et al. (1992) com um ciclo inicial de 94°C/2min, seguido de 30 ciclos repetidos de 53°C/2min, 72°C/2min e 94°C/1min. Finalizando o processo de extensão com 2min à 72°C.

Como controles positivos para as reações da PCR, foram utilizadas amostras de DNA genômico de amostras de campo positivas para *E. coli* cedida pela professora Dr<sup>a</sup> Terezinha Knöbl do Laboratório de Ornitopatologia da Universidade de São Paulo.

### **Análise estatística**

Os dados foram armazenados em tabelas no programa Excel 2010 e interpretados mediante análise da frequência e submetidos ao teste não paramétrico de qui-quadrado ( $\chi^2$ ), sendo admitindo-se um erro máximo de 5% (SAMPAIO, 2002).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentre os anseriformes, o pato foi à espécie escolhida para este estudo por sua relevância na cadeia alimentar, já que são as aves aquáticas mais criadas no Brasil, e tanto a carne quanto os ovos são consumidos nacionalmente. Entretanto, ainda não existem estudos a fim de caracterizar as propriedades criadoras de patos no Brasil, especialmente no Distrito Federal e estado de Goiás. Por isso, foram realizados questionários para caracterizar o perfil dessas propriedades (Tabela 4).

TABELA 4 – Perfil das 25 propriedades que criam patos, localizadas no Distrito Federal e estado de Goiás nos anos de 2013 e 2014.

<b>Finalidade da criação</b>			
Subsistência	Comercial		
21	4		
<b>Espécies de aves criadas</b>			
galinhas	patos	ornamentais	
25	25	2	
<b>Número de patos na criação</b>			
Até 20 aves	21 a 40 aves	41 a 80 aves	Acima de 80 aves
12	11	1	1
<b>Alimentação utilizada</b>			
caseira	comercial	Milho	capim
15	11	24	18
<b>Origem da água utilizada</b>			
lagoa	água corrente	água tratada	represa
1	22	2	5
<b>Aquisição dos patos jovens</b>			
casa comercial	própria propriedade		
0	25		
<b>Tipo de incubação</b>			
natural(galinha-pata)	incubadora		
25	0		
<b>Vacinação</b>			
Newcastle	Cólera	Bouba aviária	Não vacina
6	aviária/Tifo	13	15
	7		
<b>Destino das aves mortas</b>			
fossa séptica	aterro	Incineração	outro
1	13	3	8
<b>Tipo de abrigo</b>			
Galpão	abrigo rústico	Soltos	
3	12	10	

Conforme delineamento do perfil das propriedades de subsistência, o pato foi a espécie de aves aquáticas mais criada no Distrito Federal e estado de Goiás, e em 100% (25/25) dos locais visitados havia criação consorciada com galinhas. O convívio entre estas duas espécies pode facilitar a troca de agentes infecciosos ou até mesmo de genes de virulência ou resistência. Além disso, destaca-se o tipo de incubação que em 100% (25/25) das propriedades era natural galinha-pata, possibilitando uma troca precoce da população microbiana, a partir dos primeiros dias de vida ou até mesmo via ovo.

Fundamentado em aspectos culturais que patos são mais rústicos e resistentes a doenças do que frangos, a preocupação com a sanidade dessa ordem de aves não foi satisfatória em nenhum dos locais visitados. A vacina mais utilizada pelos produtores foi contra a Boubá aviária, com 52% (13/25) de ocorrência. Entretanto, em muitos locais não havia qualquer tipo de imunização nessas aves.

Observou-se também, que o programa de vacinação para as aves aquáticas nesta região é ainda preocupante, pela infrequente utilização de vacina contra doença de Newcastle, com ocorrência em 24% (6/25) das propriedades. Este achado permite o surgimento de uma lacuna imunológica vulnerável nessas aves, posto que mesmo os patos sendo considerados assintomáticos para esta enfermidade, eles se infectam e podem ser disseminadores do vírus. Este dado é importante até mesmo em relação ao mercado externo, já que a doença de Newcastle é uma das enfermidades de notificação compulsória listadas pela Organização Mundial da Saúde Animal (OIE, 2014).

A alimentação dessas aves era basicamente caseira (15/25), milho (24/25) e capim (18/25). A minoria dos locais utilizava rações comerciais (11/25), e estas eram fabricadas para alimentação de frangos e não para aves aquáticas. Alimentação inadequada e desbalanceada, principalmente nos primeiros dias de vida, interfere negativamente no desenvolvimento do sistema imune, prejudica o desempenho e aumenta o risco de infecções. Ademais, as características da ração fornecida aos animais influenciam na qualidade do ovo (FREITAS et al., 2011). Com isso, a alimentação destinada aos patos pode ocasionar perda nas características nutricionais e também favorecer na invasão por contaminantes nos ovos.

Outra informação importante foi o destino das aves mortas, onde 52% (13/25) das carcaças eram enterradas e em muitos casos eram apenas eliminadas em locais afastados, permitindo contaminação do lençol freático e o acesso de outros animais.

Abrigos do tipo rústicos foram os mais frequentes, 48% (12/25), e em 40% (10/25) das propriedades os patos eram criados soltos, o que possibilita que as aves fiquem sujeitas a fatores climáticos como sol e chuva, contrariando os critérios de bem estar animal. Entretanto, parece que características genéticas contribuem para o não surgimento de enfermidades.

A água utilizada, em 88% (22/25) da criação de patos foi água corrente (sem tratamento), que pode facilitar a veiculação de patógenos e de acordo com HOLLMEN et al. (2011) a qualidade da água influencia no aparecimento de colibacilose em patos marinhos (*Tribe mergini*). Ademais, em algumas das propriedades estudadas as aves tinham livre acesso as nascentes, utilizada inclusive pelas pessoas, o que provavelmente possibilita a veiculação de microrganismos dos patos para humanos. Não obstante, MEERBURG et al. (2011) apontam outros fatores que podem influenciar o nível de contaminação da água como, a concentração de aves por área e o tipo de fonte de água. Considerando que a água faz parte do ambiente natural das aves aquáticas, e que as bactérias da família *Enterobacteriaceae*, como *E. coli*, são componentes da microbiota intestinal de patos domésticos, estes podem atuar como veiculadores de estirpes patogênicas dessa família para homem já que normalmente são criados próximos aos seres humanos (SILVA et al., 2014).

Neste estudo, os ovos de patas, antes de serem manipulados para a pesquisa bacteriológica, foram avaliados quanto à qualidade externa e verificou-se que aqueles originários de feiras livres apresentaram à inspeção, menos sujidades e rachaduras, diferentes dos ovos das propriedades de subsistência (Figura 1). Este resultado esta em desacordo com BRASIL (1990) o qual aponta que os ovos aptos para consumo deverão ser desprovidos de sujidades, rupturas ou trincas, submetidos à ovoscopia e devem ser devidamente acondicionados. Acrescenta-se ainda, que os ovos de patas vendidos na região Centro Oeste, não são submetidos à inspeção e podem representar riscos a saúde pública, posto que informações sobre a sanidade

dessas aves e os padrões sanitários de produção e armazenamento são escassos.



FIGURA 1 - **A.** Dúzia de ovos oriunda de feira livre. **B.** Dúzia de ovos obtida de propriedade de subsistência.

No presente trabalho, o universo amostral foi 75 *pools* de casca, 75 *pools* de albume e 75 *pools* de gema, compostos por quatro ovos cada, totalizando 225 amostras obtidas de propriedades de subsistência e 114 *pools* de casca, 114 *pools* de albume e 114 *pools* de gema, também compostos por quatro ovos cada, totalizando 342 amostras originárias de feiras livres. Das 567 amostras analisadas, sendo 225 de propriedades e 342 de feiras, 17,1% (97/567) foram positivas para *Escherichia coli*. Esta frequência de isolados de *E.coli* corrobora com SILVA et al. (2014), que referem o gênero *Escherichia* como o menos encontrado em suabes cloacais e amostras de fezes de patos no estado do Ceará.

Uma das hipóteses a ser considerada referente à baixa frequência de *E. coli* nas amostras de ovos, é a presença de componentes químicos com ação antimicrobiana na casca, na cutícula e no albume. Elevados níveis de enzimas lisozima tipo-c e ovotransferrina, e da proteína ovocalixin-32 foram detectados em ovos de algumas aves aquáticas, possivelmente pela necessidade de mecanismos de defesa para sobrevivência das espécies em ambientes de elevada umidade onde estes animais vivem (WELLMAN-LABADIE et al., 2007). Outra hipótese seria a possível ação bactericida do óleo secretado pelo uropígeo das aves aquáticas, a qual foi comprovada por pesquisadores, em análises *in vitro*. O óleo produzido pelo *House Finch*

(*Carpodacus mexicanus*) inibiu significativamente o crescimento de diferentes bactérias (SHAWKEY et al. 2003; GIRAUDEAU et al., 2014).

Mediante a análise visual dos ovos de patas de propriedades de subsistência e de feiras livres, acredita-se que os mesmos foram lavados para apresentarem um aspecto atrativo ao consumidor. Mesmo assim não se observou diferença significativa entre as frequências de isolados de *Escherichia coli* dos ovos de patas obtidos nas propriedades de subsistência, 19,5% (44/225), em relação aos vendidos em feira livres, 15,5% (53/342).

Referente aos isolados nas estruturas do ovo, obteve-se do total de amostras positivas 59,8% (58/97) de isolamento na casca, 20,6% (20/97) no albume, 19,6% (19/97) na gema (Tabela 5). Os resultados semelhantes dos isolados em ambos os tipos de estabelecimentos e a maior frequência obtida na casca podem ser atribuídas a pouca preocupação do produtor com o aspecto externo dos ovos, a maior permanência no ninho nas propriedades, e até a lavagem inadequada desses produtos para serem comercializados nas feiras livres.

TABELA 5 - Distribuição de *E.coli* por estruturas do ovo de pata oriundos de 25 propriedades de subsistência e 38 feiras livres

Estrutura do ovo	Propriedades de subsistência		Feiras livres		Total		<i>p</i>
	n(+)	%	n(+)	%	N	%	
casca	33	34	25	25,8	58	59,8	NS
albume	7	7,2	13	13,4	20	20,6	NS
gema	4	4,1	15	15,4	19	19,6	NS
Total	44	45,3	53	54,6	97	100	

Dados submetidos ao teste não paramétrico de qui-quadrado a 5%.

Como pode ser observado na Tabela 5, a casca foi a estrutura do ovo onde se verificou maior isolamento da bactéria, 59,8% (58/97), tanto nos ovos de feiras livres quanto nos das propriedades de subsistência. Provavelmente, aspectos higiênico-sanitários também podem estar envolvidos com o isolamento de *E.coli* em ovos de patas. No entanto, estes resultados diferiram dos encontrados por CARDOSO et al. (2001) que isolaram *E.coli* em 100% das cascas dos ovos de galinhas caipiras. Outro trabalho, realizado em feiras livres do Paraná apontam a presença de *E.coli* por problemas de higiene

durante a colheita, armazenamento ou na manipulação de produtos (SALVADOR et al., 2011).

A presença de *E.coli* no albume (13/20) e na gema (15/19) dos ovos procedentes de feiras livres reflete a sua qualidade, o que pode ser atribuído à lavagem dos ovos para diminuir a carga bacteriana da casca, contudo os riscos de contaminação interna do ovo aumentam pela perda da película protetora da casca (STRINGHINI et al., 2009).

Outro dado importante analisado foi que tanto nas feiras quanto nas propriedades visitadas os ovos eram armazenados em temperatura ambiente. Isto pode interferir nas características bacteriológicas e nutricionais desse produto, já que a perda de peso dos ovos decorrente da redução de água do albume também é maior em ovos acondicionados em temperatura ambiente (FREITAS et al., 2011), diminuindo assim seu valor de mercado.

Ademais a lavagem e a temperatura de armazenamento inadequadas, a menor procura desses produtos quando comparados aos ovos de galinhas, pode propiciar a translocação de microrganismos presentes na casca para as estruturas internas do ovo. O longo período de armazenamento, observado principalmente em feiras, ocorre, possivelmente, por sua comercialização unitária, ao contrário dos ovos de galinha vendidos em dúzias. A venda por unidade e não por dúzias é mais comum porque estes ovos são comercializados, em sua maioria, com finalidade terapêutica (baseado em costumes regionais).

As hipóteses previamente levantadas a respeito dos efeitos causados pelo período e temperatura de armazenado dos ovos de patas são respaldadas por LEANDRO et al. (2005), BARBOSA et al. (2008), MOURA et al. (2008), FREITAS et al. (2011) e FIGUEIREDO et al. (2011) que os referem como fatores determinantes para sua qualidade.

A refrigeração poderia ser uma alternativa adotada em ambos os tipos de estabelecimentos para prolongar a vida útil desse produto, já que ela atenua o efeito deletério do tempo durante a estocagem, mantendo a qualidade dos ovos por um período maior (BARBOSA et al.,2008; MOURA et al.,2008; FIGUEIREDO et al., 2011). E de acordo com as Normas Gerais de Inspeção de Ovos, ovos frescos devem ser armazenados a temperaturas entre 8°C e 15°C, com a umidade relativa do ar entre 70% a 90% (BRASIL, 1990).

Outro objetivo deste trabalho foi determinar a suscetibilidade de *E.coli* frente aos antimicrobianos de maior uso na medicina veterinária e humana. Verificou-se que 95,8% (93/97) dos isolados de *E.coli* foram resistentes a pelo menos um tipo de antimicrobiano e em 91,7% (89/97) ocorreu sensibilidade intermediária. Este resultado é preocupante, pois de acordo com MEULLEN & DIKKEN (2003) as aves aquáticas são consideradas mais resistentes a doenças que galinhas, necessitando de menores cuidados durante a criação. Bem como, são raramente submetidas a tratamentos com antimicrobianos. Talvez um dos fatores que contribuiu para tal frequência de resistência seja a criação conjunta com galinhas e o contato galinha-pata desde a incubação que ocorre nas propriedades de subsistência. Estas hipóteses são respaldadas por ADZITEY et al. (2012) que indicam a influência direta do ambiente de criação dos patos na sanidade dos mesmos.

A ação ineficiente dos diversos antimicrobianos sobre esta bactéria corrobora com as altas taxas de *Escherichia coli* resistentes (77,5%) isoladas por ZANATTA et al. (2004) de carcaças de aves comerciais, bem como com a sensibilidade intermediária detectada em 93% das amostras de fezes de gaivotas (ALROY et al., 2011).

Na determinação do perfil de suscetibilidade (Figura 2) das 97 amostras de *E.coli* isoladas de ovos de patas, se obteve resistência em: amoxicilina 44,3% (43/97), neomicina 52,5% (51/97), doxiciclina 57,7% (56/97), ampicilina 41,2% (40/97), sulfametazole 55,6% (54/97), cloranfenicol 27,8% (27/97), ceftiofur 48,4% (47/97), tetraciclina 59,8% (58/97), enrofloxacina 30,9% (30/97), sulfonamida 71,1% (69/97), cotrimoxazol 49,5% (48/97).

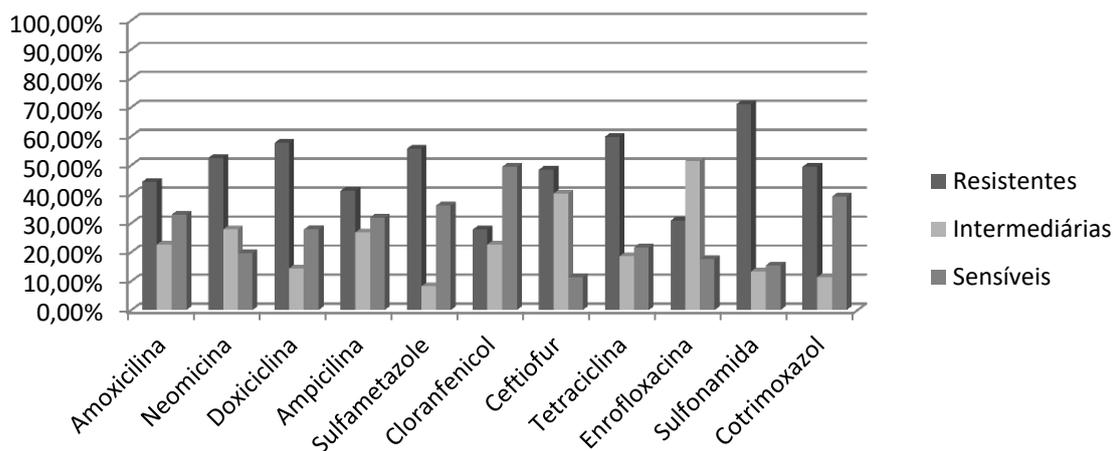


FIGURA 2 - Percentual de sensibilidade, sensibilidade intermediária e resistência de amostras de *Escherichia coli* isoladas ovos de patas frente aos diversos antimicrobianos coletadas no Estado de Goiás e Distrito Federal durante os anos de 2013 e 2014.

As sulfas foram os antimicrobianos que apresentaram menor eficácia, onde as amostras foram resistentes em 71,1% (69/97) à sulfonamida, 55,6% (54/97) à sulfametazole e 49,5% (48/97) à cotrimoxazol. As altas porcentagens de resistência podem ser atribuídas ao uso frequente, indiscriminado e por muitos anos desses antimicrobianos, inclusive como promotor de crescimento na avicultura industrial.

Constatou-se ainda que os isolados foram resistentes a ampicilina e a amoxicilina em 41,2% (40/97) e 44,3% (43/97), respectivamente. HIDASI et al. (2013) obtiveram resultados ainda maiores em amostras de psitacédeos, em que 70,9% das isolados de *E.coli* foram resistentes a amoxicilina e 75,6% à ampicilina. SMET et al. (2010) acrescentam que a resistência a estes antimicrobianos beta-lactâmicos é decorrente da produção de beta-lactamase por muitas cepas, tornando-as naturalmente resistentes a estas drogas.

A doxiciclina com 57,7% (56/97), a tetraciclina com 59,8% (58/97), a neomicina com 52,5% (51/97) e o ceftiofur com 48,4% (47/97) apresentaram resultados semelhantes entre si, em relação à porcentagem de resistência. Os antimicrobianos mais eficazes foram a enrofloxacina com 30,9% (30/97) e o cloranfenicol com 27,8% (27/97) de resistência. No entanto, menos sendo os mais eficientes, as taxas de resistência continuaram altas, tornando-se preocupantes. Pois, a enrofloxacina é um antimicrobiano utilizado infecções graves. Já o cloranfenicol teve sua fabricação, importação, comercialização e uso proibidos há muitos anos em animais destinados a alimentação (ANVISA,

2009) e mesmo assim ainda existem estirpes resistentes a ele talvez por ter sido um quimioterápico de largo uso em propriedades rurais.

Mesmo com a proibição do uso de tetraciclina, cloranfenicol, sulfonamidas como aditivos moderadores de crescimento nas rações de animais de produção no Brasil desde 1998 (BRASIL, 1998), níveis alarmantes de resistência para diferentes antimicrobianos vem sendo encontrados na avicultura comercial (GIGUÈRE et al., 2010; SANTANA et al., 2011). Bem como os detectados para doxiciclina, neomicina, enrofloxacina e oxitetraciclina, de carcaças de frangos destinados para consumo (LIMA-FILHO et al, 2013).

Situação semelhante ocorre nas criações de aves aquáticas domésticas, em que mesmo sem o uso de antimicrobianos como promotores de crescimento, a utilização terapêutica dessas drogas pode conferir resistência. MENDES et al. (2013) ressaltam que além de dificultar a terapêutica, o uso de antimicrobianos na alimentação animal também é um risco potencial para saúde pública, posto que existe a possibilidade da presença de resquícios dessas drogas na carne, ovos ou leite.

Outra abordagem que necessita ser apontada foi a detecção de *E.coli* multirresistentes, já que 7,2% (7/97) das amostras foram resistentes à dois ou três antimicrobianos, 14,4% (14/97) à quatro, 23,7% (23/97) à cinco, 4,1% (4/97) à seis, 11,3% (11/97) à sete, 8,2% (8/97) à oito e 9,2% (9/97) à nove antimicrobianos. Destacando-se quatro cepas resistentes a dez e duas cepas resistentes a todos os onze antimicrobianos testados, representando 4,1% e 2% do total de isolados, respectivamente. Apenas 3,1% (3/97) dos isolados foram resistentes a apenas um antimicrobiano, revelando os altos níveis de multirresistência.

LITERAK et al. (2010) referem a colonização das aves aquáticas selvagens por *E.coli* multirresistentes originárias de aves domésticas e humanos, mediante a análise filogenética. Os autores acrescentam que o contato natural entre aves aquáticas selvagens e agentes antimicrobianos não ocorre, logo estes podem se infectar ao procurarem alimento em zonas rurais e urbanas. Fato este, que é muito mais frequente entre os patos domésticos, devido à criação conjunta com galinhas.

Relatos de *E.coli* multirresistentes têm se tornado frequentes, como as isoladas de fezes de crianças no Brasil, onde 43% eram resistentes a três

ou mais antimicrobianos (SCALETSKY et al., 2010) e 94,3% das amostras de conteúdo cecal e suabes infraorbitais de frangos de corte e poedeiras comerciais, com ou sem sinais clínicos, que se mostraram resistentes a, no mínimo, três antibióticos (BARROS et al., 2012).

O achado de multirresistência nos isolados de *E.coli* presente nos ovos de patas, que são consumidos inclusive com finalidade terapêutica, indicam que essas aves podem veicular patógenos resistentes a cadeia alimentar. Também HIDASI et al. (2013) identificaram a bactéria em fezes de psitacídeos clinicamente saudáveis, com alta resistência à antibióticos e quimioterápicos comumente utilizados na avicultura.

Outro aspecto a ser considerado, além da possibilidade de infecção humana pela na ingestão dos produtos derivados de patos e da veiculação de fenótipos de *E. coli* resistentes, o risco de contaminação de águas em que essas aves aquáticas têm acesso também é preocupante. Embora não tenha sido objeto deste estudo, esta preocupação se respalda em ALROY et al., (2011) os quais detectaram *E.coli* com 59,2% de resistência a diferentes antimicrobianos em águas residuais de locais frequentados por gaivotas. Ressalta-se ainda que marrecos selvagens (*Anas platyrhynchos*) e gaivotas (*Larusar gentatus*) são considerados reservatórios de *E.coli* resistentes aos antimicrobianos de primeira geração, como algumas cefalosporinas de largo espectro e quilononas. Além de servirem como possíveis produtores e disseminadores de novos tipos de resistência (LITERAK et al.,2010).

Este resultado de alta frequência de resistência aos antimicrobianos em microrganismos intestinais é preocupante não só porque pode comprometer o tratamento de infecções causadas por estirpes patogênicas, mas também pela possibilidade de veiculação de fatores de resistência e virulência entre as cepas (SCALETSKY et al., 2010).

Além do uso indiscriminado de antimicrobianos na avicultura (RODRIGUES et al., 2006), da permuta genética entre as bactérias (KUHNERT et al., 2000) através plasmídeos e transposons (SUMMERS, 2002), mecanismos de sobrevivência desenvolvidos pela célula bacteriana, como o sistema Cpx presente na cápsula de bactérias Gram-negativas, também podem estar envolvidos no resistência aos antimicrobianos (RAIVIO et al., 2013).

Os isolados de *E.coli* também foram submetidas ao teste de hemólise em ágar sangue, e 40,2% (39/97) tiveram a habilidade de destruir eritrócitos. Esta capacidade hemolítica se situa entre as características microbianas associadas à virulência (RAJI et al., 2003). LORENZ et al. (2013) obtiveram percentuais mais elevados, em que 86,7% dos isolados de *E.coli* de diferentes fontes, como animais e alimentos, produziram hemólise. No entanto, BRITO et al. (2000) encontraram resultados discretos, visto que apenas 7% das estirpes, obtidas de galinhas com lesões no sistema reprodutor tiveram atividade hemolítica.

Outros elementos importantes para a resistência e virulência bacteriana são as combinações de genes que facilitam a invasão, colonização e permanência no hospedeiro. A presença ou ausência destes fatores, agregada a patogenia e quadros intestinais e extraintestinais, permitem a classificação da *E.coli* em patotipos (CROXEN & FINLAY, 2010). Neste estudo foram pesquisados os genes de virulência *papC*, *tsh* e *eae*, e o gene de resistência *iss*. Os genes *papC*, *tsh* e *iss* foram pesquisados a fim de caracterizar o patotipo APEC (EWERS et al., 2005), já os genes *eae* foram investigados em busca de patotipos relacionados a saúde pública como o EHEC (ISHII et al., 2007).

Os 97 isolados de *E.coli* foram submetidos ao teste da PCR convencional para detecção dos genes de virulência e resistência, onde 36,1% (35/97) possuíam pelo menos um dos genes pesquisados. Dos isolados em propriedades 31,8% (14/44) foram positivos para um dos genes e 39,6% (21/53) das feiras livres. Os isolados de *E.coli* foram positivos, 15,4% (15/97) para *papC*, 21,6% (21/97) para *tsh*, 17,5% (17/97) para *iss*, 2% (2/97) para *eae* (Tabela 6).

TABELA 6 - Frequência dos genes *papC*, *tsh*, *eae* e *iss*, de isolados de *E.coli* identificados em ovos de patas de 25 propriedades de subsistência e 38 feiras-livres localizados no Distrito Federal e estado de Goiás.

Genes	Propriedades de subsistência		Feiras livres		Total	
	N(44)		N(53)			
	n(+)	%	n(+)	%	n(+)	%
<i>papC</i>	8	18,2	7	15,1	15	15,4
<i>tsh</i>	8	18,2	13	24,5	21	21,6
<i>eae</i>	0	0	2	3,7	02	2,0
<i>iss</i>	9	20,4	8	15,1	17	17,5

A letra N indica o número total de amostras de *E.coli* isoladas de propriedades de subsistência e feiras livres. n(+) equivale ao número de amostras positivas para um dos genes de virulência.

O gene *tsh* foi identificado em 21,6% (21/97) dos isolados, obtendo maior frequência entre os quatro pesquisados. Este gene é comumente detectado na APEC e tem como função a síntese de proteínas termo-sensíveis, com habilidade hemaglutinação (GYLES& FAIRBROTHER, 2010), que estão presentes na superfície celular (STATHOPOULOS, 1998). O resultado exposto, foi semelhante ao encontrado por KNÖBL et al. (2012) que detectaram o gene *tsh* em 26% de *E.coli* isoladas de órgãos de aves com colibacilose.

O gene *iss*, encontrado em 17,5% (17/97) das *E.coli* isoladas de ovos de patas, de acordo com diversos pesquisadores, conferem maior resistência ao efeito lítico do soro e tem sido caracterizado como um marcador de patogenicidade, devido a sua maior prevalência em cepas isoladas de aves doentes (OZAMA et al., 2008; GYLES& FAIRBROTHER, 2010; CORRÊA et al., 2013). Também CORRÊA et al. (2013) detectaram este gene em 87,5% das APEC isoladas de suabes cloacais, 100% de inglúvio e 87,5% de órgãos de psitacídeos.

A correlação dos isolados positivos para o gene *iss* que apresentaram multirresistência, também se faz importante, visto que 76,5% (13/17) dos isolados de *E.coli* eram multirresistentes a, no mínimo, quatro antimicrobianos. Dentre estas, 23,5% (4/17) foram resistentes a nove ou dez antimicrobianos. Associação semelhante foi realizada em isolados de *E.coli*, obtidos de galinhas e leitões na China que apresentaram resistentes a múltiplos antimicrobianos (YANG et al., 2004) e de carcaças de frangos de corte no Brasil (LIMA-FILHO et al, 2013). Diante de tal associação, infere-se

que o gene *iss* pode ser utilizado como marcador de estirpes multirresistentes (YANG et al., 2004; LIMA-FILHO et al, 2013)

Além disso, a presença de genes de resistência aos antimicrobianos em linhagens aviárias, comensais ou patogênicas, sugere a transferência horizontal de material genético entre diversas estirpes (BARROS et al., 2012), e aumenta o potencial de risco de doenças em indivíduos imunossuprimidos ou hígidos. Posto que, a identificação do fator *iss* indica a presença de plasmídeos que os carregam, conferindo maior facilidade de transmissão desse gene às cepas bactérias de outras espécies, inclusive para seres humanos (ABREU et al., 2010; GYLES & FAIRBROTHER, 2010).

O gene *papC* foi detectado em 15,4% (15/97) dos isolados de *E.coli* dos ovos de pata. Sua expressão tem ocorrido mais em aves com colibacilose, e possivelmente esteja relacionada à colonização de órgãos internos e com estágios avançados da doença (POURBAKHSI et al., 1997). Também, KNÖBL et al. (2008), identificaram maior percentual deste gene (37,5%) em órgãos de papagaios com colibacilose. A diferença entre a porcentagem de isolamento do gene pode estar relacionada a origem das amostras, neste estudo utilizou-se em ovos produzidos por aves aquáticas, aparentemente saudáveis, e o dos pesquisadores acima utilizaram amostras de papagaios doentes.

Já o gene *eae*, comumente presente em cepas O157:H7, foi detectado em apenas 2,06% (2/97) dos isolados de *E.coli* dos ovos de patas. JOKINEN et al. (2011) analisando amostras fecais de diferentes espécies de animais analisados para pesquisa da cepa O157:H7, observaram que os patos e gansos foram os que tiveram menor frequência de isolamento dessa estirpe.

A infreqüência desse gene em ovos de patas corrobora com SALEHI (2014) que o identificou em apenas 3,10% das amostras de fezes de pombos (ISHII et al., 2007) e em 7,5% em fezes de patos e gansos. Por outro lado, diferem dos encontrados em fezes de pato-real (*Anas Boschas*) no Canadá, em que 16% das amostras foram positivos para o gene (CHANDRAN & MAZUMDER 2014). No estudo de OH et al. (2011) a maioria das estirpes positivas para *eae* foram isoladas de aves aquáticas. Contudo, mesmo que a porcentagem de detecção tenha sido baixa, este resultado é importante, pois

os patótipos que albergam este fator têm alto potencial propagação de doenças infecciosas que impactam a saúde pública (JORIS et al., 2013; SALEHI, 2014).

Ademais, CHANDRAN & MAZUMDER (2014) alegam que a presença isolada do gene *eae* não pode determinar a patogenicidade das estirpes. Para afirmar que isolados de *E. coli*, contendo o gene *eae*, sejam realmente patogênicas, pesquisas devem ser realizadas envolvendo outros fatores de virulência que caracterizam o patótipo EHEC.

Para o esclarecimento sobre os dois isolados positivos para o gene *eae* pode-se considerar em duas hipóteses. A primeira seria baseada nas informações obtidas pelos questionários aplicados nas aviculturas de subsistência e na caracterização visual realizada nos locais visitados, em que a presença de poços e lagoas sem tratamento, muitas vezes contaminados por esgoto das residências rurais, podem ter servido como fonte de infecção das aves aquáticas por *E.coli* diarreio gênicas. A outra seria por contaminação durante a manipulação dos ovos, por pessoas infectadas com *E.coli* diarreio gênicas.

Aves que albergam patógenos com alto potencial zoonótico, podem contaminar fontes de água, causando impacto na saúde pública (JOKINEN et al., 2011; OH et al., 2011; CHANDRAN & MAZUMDER, 2014). Assim como pombos urbanos (*Columbia livia*) se infectam com cepas de *E.coli* diarreio gênicas de seres humanos devido ao contato próximo com os mesmos, além do livre acesso a lixões (incluindo lixo hospitalar) (SILVA et al., 2009), os hábitos dos patos também podem facilitar a infecção por este tipo de *E.coli*.

Em relação à quantidade de genes detectados em cada amostra, 45,7%(16/35) foram positivas para apenas um gene de virulência, 45,7%(16/35) para dois genes, 8,5% (3/35) para três genes e não foram detectadas combinações com os quatro genes pesquisados (Tabela 7).

TABELA 7 - Genes *papC*, *iss*, *tsh*, e *eae* suas associações, pesquisados em amostras de *E.coli* isoladas de ovos de patas oriundas de propriedades de subsistência e feiras-livres localizados no Distrito Federal e estado de Goiás.

Total de genes							
Genes	Propriedades de subsistências		Feiras livres		Total		<i>p</i>
	N(44)		N(53)				
	n(+)	%	n(+)	%	n(+)	%	
<b>1 gene</b>	9	20,45	7	13,20	16	45,7	NS
<b>2 genes</b>							
<i>papC+</i> <i>iss+</i>	0	0	3	5,7	3	-	NS
<i>papC+</i> <i>tsh+</i>	1	2,3	4	7,5	5	-	NS
<i>iss+</i> <i>tsh+</i>	3	6,8	5	9,4	8	-	NS
Subtotal	4	9,1	12	22,6	16	45,7	-
<b>3 genes</b>							
<i>papC+</i> <i>tsh+</i> <i>iss+</i>	1	2,3	2	3,8	3	-	NS
Subtotal	1	2,3	2	3,8	3	8,5	-
<b>TOTAL</b>	14	31,8	21	39,6	35	-	NS

Os dados foram submetidos ao teste não paramétrico de qui-quadrado a 5%.

Verifica-se na mesma Tabela, que os arranjos com até dois genes foram encontrados em 9,1% das amostras obtidas de propriedades e 22,7% das feiras livres. Um único tipo de combinação com três genes (*papC+*, *tsh+*, *iss+*) foi detectado em 2,3% e 3,8% dos isolados em propriedades de subsistência e feiras, respectivamente. Estes resultados corroboram com EWERS et al. (2005) que citaram a diferentes associações dos fatores de virulência nas cepas de APEC e isto dificulta a caracterização genotípica desse patotipo ou até mesmo o detalhamento sobre os genes de virulência e suas combinações.

Esta combinação de três genes (*papC+*, *tsh+*, *iss+*) detectada nos isolados deste estudo, provavelmente potencializa o papel patogênico dos isolados de *E. coli* o que se sustenta em NGELEKA et al. (2002) os quais mostraram que a patogenicidade das cepas de *E.coli* em infecções extra-intestinais depende do arranjo dos fatores de virulência. Os mesmos autores demonstraram que a presença dos três genes *papC+*, *tsh+*, *iss+* nas APEC, aumentou a patogenicidade dos isolados. SAIDENBERG et al. (2013)

acrescentam que os genes *iss*, *pap*, *tsh*, dentre outros, identificados em *E.coli* isoladas de Mutum-do-Nordeste (*Pauxi mitu*), aparentemente sadios, pode afetar uma espécie nativa ameaçada de extinção.

A alta prevalência de determinados fatores de virulência em animais, cujo seus produtos serão destinados ao consumo humano, como os ovos de patas, facilita a transferência desses genes para a microbiota do organismo humano (LIU et al., 2013). Ademais, a presença de fatores de virulência, comuns entre bactérias isoladas aves e humanos, como os genes *papC*, *tsh* e *iss* obtidos de *E.coli* extraintestinais, detectadas tanto de carcaças de frangos e perus vendidos no varejo do Canadá, quanto de fezes e sangue humanos, advertem um maior risco de ocasionar doenças veiculadas por alimentos (ASLAM et al., 2014).

#### 4. CONCLUSÕES

Conclui-se que as propriedades contêm patos consorciados com galinha, que não existe preocupação com a sanidade, bem como com a alimentação e o tipo de abrigo.

*E.coli* foi isolada da casca, do albume e da gema, e os genes de virulência *tsh*, *papC* e *eae* e o gene de resistência *iss* foram detectados nos isolados. As cepas positivas para o gene *eae* podem estar relacionadas a estipes de *E.coli* diarreio gênicas que causam graves doenças em humanos.

A maioria dos isolados de *E.coli* apresentou multirresistência a diferentes classes de antimicrobianos utilizados em medicina veterinária e humana, inclusive o cloranfenicol.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABREU, D. L. C.; FRANCO, R. M.; NASCIMENTO, E. R.; PEREIRA, V. L. A.; ALVES, F. M. X.; ALMEIDA, J. F. 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**, Rio de Janeiro, v.30, n.5, p.406-410, 2010.
2. ADZITEY, F.; HUDA, N.; ALI, G. R. R. Prevalence and antibiotic resistance of *Campylobacter*, and *Listeriamonocytogenes* in ducks: A review. **Foodborne Pathogens and Disease**, Larchmont, v.9, n.6, p.498-505, 2012.
3. ALROY, K.; ELLIS J. C. Pilot study of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* in herring gulls (*Larus argentatus*) and wastewater in the northeastern united states. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, Lawrence, v.42, n.1, p. 160-163, 2011.
4. ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Monitoramento de resíduos no leite exposto ao consumo: Relatório 2006-2007. **PAMVET - Programa de Análises de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Produtos de Origem Animal**. 2009. 76p.
5. ASLAM, M.; TOUFEER, M.; BRAVO, C. N.; LAI, V.; REMPEL, H.; MANGES, A.; DIARRA, M. S. Characterization of extraintestinal pathogenic escherichia coli isolated from retail poultry meats from Alberta, Canadá. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.177, n.1, p.49-56, 2014.
6. BARBOSA, N. A. A.; SAKOMURA, N. K.; MENDONÇA, M. O.; FREITAS, E. R.; FERNANDES, J. B. K. Qualidade de ovos comerciais provenientes de poedeiras comerciais armazenados sob diferentes tempos e condições de ambientes. **Ars Veterinaria**, Jaboticabal, v.24, n.2, p.127-133, 2008.
7. BARROS, M. R.; SILVEIRA, W. D.; ARAÚJO, J. M.; COSTA, E. P.; OLIVEIRA, A. A.; SANTOS, A. P. S. E.; SILVA, V. A. S.; MOTA, R. A. 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.
8. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Divisão de Inspeção de Carnes e Derivados. Portaria n.1, de 21 fev. 1990. Publicada em 6 mar. 1990. **Normas gerais de inspeção de ovos e derivados**. Brasília. DF: MAPA, 1990. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta>> Acesso: 2 abr. 2014.

9. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria da Defesa Agropecuária. Portaria n.193 de 12 de maio. 1998. **Regulamento Técnico Para Licenciamento e Renovação de Licença de Antimicrobianos de Uso Veterinário**. Brasília. DF: MAPA, 1990. Disponível em: [http://www.rr-americas.oie.int/in/proyectos/Camevet/Normas\\_paises/Normativas%20Países/Brasil/PORT193.htm](http://www.rr-americas.oie.int/in/proyectos/Camevet/Normas_paises/Normativas%20Países/Brasil/PORT193.htm)> Acesso: 15 jul. 2014.
10. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria da Defesa Agropecuária. Instrução Normativa. n. 62, de 26 ago. 2003. Publicada em 18 set. 2003. **Métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água**. Brasília. DF: MAPA, 2003. 123 p.
11. BRITO, B. G. Fatores de virulência de *Escherichia coli* de origem aviária – APEC. **II Simpósio de Sanidade Avícola**, Santa Maria, 2000.
12. BRITO, B. G.; RODRIGUES, L. B.; TAMEHIRO, C. Y.; GUIMARÃES, I. G. Fatores de virulência de cepas de *Escherichia coli* isoladas de galinhas com alterações no sistema reprodutor. In: CONGRESSO DE PRODUÇÃO E CONSUMO DE OVOS, 2, 2000. **Anais...** São Paulo: Associação Paulista de Avicultura, p.172, 2000.
13. CARDOSO, A. L. S. P.; TESSARI, E. N. C.; CASTRO, A. G. M.; KANASHIRO, A. M. I.; GAMA, N. M. S. Q. Pesquisa de coliformes totais e coliformes fecais analisados em ovos comerciais no Laboratório de Patologia Avícola de Descalvado. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.68, n.1, p.19-22, 2001.
14. CHANDRAN, A.; MAZUMDER, A. Occurrence of Diarrheagenic Virulence Genes and Genetic Diversity in *Escherichia coli* Isolates from Fecal Material of Various Avian Hosts in British Columbia, Canada. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.8, n.6, p.1933-1940, 2014.
15. CHENG, J.; ZHAO, W.; WANG, Q.; LIU, X.; WANG, W. Accumulation of mercury, selenium and PCBs in domestic duck brain, liver and egg from a contaminated area with an investigation of their redox responses. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, Amsterdam, v.35, n.1, p.388-394, 2013.
16. CONOVER, M. R. Wildlife management by metropolitan residents in the United States: practices, perceptions, costs, and values. **Wildlife Society Bulletin**, Bethesda, v.25, n.2, p.306-311, 1997.
17. CORRÊA, I. M. O.; FLORES, F.; SCHNEIDERS, L. Q.; BRITO, B. G.; LOVATO, M. Detecção de fatores de virulência de *Escherichia coli* e análise de *Salmonellas* pp. em psitacídeos **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.33, n.2, p.241-246, 2013.

18. COSTA, A. R. F.; LIMA, K. V. B.; SOUSA, C. O.; LOUREIRO, E. C. B. Desenvolvimento de PCR multiplex para detecção e diferenciação de categorias de *Escherichia coli* diarreio gênicas. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, Manaus, v.1, n.2, p.77-84, 2010.
19. CROXEN, M.A.; FINLAY, B.B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. **Nature Reviews Microbiology**, London, v.8, n.1, p. 26-38, 2010.
20. DOZOIS, C. M.; DHO-MOULIN, M.; BRÉE, A.; FAIRBROTHER, J. M.; DESAUTELS, C.; CURTISS, R. Relationship between the *tsh* autotransporter and pathogenicity of avian *Escherichia coli* and localization and analysis of the *tsh* genetic region **Infection and Immunity**, Washington, v.68, n.7, p.4145-4154, 2000.
21. EWERS, C.; JANBEN, T.; KIEBLING, S.; PHILIPP, H. C.; WIELER, L. Rapid detection of virulence-associated genes in avian pathogenic *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. **Avian diseases**, Kennett Square v.49, v.2, p.269-273, 2005.
22. EWERS, C.; LI, G.; WILKING, H.; KIEBLING, S.; ALT, K.; ANTÃO, E.; LATURNUS, C.; DIEHL, I.; GLODDE, S.; HOMEIER, T.; BÖHNKE, U.; STEINRÜCK, H.; PHILIPP, H.; WIELER, L. H. Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: How closely related are they? **International Journal of Medical Microbiology**, Jane,v.297, n.1, p.163-176, 2007.
23. FIGUEIREDO, T. C.; CANÇADO, S. V.; VIEGAS, R. P.; RÊGO, I. O. P.; LARA, L. J. C.; SOUZA, M. R.; BAIÃO, N. C. Qualidade de ovos comerciais submetidos a diferentes condições de armazenamento. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.63, n.3, p.712-720, 2011.
24. FREITAS, L. W.; PAZ, I. C. L. A.; GARCIA, R. G.; CALDARA, F. R.; SENO, L. O.; FELIX, G. A.; LIMA, N. D. S.; FERREIRA, M. O. S.; CAVICHIOLO, F. Aspectos qualitativos de ovos comerciais submetidos a diferentes condições de armazenamento. **Revista Agrarian**, Dourados, v.4, n.11, p.66-72, 2011.
25. GIGUÈRE, S.; PRESCOTT, J. F.; BAGGOT, J. D.; WALKER, R. D.;DOWLING, P. M. **Terapia Antimicrobiana em Medicina Veterinária**. 4ed, São Paulo: 1ed. Roca, 2010. 683p.
26. GIRARD, F.; BATISSOON, I.; FRANKEL, G. M.; HAREL, J.; FAIRBROTHER, J. M. Interaction of enteropathogenic and shiga toxin-producing *Escherichia coli* and porcine intestinal mucosa: Role of intimin and tir in adherence. **Infection and Immunity**, Washington, v.73, n.9, p.6005-6016, 2005.

27. GIRAUDEAU, M.; CZIRJA, G. A.; DUVAL, C.; BRETAGNOLLE, V.; GUTIERREZ, C.; HEEB, P. An experimental test in Mallards (*Anas platyrhynchos*) of the effect of incubation and maternal preen oil on eggshell microbial load. **Journal Ornithology**, Berlim, v. 155, n.1, p.671-677, 2014.
28. GRUNENWALD, H. Optimization of chain reactions. In: BARTLETT, J. M. S.; STIRLING, D. **Methods in Molecular Biology**. 2 ed. Totowa: Humana Press Inc., 2003. v. 226 PCR Protocols. cap 20, p. 89-100.
29. GYLES, C. L.; FAIRBROTHER, J. M. *Escherichia coli*. In: GYLES, G. L.; PRESCOTT, J. F.; SONGER, G.; THOEN, C. O. **Pathogenesis of bacterial infections in animals**. 4d. Iowa: Blackwell Publishing, 2010. cap. 15, p. 266-308.
30. HIDASI, H. W.; HIDASI NETO, J.; MORAES, D. M. C.; LINHARES, G. F. C.; JAYNE, V. S.; ANDRADE, M. A. Enterobacterial detection and *Escherichia coli* antimicrobial resistance in parrots seized from the illegal wildlife trade. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, Boston, v.44, n.1, p.1-7, 2013.
31. HOLLMEN, T. E.; DEBROY, C.; FLINT, P. L.; SAFINE, D. E.; SCHAMBER, J. L.; RIDDLE, A. E.; TRUST, K. A. Molecular typing of *Escherichia coli* strains associated with threatened sea duck and near-shore marine habitats of south-west Alaska. **Environmental Microbiology Reports**, Switzerland, v.3, n.2, p.262-269, 2011.
32. ISHII, S.; MEYER, K. P.; SADOWSKY, M. J. Relationship between Phylogenetic Groups, Genotypic Clusters, and Virulence Gene Profiles of *Escherichia coli* Strains from Diverse Human and Animal Sources. **APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY**, Washington, v.73, n.18, p. 5703–5710, 2007.
33. JOKINEN, C.; EDGE, T. A.; HOA, S.; KONING, W.; LAING, C.; TABOADA, E.; MAURO, W.; MEDEIROS, D.; MILLER, J.; ROBERTSON, W.; THOMAS, J. E.; TOPP, E.; ZIEBELL, K.; GANNON, V. P. J. Molecular subtypes of *Campylobacter* spp., *Salmonella enterica*, and *Escherichia coli* O157:H7 isolated from faecal and surface water samples in the Oldman River watershed, Alberta, Canada. **Water Research**, New York, v.45, n.1, p.1247-1257, 2011.
34. JONDREVILLE, C.; LAVIGNE, A.; JURJANZ, S.; DALIBARD, C.; LIABEUF, J.; CLOSTRE, F.; LESUEUR-JANNOYER, M. Contamination of free-range ducks by chlordecone in Martinique (French West Indies): A field study. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v.493, n.1, p.336-341, 2014.
35. JORIS, M. A.; VANROMPAY, D.; VERSTRAETE, K.; REU, K.; ZUTTER, L.; COX, E. Use of antibody responses against locus of enterocyte effacement (LEE) – Encoded antigens to monitor enterohemorrhagic *Escherichia coli*

- infections on cattle farms. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.79, n.12, 3677-3683, 2013.
36. KARIYAWASAM, S.; NOLAN, L. K. PapA gene of avian pathogenic *Escherichia coli*. **Avian diseases**, Kennet Square, v.55, n.1, p.532-538, 2011.
37. KNÖBL, T.; GODOY, S. N.; MATUSHIMA, E. R.; GUIMARÃES, M. B.; PIANTINO, A. J. 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**, São Paulo, v.45, n.1, p.54-60, 2008.
38. KNÖBL, T.; GOMES, T. A. T.; VIEIRA, M. A. M.; BOTTINO, J. A.; FERREIRA, A. J. P. F. Detection of pap, sfa, afa and fimadhesin-encoding operons in avian pathogenic *Escherichia coli*. **International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine**, Washington, v.2, n.2, p. 135-141, 2004.
39. KNÖBL, T.; MORENO, A. M.; PAIXÃO, R.; GOMES, T. A. T.; VIEIRA, M. A. M.; LEITE, D. S.; BLANCO, J. E.; FERREIRA, A. J. P. Prevalence of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) clone harboring sfa gene in Brazil. **The Cientific World Journal** [online], Nova York , v. 2012, p.1-7, 2012. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/tswj/2012/437342/>> Acesso em: 3 set. 14.
40. KUHNERT, P., P. BOERLIN, AND J. FREY. 2000. Target genes for virulence assessment of *Escherichia coli* isolates from water, food and the environment. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v.24, n.1, p.107–117, 2011.
41. LEANDRO, N. S. M.; DEUS, H. A. B.; STRINGHINI, J. H.; CAFÉ, M. B.; ANDRADE, M. A.; CARVALHO, F. B. Aspectos de qualidade interna e externa de ovos comercializados em diferentes estabelecimentos na região de Goiânia. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v.6, n.2, p.71-78, 2005.
42. LIMA-FILHO, J. V.; MARTINS, L. V.; NASCIMENTO, D. C. O.; VENTURA, R. F.; BATISTA, J. E. C.; SILVA, A. F. B.; RALPH, M. T.; VAZ, R. V.; RABELLO, C. B. V.; SILVA, I. M. M.; EVÊNCIO-NETO. Zoonotic potential of multidrug-resistant extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* obtained from healthy poultry carcasses in Salvador, Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador, v.17, n.1, p.54-61, 2013.
43. LITERAK, I.; DOLEJSKA, M.; JANOSZOWSKA, D.; HRUSAKOVA, J.; MEISSNER, W.; RZYSKA, H.; BZOMA, S. CIZEK, A. Antibiotic-resistant *Escherichia coli* bacteria, including strains with genes encoding the extended-spectrum beta-lactamase and qnrs, in waterbirds on the Baltic Sea Coast of Poland. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 76, n.24, p.8126-8134, 2010.

44. LIU, B.; YANG, Q.; LI, L.; SUN, J.; LIAO, X.; FANG, L.; YANG, S.; DENG, H.; LIU, Y. Dissemination and Characterization of Plasmids Carrying *oqxab-blactx-M* Genes in *Escherichia coli* Isolates from Food-Producing Animals. **PLOS ONE**, San Francisco, v. 8, n.9. p.1-9, 2013.
45. LORENZ, S. C.; SON, I.; MAOUNOUNEN-LAASRI, A.; LIN, A.; FISCHER, M.; KASE, J. A. Prevalence of Hemolysin Genes and Comparison of *ehxA* Subtype Patterns in Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STEC) and Non- STEC Strains from Clinical, Food, and Animal Sources. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.79, n.20, p.6301-6311, 2013.
46. MEERBURG, B. G.; KOENE, M. G. J.; KLEJIN, D. *Escherichia coli* concentrations in feces of geese, coots, and gulls residing on recreational water in the Netherlands. **Vetor-Borne and Zoonotic Diseases**, New Rochelle, v.11, n.6, p601-603, 2011.
47. MENDES, F. R.; LEITE, P. R. S. C.; FERREIRA, L. L.; LACERDA, M. J. R.; ANDRADE, M. A. Utilização de antimicrobianos na avicultura - artigo número 197. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 10, n.2, p.2352-2389, 2013.
48. MEULLEN, C. J.; DIKKEN, G. Criação de patos nas regiões tropicais. **Agrodok 33**. Wageningen: Fundação Agromisa, 2003, 96p. Disponível em: <[http://www.cd3wd.com/cd3wd\\_40/stock/001/agrodoks/33-p-2003\\_screen.pdf](http://www.cd3wd.com/cd3wd_40/stock/001/agrodoks/33-p-2003_screen.pdf)>. Acesso em: 30 de abril de 2014.
49. MOURA, A. M. A.; OLIVEIRA, N. T. E.; THIEBAUT, J. T. L.; MELO, T. V. Efeito da temperatura de estocagem e do tipo de embalagem sobre a qualidade interna de ovos de codornas japonesas (*Coturnix japonica*). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.32, n. 2, 2008.
50. NCCLS – National Committee for Clinical Laboratory Standards. Bacterial from animal, 2002, 81p.
51. NGELEKA, M.; BRERETON, L.; BROWN, G.; FAIRBROTHER, J. M. Pathotypes of avian *Escherichia coli* as related to *tsh*-, *pap*-, *pil*-, and *iuc*-DNA sequences, and antibiotic sensitivity of isolates from internal tissues and the cloacae of broilers. **Avian diseases**, Kennet Square, v.46, n.1, p.143-152, 2002.
52. OH, J.; KANG, M.; HWANG, H.; AN, B.; KWON, J.; KWON, Y. Epidemiological investigation of *eaeA*-positive *Escherichia coli* and *Escherichia albertii* strains isolated from healthy wild birds. **Journal of Microbiology**, Washington, v.49, n.5, p.747-752, 2011.
53. OIE – WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH CODE. 2010. Disponível em: <http://www.oie.int/>. Acesso: 10 abr. 2014.
54. PERSSON, S.; OLSEN, K.; SCHEUTZ, F.; KROGFELT, K. A.; GERNER-SMIDT, P. A method for fast and simple detection of major diarrhoeagenic

- Escherichia coli* in the routine diagnostic laboratory. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, Wiesbaden, v.13, n.1, p.516–524, 2007.
55. POURBAKHS, S. A.; DHO-MOULIN, M.; BRÉE, A.; DESAUTELS, C.; DOIZE, B. M.; FAIRBROTHER, J. M. Localization of the *in vivo* expression of P and F1 fimbriae in chickens experimentally inoculated with pathogenic *Escherichia coli*. **Microbiology Pathogenesis**, London, v. 22, n.1, p. 331-341, 1997.
  56. RAIVIO, T. L.; SHANNON, K. D.; PRICE, N. L. The *Escherichia coli* Cpx envelope stress response regulates genes of diverse function that impact antibiotic resistance and membrane integrity. **Journal Bacteriology**, Washington, v. 195, n.12, p. 2254-2267, 2013.
  57. RAJI, M. A.; ADEKEYE, J. O.; KWAGA, J. K. P.; BALE, J. O. O. In vitro and in vivo characterization of avian *Escherichia coli* isolated from poultry in Nigeria. **Israel Veterinary Medical Association**, Ra'anana, v.58, n.1, p.1-5, 2003. Disponível em: [http://www.google.com.br/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CBwQFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.isrvma.org%2FImageToArticle%2FFiles%2FVol\\_%252058\\_1%2520](http://www.google.com.br/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CBwQFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.isrvma.org%2FImageToArticle%2FFiles%2FVol_%252058_1%2520). Acesso: 20 jul. 2014.
  58. ROCHA, A. C. G. P.; SILVA, A. B.; BRITO, B. G.; MORAES, H. L.; PONTES, A. P.; CÉ, M. C.; NASCIMENTOS, V. P.; SALLE, C. T. P. Virulence factors of avian pathogenic *Escherichia coli* isolated from broilers from the South of Brazil. **Avian diseases**, Kennet Square, v. 46, n.3, p. 749-753, 2002.
  59. RODRIGUES, D. P; FONSECA, E. L. Resistência Antimicrobiana. **Manual de Procedimentos para a Determinação de Suscetibilidade Antimicrobiana em Enterobactérias**, FIOCRUZ - LRNCEB/LABENT, Rio de Janeiro. 2006.
  60. RODRIGUEZ-SIEK, K. E.; GIDDINGS, W. C.; DOETKOTT, C.; JOHNSON, T. J.; NOLAN, L. K. Characterizing the APEC pathotype. **Veterinary Research**, Dakota, v.36, n.1, p.241-256, 2005.
  61. SAIDENBERG, A. A. B.; ALLEGRETTI, L.; ASTOLFI-FERREIRA, A. A. S.; FERREIRA, A. J. P.; ALMEIDA, M. A.; RASO, T. F. Some virulence genes of *Escherichia coli* isolated from cloacal swabs of healthy Alagoas Curassows (*Pauxi mitu*) in Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.33, n.4, p.523-527, 2013.
  62. SALEHI, M. Determination of intimin and Shiga toxin genes in *Escherichia coli* isolates from gastrointestinal contents of healthy broiler chickens in Kerman City, Iran. **Comparative Clinical Pathology**, London, v.23, n.1, p.175-179, 2014.

63. SALVADOR, F. C.; GRACIOLI, A. D. N.; BURIN, A. S.; FAILA, N. Análise microbiológica e de impurezas encontradas na *Pimpinella anisum* L., comercializadas em lojas de produtos naturais de Apucarana – PR e região. **Revista Saúde e Pesquisa**, São Luís, v.4, n.2, p.140-146, 2011.
64. SAMPAIO, I. B. M. **Estatística Aplicada à Experimentação Animal**. Belo Horizonte: Fundação de ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2002. 221 p.
65. SANTANA, E.S.; OLIVEIRA, F.H.; SOUZA, A.C.; MENDES, F.R.; ANDRADE, M.A. Uso de produtos alternativos aos antimicrobianos na avicultura. **Enciclopedia Biosfera**, Goiânia, n.12, 2011.
66. SCALETSKY, I. C. A.; SOUZA, T. B.; ARANDA, K. R. S.; OKEKE, I. N. Genetic elements associated with antimicrobial resistance in enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) from Brazil. **BMC Microbiology**, London, v.10, n.25, p.1-5, 2010.
67. SHAWKEY, M. D.; PILLAI, S. R.; HILL, G. E. Chemical warfare? Effects of uropygial oil on feather-degrading bacteria. **Journal Avian Biology**, Whashington, v. 34, n.1, p.345-349, 2003.
68. SILVA, E. E.; LOPES, E. S.; TEIXEIRA, R. S. C.; ALBUQUERQUE, A. H.; SILVA, R. C. R.; GOMES-FILHO, V. J. R.; VASCONCELOS, R. H.; MACIEL, W. C. Pesquisa de enterobactérias em patos domésticos (*Cairina moschata*) de propriedades localizadas em quatro municípios do Ceará, Brasil. **Arquivo Instituto Biológico**, São Paulo, v.81, n.1, p.16-21, 2014.
69. SILVA, I. M. M.; EVÊNCIO-NETO, J.; SILVA, R. M.; LUCENA-SILVA, N.; MAGALHÃES, J.; BALIZA, M. Caracterização genotípica dos isolados de *Escherichia coli* provenientes de frangos de corte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.63, n.2, p.333-339, 2011.
70. SILVA, V. L.; NICOLI, J. R.; NASCIMENTO, T. C.; DINIZ, C. G. Diarrheagenic *Escherichia coli* strains recovered from Urban Pigeons (*Columbia livia*) in Brazil and their antimicrobial susceptibility pattern. **Current Microbiology**, Amsterdam, v.59, n.1, p.302–308, 2009.
71. SMET, A.; MARTEL, A.; PERSOONS, D.; DEWULF, J.; HEYNDRICKX, M.; HERMAN, L.; HAESBROUCK, F.; BUTAYE, P. Broad-spectrum  $\beta$ -lactamases among Enterobacteriaceae of animal origin: Molecular aspects, mobility and impact on public health. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 34, n. 3, p. 295-316, 2010.
72. STATHOPOULOS, C.; PROVENCE, D. L.; CURTISS, R. Characterization of the avian pathogenic *Escherichia coli* hemagglutinin *tsh*, a member of the immunoglobulin A protease-type family of autotransporters. **Infection and Immunity**, Washington, v. 67, n.1, p. 772-781, 1999.

73. STRINGHINI, M. L. F.; ANDRADE, M. A.; MESQUITA, A. J.; ROCHA, T. M.; REZENDE, P. M.; LEANDRO, N. S. M. Características bacteriológicas de ovos lavados e não lavados de granjas de produção comercial. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v.10, n.4, p.1317-1327, 2009.
74. SUMMERS, A. O. Generally overlooked fundamentals of bacterial genetics and ecology. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v.34, n.1, p.85=92, 2002.
75. SZEMLAKO, K.; KRAWCZYK, B.; SAMET, A.; SLEDZIÚSKA, A.; NOWICKI, B.; NOWICKI, S.; KUR, J. A subset of two adherence systems, acute pro-inflammatory pap genes and invasion coding dra, fim, or sfa, increases the risk of *Escherichia coli* translocation to the bloodstream. **European journal of clinical microbiology & infection diseases** [on line], Wiebaden, v.1, n.1, p. 1-4, 2013. Disponível em: <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10096-013-1913-x>. Acesso: 9 jan. 2014.
76. VIEIRA, M. A. M. Ilhas de patogenicidade. **O mundo da saúde**, São Paulo, v.33, n.4, p.406-414, 2009.
77. WANG, Y.; HE, T.; SCHWARZ, S.; ZHOU, D.; SHEN, Z.; WU, C.; WANG, Y.; MA, L. Detection of the staphylococcal multiresistance gene cfr in *Escherichia coli* of domestic-animal origin. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, Amsterdam, v.67, n.1, p.1094-1098, 2012.
78. WANG, Y.; TANG, C.; YU, X.; XIA, M.; YUE, H. Distribution of serotypes and virulence-associated genes in pathogenic *Escherichia coli* isolated from ducks. **Avian Pathology**, Huntingdon, v.39, n.4, p.297-302, 2010.
79. WELLMAN-LABADIE, O.; PICMAN, J.; HINCKE, M. T. Antimicrobial activity of the Anseriform outer eggshell and cuticle. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Oxford, v. 149, n.1, p.640-649, 2008.
80. XU, M.; QIU, Y.; BIGNERT, A.; ZHOU, Y.; ZHU, Z.; ZHAO, J. Organochlorines in free-range hen and duck eggs from Shanghai: occurrence and risk assessment. **Environmental Science and Pollution Research**, Washington, v.14, n.3, 2014.
81. YANG, H.; SHENG, C.; WHITE, D. G.; ZHAO, S.; MCDERMOTT, P.; WALKER, R.; MENG, J. Characterization of multiple-antimicrobial-resistant *Escherichia coli* isolates from diseased chickens and swine in China. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 42, n.1, p.3483-3490, 2004.
82. YU, J.; KAPER, J. B. Cloning and characterization of the *eae* gene of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, Salem, v. 6, n.3, p.411-417, 1992.

83. ZANATTA, G. F.; KANASHIRO A. M. I.; CASTRO A. L. S. P.; CARDOSO, E. N. C.; TESSARI, S. C. P. Suscetibilidade de amostras de *Escherichia coli* de origem aviária a antimicrobianos. **Arquivos Instituto Biológico**, São Paulo, v.71, n.1, p. 283-286, 2004.

### CAPÍTULO 3 - CONSIDERAÇÕES FINAIS

A criação de aves aquáticas é um hábito comum entre os brasileiros, principalmente a produção consorciada com galinhas. A comercialização e consumo de carne e ovos dessas aves, já ultrapassou âmbitos regionais e atingiu o paladar de consumidores por todo país. Com a elevação da produção e consumo desses produtos, também houve uma elevação do risco de transmissão de patógenos com mecanismos de infecção até mesmo desconhecidos.

O delineamento do perfil das propriedades de subsistência criadoras de patos permitiu esclarecer que a criação em conjunto com galinhas pode estar envolvida com a alta taxa de cepas multirresistentes a antimicrobianos isolados dos ovos de patas, já que aves aquáticas raramente são submetidas à antibioticoterapia. Além disso, a inexistência de programas de vacinação para essa ordem de aves as torna vulneráveis a qualquer tipo de desafio, até mesmo aqueles listados na OIE, como Newcastle.

As análises dos resultados deste trabalho também indicam a necessidade de adoção de programas sanitários voltados exclusivamente para aves aquáticas domésticas, como os patos. Isso envolve a criação exclusiva, sem consórcio com outras espécies, afim de evitar a transmissão de patógenos ou mesmo de genes de virulência entre elas. Além disso, a tecnificação dos criatórios, a elaboração de programas higiênico-sanitários melhores na produção e controle no acondicionamento desses ovos, pode melhorar a sua qualidade.

Saneamento básico ainda não abrange toda população brasileira, com destaque as regiões carentes e zonas rurais. Nestes locais o esgoto das residências é escoado a céu aberto, aumentando a possibilidade de contaminação das fontes de água e de doenças veiculadas por ela. O livre acesso das aves aquáticas domésticas e selvagens a fontes de águas contaminadas permite a infecção dessas por patógenos importantes para sanidade avícola e para saúde pública.

*Escherichia coli* possui diferentes classificações perante seus patotipos e mecanismos de virulência. Essa diversidade antigênica e de patotipos pode explicar a natureza da manifestação clínico-patológica da

maioria das doenças causadas por ela. Os inúmeros genes de virulência, que podem estar presentes em isolados de *E.coli*, desenvolvem mecanismos complexos para invasão e colonização da célula hospedeira. Mais estudos são necessários para identificação e caracterização destes genes, e assim proporcionar maior esclarecimento dos processos patogênicos utilizados por essas bactérias para infectar seus hospedeiros.

O isolamento e identificação de patógenos em ovos de patas, atualmente, se faz necessário para avaliar importância das aves aquáticas nas doenças veiculadas por alimentos. Já que, o consumo dos produtos originários dessas aves tem crescido vertiginosamente. Podendo ser exemplificado pela venda desses ovos em 100% das feiras livres visitadas no Distrito Federal e estado de Goiás.

Não houve diferença significativa entre os isolados de *E.coli* das propriedades de subsistência e das feiras livres, bem como na frequência de fatores de virulência detectados nessas amostras. Mesmo que a maioria dos isolados não tenha sido positivo para nenhum dos quatro genes estudados, as 35 estirpes positivas a um ou mais genes possuem mecanismos capazes de causar doença. Elucidando que o risco de transmissão de patógenos via ovo, se faz presente em ambos os locais. Entretanto, os isolados de feiras são mais preocupantes, posto que o número de pessoas expostos ao risco é maior.

A facilidade de transmissão dos genes plasmidiais, como o gene *iss*, dificulta o controle de determinadas bactérias e é importante no aumento do potencial de patogenicidade de estirpes. Fatores de resistência sérrica, como o gene *iss*, são essenciais para APEC pois, permitem a infecção do hospedeiro mesmo em ambientes adversos. As adesinas, como as codificadas pelos genes *papC* e *tsh*, são elementos essenciais nos estágios iniciais da invasão ao organismo hospedeiro. A combinação de genes de virulência com diferentes finalidades dificulta o combate pelos mecanismos de organismo hospedeiro e a ação dos antimicrobianos.

A detecção do gene *eae* em duas cepas isoladas da casca ressalta a relevância sanitária dessas aves na cadeia alimentar e na sanidade avícola. Pois, esse fator de virulência é comumente encontrado em cepas O157:H7 do patotipo EHEC. Possibilitando assim, o desenvolvimento de lesão do tipo

adesão e esfacelamento de enterócito (A/E), promovendo infecção intestinal severa pela ingestão de ovos de patas.

A investigação de resistência aos antimicrobianos aliada à pesquisa dos genes de virulência em isolados de *E.coli* presentes em ovos de patas consumidos por humanos, é importante ferramenta para determinação das medidas a serem implantadas com relação aos programas de sanidade, bem como a interferência negativa do convívio entre diferentes espécies, como aves aquáticas e galinhas.

Conhecimento mais profundo sobre os fatores de virulência, bem como os genes ligados a resistência antimicrobiana de amostras de *E.coli* isoladas de ovos patas serão de grande auxílio para o desenvolvimento de medidas higiênico-sanitárias, assegurando o controle de patógenos nesse produto.